

Inhibition von HERV-K(HML-2) durch zelluläre Restriktionsfaktoren, Stressgranula und anti-retrovirale Wirkstoffe

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

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

vorgelegt von

Adriana Block

aus Pasewalk

2022

Die Arbeit wurde am Robert Koch-Institut unter der Leitung von Prof. Dr. Norbert Bannert (Robert Koch-Institut, Berlin) angefertigt.

Januar 2017 bis August 2021

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. Haike Antelmann, Freie Universität Berlin

Disputation am 30.08.2022

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bannert, für die Möglichkeit die Promotion in seiner Abteilung durchzuführen, bedanken. Vielen Dank für die Unterstützung wie auch Begutachtung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Haike Antelmann für die Begutachtung der Promotion von Seiten der Freien Universität Berlin bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. Hohn, Herrn Dr. Hoffmann und Frau Dr. Cignöz, die mir zu jeder Zeit meine Fragen beantworteten und mir hilfreiche Tipps geben konnten. Für die Hilfestellung im Labor während meiner Schwangerschaft möchte ich mich besonders bei Frau Keller bedanken.

Ich möchte mich auch bei den Servicekräften Frau Gericke und Frau Reichert bedanken. Vielen Dank, dass ihr stets und ständig wisst, wo alles im Labor steht.

Ein Dank geht auch an die gesamte Abteilung FG18 für die vielen netten Gespräche. Ich habe mich sehr wohl bei Euch gefühlt.

An dieser Stelle auch ein Dank an die deutsche Forschungsgemeinschaft (Projekt SPP1923), worüber meine Promotionsarbeit finanziert worden ist.

Meine Eltern möchte ich an dieser Stelle auch erwähnen, weil Sie mir das Studium überhaupt erst ermöglicht und mir immer zur Seite gestanden haben. Zuletzt möchte ich mich noch bei all denjenigen bedanken, die in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit für mich da waren, insbesondere meinem Mann Kai und meiner Tochter Pia, die mir viele schöne aufbauende Momente schenkten.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Retroviren.....	1
1.2 HERV-K(HML-2) Familie	3
1.3 retroviraler Replikationszyklus.....	4
1.4 HERV (Re)Aktivierung.....	11
1.5 Restriktionsfaktoren.....	13
1.5.1 A3G.....	13
1.5.2 PYHIN-200 Proteinfamilie	14
1.6 Stressgranula	16
1.6.1 Entstehung einer Stressgranula.....	16
1.6.2 Virusinfektion und Stressgranula	18
2. Zielstellung.....	20
3. Material und Methoden	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Zelllinien.....	22
3.1.2 Bakterienstämme	22
3.1.3 Antikörper	23
3.1.4 Primer/Sonden	24
3.1.5 Konstrukte.....	25
3.1.6 Puffer und Nährmedien.....	28
3.1.7 Kits.....	29
3.1.8 Chemikalien, Enzyme, Größenstandards	29
3.2 Methoden	32
3.2.1 Zellkultur-Technik.....	32
3.2.1.1 Zellkultivierung	32
3.2.1.2 Transfektion	33
3.2.1.3 Infektion.....	36
3.2.1.4 Präparation von Zellen und Zellüberständen.....	37
3.2.2 Molekularbiologische Arbeiten	38

3.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion	38
3.2.2.2 Restriktionsansätze mit Endonukleasen.....	42
3.2.2.3 DNA-Agarosegelelektrophorese und DNA-Gelextraktion.....	43
3.2.2.4 Ligation und Transformation.....	43
3.2.2.5 RNA-Isolierung und cDNA Synthese.....	44
3.2.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot	45
3.2.2.7 Luciferase-Messung	46
3.2.2.8 Durchflusszytometrie	47
3.2.2.9 Immunfluoreszenzfärbung (cLSM)	47
3.2.2.10 Quantifizierung der Virusexpression.....	47
4. Ergebnisse	51
4.1 Restriktionsfaktoren.....	51
4.1.1 Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3 G (A3G)	51
4.1.1.1 GH- und Tera-1-Zelllinien produzieren endogenes A3G/ HERV-K (HML-2) RNA und endogene virale Partikel.....	51
4.1.1.2 Die ektopische Expression von NTAP-A3G reduziert die HERV-K(HML-2) Viruspartikelproduktion	54
4.1.1.3 Die Proteinexpression von A3G-HA hat keinen Einfluss auf die HERV-K(HML-2) Viruspartikelproduktion	57
4.1.1.4 Keine Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion durch A3G	59
4.1.2 PYHIN-Proteine	63
4.1.2.1 Geringfügige Restriktion von HERV-K(HML-2) durch das zytoplasmatische Protein AIM2	66
4.1.2.2 Restriktion von HERV-K(HML-2) durch das nukleäre Protein MND4.....	67
4.1.2.3 Restriktion von HERV-K(HML-2) durch das nukleäre Protein IFIX.....	68
4.1.2.4 Restriktion von HERV-K(HML-2) durch die Pyrin-Linker Domäne von MND4 und IFIX und der Vergleich der Restriktionen von verschiedenen HERV-K(HML-2) Konstrukten	69

4.2 Stressgranula	72
4.2.1 G3BP	72
4.2.2 P-EIF2 α	76
4.3 Inhibition von HERV-K(HML-2) durch HIV-Therapeutika.....	79
4.3.1 Reverse Transkriptase Inhibitoren	79
4.3.1.1 Nukleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI)	79
4.3.1.2 Nukleotidische reverse Transkriptase Inhibitoren (NtRTI)	89
4.3.1.3 Nicht nukleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI).....	90
4.3.2 Integraseinhibitoren	93
4.3.2.1 Integraseinhibitor Elvitegravir reduziert die HERV-K(HML-2) Infektion.....	94
4.3.2.2 Integraseinhibitor Raltegravir inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion.....	95
4.3.3 Proteaseinhibitoren	96
4.3.3.1 Proteaseinhibitor Amprenavir inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion nicht	97
4.3.3.2 Der Proteaseinhibitor Darunavir ist kein Inhibitor der HERV-K(HML-2) Infektion	98
4.3.3.3 Proteaseinhibitor Indinavir beeinflusst die HERV-K(HML-2) Infektion nicht	100
4.3.3.4 Proteaseinhibitor Lopinavir reduziert die HERV-K(HML-2) Infektion nicht	101
5. Diskussion.....	103
5.1 Keine Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion durch das A3G Protein.....	103
5.2 Restriktion von HERV-K(HML-2) durch nukleäre PYHIN Proteine ...	107
5.3 HERV-K(HML-2) induziert eine Stressgranula-Assemblierung.....	112
5.4 NRTI, NtRTI und Integraseinhibitoren inhibieren die HERV-K(HML-2) Infektion.....	117
6. Zusammenfassung	125
7. Abstract.....	126
8. Abkürzungsverzeichnis	127

9. Selbständigkeitserklärung	131
10. Literaturverzeichnis	132

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenie der Retroviren	1
Abbildung 2: Darstellung des retroviralen Replikationszykluses	4
Abbildung 3: Darstellung der proviralen Sequenz von HERV-K(HML-2) und daraus resultierende Transkripte	5
Abbildung 4: Molekulare Biosynthese von HERV-K(HML-2)	7
Abbildung 5: Aufbau eines reifen HERV-K(HML-2) Virus.....	9
Abbildung 6: Proliferationsmechanismus von endogenen Retroviren (ERVs)	9
Abbildung 7: Darstellung der Knospung von viralen HERV-K(HML-2) Partikeln.....	10
Abbildung 8: Darstellung der PYHIN Proteinfamilie	15
Abbildung 9: Kontrolle der Proteintranslation durch den eukaryotischen Initiationsfaktor 2 (eIF2)	17
Abbildung 10: Die antivirale Funktionsweise der Stressgranula.....	18
Abbildung 11: Reaktionsprinzip der Luciferasemessung.....	46
Abbildung 12: Reaktionsprinzip des Cavidis Assays.....	48
Abbildung 13: Reaktionsprinzip PERT-Assay	50
Abbildung 14: Etablierung der A3G qPCR	52
Abbildung 15: Nachweis der endogenen, zellulären A3G und HERV-K(HML-2) RNA bzw. viraler HERV-K(HML-2) RNA im Überstand der GH und Tera-1 Zelllinie.....	53
Abbildung 16: Proteinexpression von Rec, Staufen und A3G	55
Abbildung 17: NTAP-A3G reduziert die HERV-K(HML-2) Partikelproduktion.	56
Abbildung 18: Keine Reduzierung der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion durch A3G-HA.....	58
Abbildung 19: Expression von allen A3G Proteinen.....	60
Abbildung 20: Keine Reduzierungen der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion durch das A3G Protein.....	62
Abbildung 21: Darstellung der Struktur des AIM2, MNDA und IFIX Proteins mit den dazugehörigen Pyrin-Linker Proteinen	63

Abbildung 22: Darstellung des oriST HERV-K113 und CMVoriST HERV-K113 Konstrukt	64
Abbildung 23: Nachweis von AIM2, MNDA und IFIX und den jeweiligen Pyrin-Linker Proteinen	65
Abbildung 24: Geringfügige Reduktionen der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion durch das AIM2 Protein.....	66
Abbildung 25: MNDA reduziert die HERV-K(HML-2) Partikelproduktion....	67
Abbildung 26: Das nukleäre IFIX Protein reduziert wie das MNDA Protein die virale HERV-K(HML-2) Partikelproduktion.	68
Abbildung 27: Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelbildung durch die Pyrin-Linker Domäne von MNDA und IFIX; Aufhebung der vollständigen Restriktion von MNDA und IFIX durch die Verwendung des CMVoriST HERV-K113 Konstruktes.	71
Abbildung 28: Lokalisation des G3BP Proteins in ungestressten und gestressten Zellen.....	73
Abbildung 29: HERV-K(HML-2) induziert eine Stressreaktion mit einhergehende Ausbildung einer Stressgranula.	75
Abbildung 30: HIV-1 und HERV-K(HML-2) induzieren eine Phosphorylierung von EIF2 α	77
Abbildung 31: Reduktion der GFP+ Zellen durch den Wirkstoff Ziduvudin nach erfolgter HIV- und HERV-Infektion.	81
Abbildung 32: Das Thymidinanaloga Zidovudin inhibiert die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Infektion.....	83
Abbildung 33: Das zweite Thymidinanaloga Stavudin reduziert die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Infektion.....	84
Abbildung 34: Das Cytosinanaloga Lamivudin inhibiert nur bei hohen Konzentrationen die HERV-K(HML-2) Infektion.....	86
Abbildung 35: Das Cytosinanaloga Zalcitabin inhibiert die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Infektion mit ähnlichen IC50-Werte.	87
Abbildung 36: Das Cytosinanaloga Emtricitabin inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion mit geringerer Sensitivität gegenüber HIV-1.....	88

Abbildung 37: Das Adenosinnukleotidanalogen Tenofovir-disoproxilfumarat (TDF) inhibiert schon bei geringsten Konzentrationen die HERV-K(HML-2) Infektion.	90
Abbildung 39: Das NNRTI Etravirin zeigt keine Beeinflussung der HERV-K(HML-2) Infektion.	91
Abbildung 40: Auch das zweite NNRTI Nevirapin inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion nicht.	93
Abbildung 41: Der Integraseinhibitor Elvitegravir inhibiert die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Infektion mit niedrige Sensitivität für HERV-K(HML-2) gegenüber HIV-1.	94
Abbildung 42: Der Integraseinhibitor Raltegravir inhibiert die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Infektion mit gleicher Sensitivität.	96
Abbildung 43: Proteaseinhibitor Amprenavir inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion nicht.	98
Abbildung 44: Auch der zweite Proteaseinhibitor Darunavir beeinflusst die HERV-K(HML-2) Infektion nicht.	99
Abbildung 45: Der dritte Proteaseinhibitor Indinavir zeigt ebenfalls keine Beeinflussung die HERV-K(HML-2) Infektion.	100
Abbildung 46: Wie zu erwarten ist, inhibiert der vierte Proteaseinhibitor Lopinavir ebenfalls die HERV-K(HML-2) Infektion nicht.	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien mit deren Ursprung und Kultivierungsmedium.....	22
Tabelle 2: Bakterienstämme.....	22
Tabelle 3: Antikörperliste eingeteilt in primäre und sekundäre Antikörper ...	23
Tabelle 4: Primerliste mit deren Sequenzen, eingeteilt in Klonierungsprimern, qPCR- und PERT-Primer	24
Tabelle 5: Konstrukte	25
Tabelle 6: Puffer und deren Zusammensetzung.....	28
Tabelle 7: Kits.....	29
Tabelle 8: Chemikalien, Enzyme, Größenstandards	29
Tabelle 9: eingesetzte Zellzahlen	33
Tabelle 10: Pipettierschema für die Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode.....	34
Tabelle 11: Pipettierschema für die PEI-Transfektion	35
Tabelle 12: Einsatzkonzentration [%] für die Herstellung von viralen HERV-K(HML-2) Partikeln	35
Tabelle 13: Einsatzkonzentration [%] für die Herstellung von viralen HIV-1 Partikeln.....	35
Tabelle 14: Einsatzkonzentration für die Restriktionsexperimente mit A3G-Proteinen	36
Tabelle 15: Einsatzkonzentration für die Restriktionsexperimente mit PYHIN-Proteinen	36
Tabelle 16: Ansatz für die PCR mit der Pfu-DNA-Polymerase	39
Tabelle 17: Cyclor-Programm Pfu-DNA-Polymerase	39
Tabelle 18: Pipettierschema für den Sequenzierungsansatz	40
Tabelle 19: Cyclor-Programm für die Sequenzierungs-PCR.....	40
Tabelle 20: Pipettierschema für qPCR ohne Sonde	41
Tabelle 21: Cyclor-Programm für qPCR ohne Sonde.....	41
Tabelle 22: Pipettierschema Duplex-qPCR	42
Tabelle 23: Cylcler-Programm für Duplex-qPCR.....	42
Tabelle 24: Restriktionsansatz mit Endonukleasen	42
Tabelle 25: Ligationsansatz.....	44

Tabelle 26: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für zwei Gele	45
Tabelle 27: Reaktionsansatz PERT-Assay.....	49
Tabelle 28: Cyclor-Programm PERT-Assay	49
Tabelle 29: Zusammenfassung der Ergebnisse für die HIV-1 Inhibitoren .	122

1. Einleitung

1.1 Retroviren

Die Retroviren bilden die Familie der Retroviridae und sind umhüllte Viren mit zwei Kopien eines RNA-Einzelstrang-Genoms in Plusstrangorientierung. Das Merkmal aller Retroviren ist die reverse Transkription. Dabei wird mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase die virale genomische RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Anschließend erfolgt die Integration dieser DNA ins Wirtsgenom. Die integrierte Sequenz stellt das sogenannte „Provirus“ dar (Coffin et al. 1997; Löwer et al. 1999).

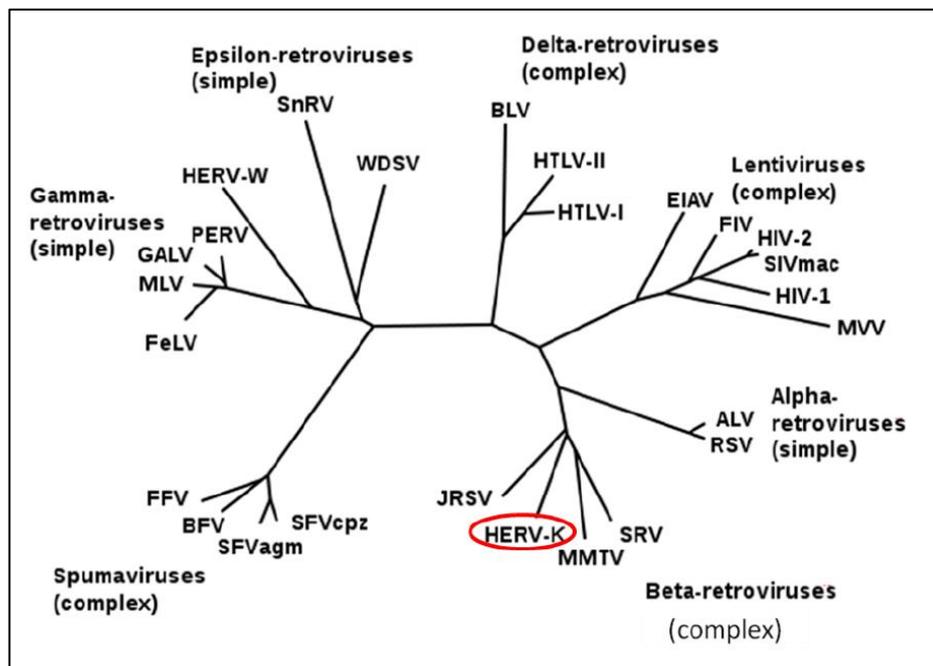


Abbildung 1: Phylogenie der Retroviren (Weiss 2006 (modifiziert))

Das „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV) teilt Retroviren in zwei Unterfamilien (Orthoretrovirinae und Spumaretrovirinae) ein. Die Lentiviren sowie die α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren gehören zu den Orthoretrovirinae und die Spumaviren zu den Spumaretrovirinae (ICTV [1]).

Außerdem können Retroviren in Viren mit einfachem (α -, γ - und ε -Retroviren) und komplexem Genom (β -, δ -, Lenti- und Spumaviren) eingeteilt werden (siehe Abb. 1), wobei die Retroviren mit einfachem Genom die genetischen

Informationen für die gruppenspezifischen Antigene, enzymatische Proteine und Glykoproteine besitzen und die Retroviren mit einem komplexen Genom noch weitere zusätzliche (akzessorische) Proteine bilden können (Weiss 2006; Coffin et al. 1997; Löwer et al. 1999).

Bekannt ist, dass Retroviren bei Menschen und Tieren Infektionskrankheiten hervorrufen können. Der bekannteste Vertreter der Retroviren, der erstmals von Montagnier in den 1980er Jahren isoliert wurde, ist das Humane Immundefizienz Virus (HIV-1/HIV-2). Der Erreger ist für das erworbene Immunschwäche Syndrom (AIDS) verantwortlich (Barré-Sinoussi et al. 1983).

Außerdem können Retroviren auch Tumorerkrankungen induzieren. John J. Bittner hat festgestellt, dass das „Mous Mammary Tumour Virus (MMTV)“ maligne Milchdrüsenerkrankungen bei Mäusen auslösen kann (Bittner et al. 1936). Außerdem hat Robert C. Gallo in den 1980er Jahren das Humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ-1 (HTLV-1), das mit den Erkrankungen der adulten T-Zell-Leukämie oder chronischer Paraparese im Zusammenhang steht, isoliert (Poiesz et al. 1980).

Neben exogenen Retroviren kommen auch endogene Formen vor. Dafür mussten Retroviren menschliche Keimbahnzellen infizieren und sich ins menschliche Genom der Keimbahnzellen integrieren, sodass diese integrierten Viren vertikal auf die Nachkommen weitervererbt werden können. Diese Retroviren werden als humane endogene Retroviren (HERV) bezeichnet und machen ca. 8 % des menschlichen Genoms aus. Mittlerweile sind die Sequenzen der humanen endogenen Retroviren im menschlichen Genom so stark deletiert, sodass nur noch einzelne Virusgene bzw. regulatorische *long terminal repeats* (LTR)-Regionen, die das Provirusgenom flankieren, vorhanden sind (Löwer et al. 1999; Bannert & Kurth 2006).

Für alle Retrovirusgruppen konnten Endogenisierungen (α -, β -, γ -, δ -, ε -Retroviren, Lenti- und Spumaretroviren) nachgewiesen werden (Jern et al. 2005).

1.2 HERV-K(HML-2) Familie

HERV-K gehört zur Gruppe der β -Retroviren (siehe Abb. 1) und die Proviren wurden erstmals 1982 aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu MMTV („mouse mammary tumor virus“) im menschlichen Genom entdeckt, woraufhin sich ihr Name HERV-K(HML) („Human MMTV-like“) ableitet (Callahan et al. 1982). Vor ungefähr 35 Millionen Jahren haben sich die ersten Mitglieder der HERV-K(HML-2) Familie in das Genom der Altweltaffen integriert (Beimforde et al. 2008), wobei durch wiederholten Proliferationsperioden mit einhergehenden Reintegrationen es zur Anhäufung von HERV-K(HML-2) Proviren im menschlichen Genom kam (Hanke et al. 2016). Vor ca. 800.000 bis 2 Millionen Jahren fanden die jüngsten belegten Integrationen statt. (Hanke et al. 2016). Im Verlauf der Evolution erlitten die meisten Proviren starke Deletionen und Mutationen, sodass heutzutage nur noch ca. 100 komplette HERV-K(HML-2) Proviren und 944 intakte bzw. fast intakte solo-LTRs vorhanden sind (Subramanian et al. 2011). Solo LTRs entstehen durch homologe Rekombinationen zwischen zwei LTR-Sequenzen einer proviralen Sequenz, die in einer Deletion der proviralen Sequenz resultiert, sodass nur ein LTR Fragment übrigbleibt (Hughes & Coffin 2004).

Die Integration von HERV-K113 wird auf 1 Million Jahre geschätzt (Hanke et al. 2016) und die Präintegrationsstelle von HERV-K113 befindet sich auf dem Chromosom 19 (Beimforde et al. 2008). Auf Grund der ethnischen Herkunft unterscheidet sich die Prävalenz von HERV-K113 (Turner et al. 2001). Bei der afrikanischen Bevölkerung sind rund 30 % Träger des Provirus, sodass sich daraufhin die Hypothese ergab, dass die initiale Integration in Afrika stattfand und die Ausbreitung durch die nördliche und östliche Migration der afrikanischen Bevölkerung vor rund 150.000 bis 200.000 Jahren erfolgte (Turner et al. 2001). Innerhalb der deutschen Bevölkerung sind nur 12 % Träger der HERV-K113 proviralen Sequenz (Bannert et al. 2018).

Das HERV-K113 Provirus besitzt einen offenen Leserahmen für alle viralen Proteine, wobei die provirale Sequenz für die Kodierung der reverse Transkriptase bzw. für die Hüllproteine Punktmutationen aufweisen, die die Funktionstüchtigkeit dieser Proteine reduziert oder sogar komplett aufhebt (Hanke

et al. 2009; Beimforde et al. 2008). Dagegen scheinen die LTR Region bzw. die Genbereiche, die für die Kodierung der Protease bzw. des Rec Proteins verantwortlich sind, intakt zu sein (George et al. 2011; Hanke et al. 2013 a).

1.3 retroviraler Replikationszyklus

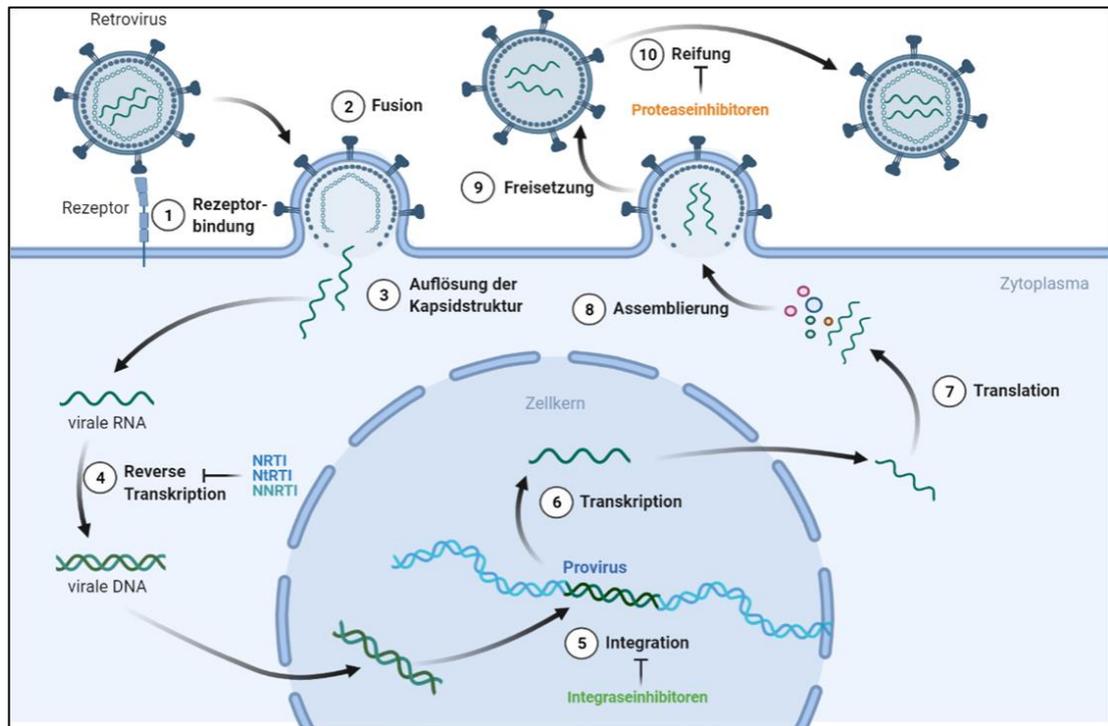


Abbildung 2: Darstellung des retroviralen Replikationszykluses (erstellt mittels BioRender.com)

Der retrovirale Replikationszyklus (siehe Abb. 2) beginnt mit der Bindung des viralen Oberflächenglykoproteins an die spezifischen membranständigen Rezeptoren der Wirtszelle, wodurch eine Fusionierung der Virus- mit der Wirtszellmembran und die Freisetzung des viralen Cores ins Zytoplasma erfolgt (Nisole et al. 2005). Durch die Auflösung der Kapsidstruktur werden die viralen RNAs und Enzyme freigesetzt, sodass die einzelsträngige RNA mithilfe der reversen Transkriptase in doppelsträngige (ds) DNA transkribiert werden kann (Nisole et al. 2005). Die reverse Transkriptase besitzt eine Polymerase und eine RNase H Domäne (Garcia-Montojo et al. 2018). Die abgelesene virale RNA wird während der reversen Transkription über die RNase H abgebaut (Berkhout et al. 1999).

Die Integrase ist für die Integration der viralen DNA ins humane Genom verantwortlich. Der initiale Schritt beginnt mit der Bindung der Integrase an die LTR Regionen der viralen dsDNA im Zytoplasma und bildet einen stabilen DNA-Integrase Komplex, der auch als Präintegrationskomplex bezeichnet wird. Anschließend erfolgt im Zytoplasma die 3' Prozessierung, wobei im ersten katalytischen Schritt von den beiden LTR Enden ein Dinukleotid durch die Integrase entfernt und anstelle dessen eine 3'Hydroxygruppe angehängt wird. Nach dem Import des Präintegrationskomplexes in den Zellkern bindet die Integrase an die Wirts-DNA und vermittelt das Andocken und die irreversible Bindung der 3'Hydroxylenden der viralen dsDNA an die 5'Phosphodiesterbrücken der Wirts-DNA, wodurch ein intermediäres Produkt mit Lücken entstanden ist. Diese Lücken befinden sich zwischen den 5'Phosphatenden der viralen DNA und die 3'Hydroxylenden der Wirts-DNA, welche durch wirtszelleigene Reparaturmechanismen repariert werden (Lataillade & Kozal 2006).

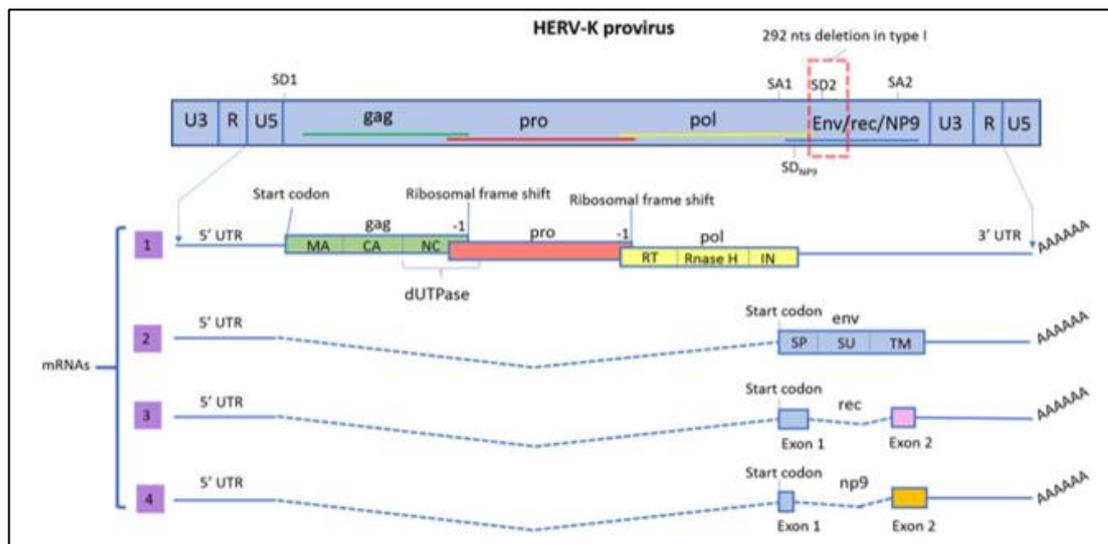


Abbildung 3: Darstellung der proviralen Sequenz von HERV-K(HML-2) und daraus resultierende Transkripte (Garcia-Montojo et al. 2018)

Das integrierte virale Genom (Provirus) besitzt eine Länge von ca. 10 Kilobasen (kb) (Bannert & Kurth 2004). Das Provirus wird von regulatorischen Sequenzen, die als LTRs bezeichnet werden, flankiert, die an den Genomenden in gleicher Orientierung (U3, R und U5) angeordnet sind (siehe Abb. 3), und besitzen Promotor und Enhancer Elemente, Bindestellen für Transkriptions-

faktoren und das Polyadenylierungssignal (Bannert & Kurth 2006; Kovalskaya et al. 2006). Nach der 5`LTR befindet sich die Primerbindestelle (Bannert & Kurth 2006), an dem die spezifisch zelluläre tRNA bindet und somit die reverse Transkription initiiert wird (Bannert & Kurth 2004). Die initiale tRNA für HERV-K ist eine Lysin (**K**)-tragende tRNA, wovon sich der Name HERV-**K** ableitet (Bannert & Kurth 2004). Im 5`-Gag-Bereich befindet sich die ψ -Stelle und dient als Verpackungssignal der viralen RNA (Bannert & Kurth 2006).

Retroviren mit einem komplexen Genom wie HIV, HTLV oder HERV-K können neben Genregionen für gruppenspezifischen Antigene, enzymatischen Proteine und Glykoproteine noch zusätzlich sogenannte akzessorische Genregionen besitzen (Bannert & Kurth 2004). Aus einer vollständigen gespleißten RNA werden sogenannte akzessorische Proteine (Nichtstrukturproteine) kodiert, die vielfältigen Funktionen beginnend bei der Regulation der Replikation bis hin zur De-Regulation der Wirtsabwehr besitzen können (Gramberg et al. 2009; Bannert & Kurth 2006).

HERV-K Proviren wurden in zwei verschiedene Typen abhängig von der Anwesenheit einer 292 bp Deletion zwischen dem *pol-env* Genbereich eingeordnet (siehe Abb. 3, Costas et al. 2001). Typ 2 besitzt keine Deletion in diesem Bereich und exprimiert das akzessorische Protein Rec („regulation of expression encoded by cORF“) und das Hüllprotein (Wodrich & Krausslich et al. 2001; Magin et al. 1999). Das Rec Protein bindet an das Rec responsive Element (RcRE), welches sich in der U3R Region der 3`LTR befindet (Magin et al. 1999), wodurch der virale RNA Transport aus dem Zellkern ermöglicht wird (Bannert & Kurth 2004). Die Typ1 Proviren besitzen diese 292 bp Deletion, wodurch die Expression des Hüllproteins und des Rec Proteins verhindert und anstelle dessen das Np9 Protein exprimiert wird (Armbruster et al. 2002). Die Funktion des Np9 Proteins ist noch unbekannt.

der viralen Protease und der dUTPase verantwortlich (Garcia-Montojo et al. 2018). Die Aktivierung der viralen Protease erfolgt durch selbständige Spaltung der Protease, sodass die Spaltung von den Gag-Pro oder Gag-Pro-Pol-Polyproteine erfolgen kann, wodurch die reverse Transkriptase und Integrase aktiviert wird (Garcia-Montojo et al. 2018). Die Spaltung des Gag-Vorläuferproteins durch die virale Protease in Matrix, Kapsid- und Nukleokapsidproteine erfolgt während der Partikelreifung, sodass aus einem nicht-infektiösem ein infektiöses Virus entsteht (Bannert & Kurth 2004). Die dUTPase hat zwei Funktionen: Einerseits wird das dUTP Nukleotid aus dem Desoxribonukleotidpool entfernt, sodass die Wahrscheinlichkeit reduziert wird, dass Uracil in den DNA Strang eingebaut wird, und andererseits wird der dTTP Vorläufer dUMP produziert (Vertessy & Toth. 2009). Das *pol* (Polymerase)-Gen kodiert die reverse Transkriptase mit der enthaltenen Polymerase und der RNase H Domäne und die Integrase (Garcia-Montojo et al. 2018). Das Env (Hüllprotein)-Vorläuferprotein wird aus einer einfach gespleißten viralen RNA am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und besteht aus einer Signalpeptid-, einer Oberflächen- und einer transmembranen Domäne (Garcia-Montojo et al. 2018). Die Signalpeptiddomäne ist entscheidend dafür, dass das Hüllprotein am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, über den sekretorischen Weg modifiziert und in die Zellmembran eingelagert werden kann (Garcia-Montojo et al. 2018). Die Signalpeptidase entfernt die Signalpeptiddomäne vom Env-Polyprotein (Garcia-Montojo et al. 2018). Die Oberflächen und transmembrane Einheiten werden über die zelluläre Furin Protease gespalten und werden zu Heterodimere nichtkovalent verknüpft (Garcia-Montojo et al. 2018). Im Golgi-Apparat erfolgt die Trimerisierung dieser Heterodimere mit anschließender Einlagerung dieser Trimere in die Zellmembran (Garcia-Montojo et al. 2018).

Nach diesem Schritt kann die Assemblierung und die Freisetzung von neuen viralen HERV-K(HML-2) Partikeln erfolgen, in dem zwei Kopien der viralen einzelsträngigen RNA mit den dazugehörigen viralen Proteinen in die neu entstehenden Viren eingebaut werden (siehe Abb. 2). Diese nicht infektiösen unreifen Viren werden mithilfe der viralen Protease und Spaltung des Gag-

Polyproteins zu reifen infektiösen Viren mit einem Durchmesser von ca. 100 nm (siehe Abb. 5; Garcia-Montojo et al. 2018).

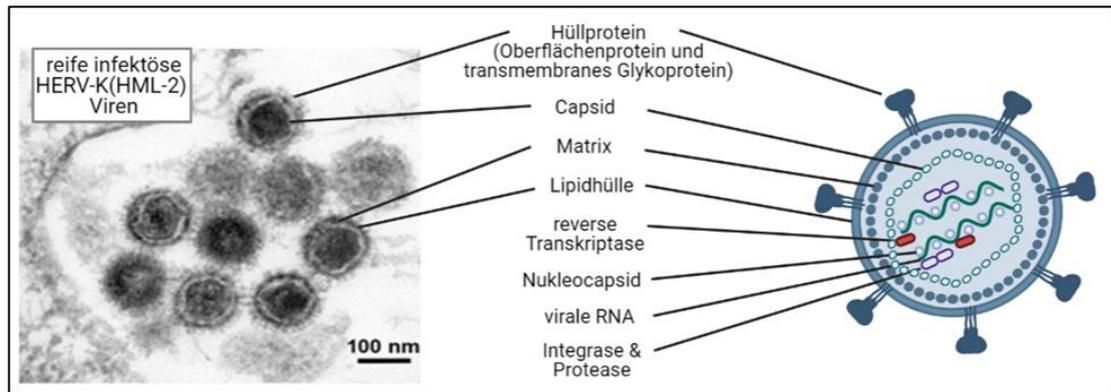


Abbildung 5: Aufbau eines reifen HERV-K(HML-2) Virus

Links: Elektronenmikroskopische Aufnahme von reifen HERV-K(HML-2) Viren (aufgenommen von der Fachgruppe 18 des Robert Koch-Instituts)

Rechts: Schematische Darstellung eines HERV-K(HML-2) Virus (erstellt mittels BioRender.com)

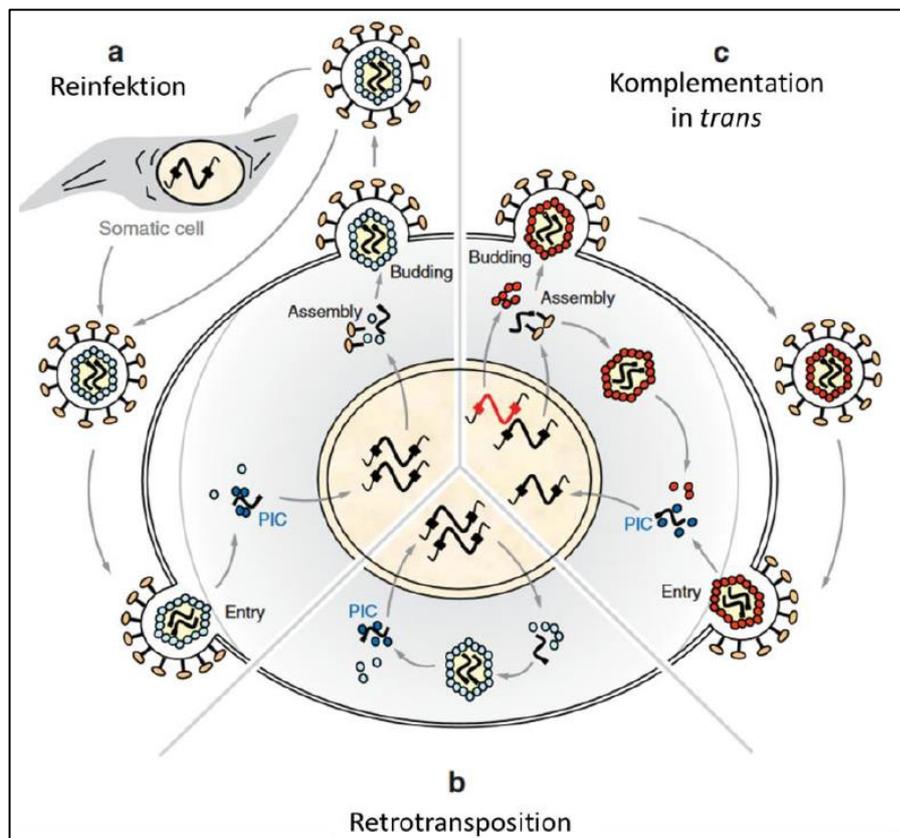


Abbildung 6: Proliferationsmechanismus von endogenen Retroviren (ERVs) (Bannert & Kurth 2006)

(a) *Reinfektion: Ein funktionelles Hüllprotein ist die Grundvoraussetzung für eine Reinfektion. Nach einer kurzen Replikationsperiode in einer somatischen Zelle, um weitere Anpassungen wie bspw. die Fitness der Retroviren zu erhöhen, erfolgt der Wiedereintritt des Virus in die Keimbahnzelle des Wirtes.*

(b) *Retrotransposition: Darunter wird ein intrazellulärer Amplifikationsmechanismus von Retrotransposons und ERVs verstanden. Bei diesem Amplifikationsschritt werden wahrscheinlich Übergangsformen von Core-Partikeln gebildet.*

(c) *Komplementation in trans: Für diesen Proliferationsweg wird ein Helfer-virus benötigt, der Proteine für die Partikelbildung bereitstellt, die von endogenen Retroviren genutzt werden. (Bannert & Kurth 2006)*

Humane endogene Retroviren sind nicht mehr in der Lage einen vollständigen Proliferationsmechanismus zu durchlaufen, weil sich die provirale Sequenz auf Grund von verschiedensten Deletionen bzw. Mutationen verändert hat (Bannert & Kurth 2006). Die Expression von HERV-K(HML-2) Transkripte werden über DNA und Histone Methylierungen bzw. Histone Deacetylierung reguliert, wobei der Level der CpG Methylierung mit der transkriptionellen Aktivität der HERV-K(HML-2) Proviren korreliert (Hanke et al. 2016). Außerdem kann die Translation von viralen Proteinen über die Interaktion der viralen RNA mit kleinen regulatorischen RNA Molekülen inhibiert werden, wodurch die Degradation der viralen RNA erfolgt und somit die virale Proteintranslation verhindert wird (Hanke et al. 2016).

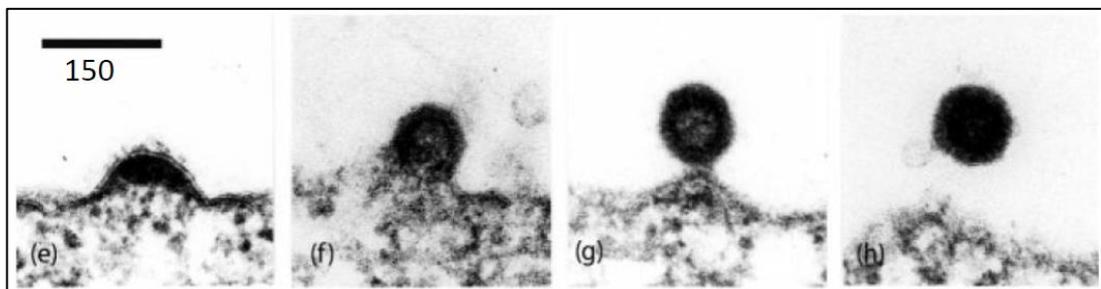


Abbildung 7: Darstellung der Knospung von viralen HERV-K(HML-2) Partikeln (Boller et al. 2005)

Eine Expression von HERV-K(HML-2) RNAs, Proteine, oder Virus-ähnlichen Partikeln konnten in verschiedensten Zelllinien (Leukämie, Melanom, Brustkrebs- oder Teratokarzinomzelllinie) wie auch im Blut von Patient*innen mit einer HIV-1 Infektion, einer Lymphom oder einer Brustkrebs Erkrankung nachgewiesen werden (Bieda et al. 2001; Büscher et al. 2005; Löwer et al. 1993, Contreras-Galindo et al. 2006; Contreras-Galindo et al. 2008), somit können HERVs intrazelluläre Amplifikationsmechanismen durchlaufen. Bei der Retrotransposition werden keine Viruspartikel freigesetzt, sondern wahrscheinlich Übergangsformen von Core-Partikeln im Zytoplasma gebildet (Bannert & Kurth 2006). Nach Auflösung dieser Partikel erfolgt eine Reintegration (siehe Abb. 6: Retrotransposition; Bannert & Kurth 2006). Bei einer Komplementation in *trans* werden für die Bildung von viralen Partikeln funktionelle Proteine eines Helfervirus benötigt, sodass nachfolgend eine Reinfektion bzw. Retrotransposition erfolgen kann (siehe Abb. 6: Komplementation in *trans*) (Bannert & Kurth 2006). In der Publikation Herr Contreras-Galindo und Kolleg*innen wurde gezeigt, dass eine Übertragung der HERV-K Sequenz, die über eigenständig produzierte HERV-K Partikeln von einer Brustkrebs- bzw. Teratokarzinomzelllinie und von peripheren Blutlymphozyten, von einem Lymphom Patient stammend, erfolgen kann, wodurch eine Reinfektion belegt wurde (Contreras-Galindo et al. 2015). Eine Integration der HERV-K Sequenz in das humane Genom wurde in dieser Publikation nicht beobachtet, sondern nach erfolgter reversen Transkription wurden episomale Strukturen gebildet (Contreras-Galindo et al. 2015). Schlussfolgernd kann eine Reintegration in diesem Zusammenhang aber nicht ausgeschlossen werden.

1.4 HERV (Re)Aktivierung

Die physiologische HERV-K(HML-2) Expression wird durch verschiedene Mechanismen wie CpG Methylierungen, Deaminierungen und Histonmodifikation reguliert (Manghera & Douville. 2013; Grow et al. 2015).

Die humanen endogenen Retroviren sind für die Aufrechterhaltung der Zellpluripotenz entscheidend. HERV-K(HML-2) Transkripte und Proteine konnten in undifferenzierten embryonalen und pluripotenten Stammzellen nachgewie-

sen werden. Die Wysocka Arbeitsgruppe zeigte, dass einige HERV LTRs eine Bindestelle für p53 und OCT4 besitzen (Grow et al. 2015). In differenzierten Zellen wird die HERV-K(HML-2) Expression zügig runter reguliert (Fuchs et al. 2013; Garcia-Montojo et al. 2018).

In der Placentabildung werden HERV Env Proteine vom HERV-W bzw. HERV-FRD exprimiert. HERV-W bzw. HERV-FRD gehören nicht zur HERV-K(HML-2) Familie und haben sich zu einem früheren Zeitpunkt in das menschliche Genom integriert. Diese Env Proteine sind unter dem Namen Syncytin-1 bzw. -2 bekannt und besitzen eine fusogene Eigenschaft, wodurch die syncytiotrophoblasten Schicht gebildet wird (Blond et al. 2000). HERV-K(HML-2) Env Proteine sind nicht an der Bildung des Syncytiums beteiligt, sondern werden in den zytotrophoblasten Zellen exprimiert und dienen wahrscheinlich der Immunsuppression (Kammerer et al. 2011).

Andererseits ist auch eine andere hypothetische Überlegung, dass die humanen endogenen Retroviren die Vertebraten vor einer erneuten Infektion mit artverwandten exogenen Retroviren schützen könnten. Diese Hypothese wird mit der Beobachtung unterstützt, dass humane endogene beta Retroviren keine exogenen Gegenspieler besitzen, die für die Menschen infektiös sind (Garcia-Montojo et al. 2018).

HERV-K(HML-2) LTRs können auf Grund von regulatorischen Elementen (Promotor, Enhancer, Spleißstellen, Polyadenylierungssignal), die Expression von benachbarten Genen regulieren (Garcia-Montojo et al. 2018).

Eine HERV-K(HML-2) Expression ist kein Auslöser für eine Tumorerkrankung, kann aber mit bestimmten Tumorerkrankungen (Teratokarzinoma, Keimzelltumor, Melanom, Eierstock und Prostatakrebs) assoziiert sein. HERV-K(HML-2) können über verschiedene potentielle Mechanismen die Karzinogenese fördern. HERV-K(HML-2) kann über die regulatorischen LTR Sequenz die Expression von Onkogenen fördern. Die akzessorischen Proteine (Rec und Np9) besitzen einen Einfluss auf die zelluläre Proliferation und das Env Protein fördert die Zelltransformation und erhöht die zelluläre Migration und Invasion, wodurch die Metastasenbildung gefördert wird. Die akzessorischen Proteine bzw. das Env Protein besitzen ebenfalls einen Einfluss auf die Immunsuppression. Außerdem können chromosomale Verände-

rungen durch homologe Rekombinationen die Karzinogenese fördern (Garcia-Montojo et al. 2018).

Reaktivierungen von HERV-K(HML-2) können ebenfalls bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Sjögren Syndrom (Reynier et al. 2009; Moyes et al. 2005) und bei neurologischen Erkrankungen wie amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Schizophrenie auftreten (Garcia-Montojo et al. 2018). Andererseits werden Reaktivierungen auch im Zusammenhang mit anderen viralen bspw. HIV-, HTLV oder Herpesvirus oder intrazellulären parasitären wie bspw. Toxoplasmose Infektionen nachgewiesen (Garcia-Montojo et al. 2018; Toufaily et al. 2011; Kwun et al. 2002; Frank et al. 2006).

1.5 Restriktionsfaktoren

1.5.1 A3G

Die APOBEC3 („Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3“) Genfamilie ist auf dem Chromosom 22 lokalisiert und exprimiert sieben verschiedenen Proteine (A3A, A3B, A3C, A3DE, A3F, A3G, A3H). A3A, A3C und A3H besitzen nur eine katalytische Domäne und A3B, A3DE, A3F und A3G besitzen zwei katalytische Domänen. Die komplette Genfamilie besitzt eine RNA editierende und/oder eine DNA-mutierende Aktivität. Die katalytischen Domänen besitzen ein konserviertes Zinkbindungsmotiv, eine Glutamat Aminosäure, die für den Protonentransport während der Deaminierung verantwortlich ist, und zwei aromatische Aminosäurereste, die für die Nukleinsäure Substratbindung verantwortlich sind, sodass eine Konvertierung von Cytidin zu Uridin erfolgen kann (Chiu & Greene 2008).

Das APOBEC 3G (A3G) Protein kann während der Entstehung von neuen Viren in das Virus eingebaut werden (Henriet et al. 2009). Dies erfolgt entweder über die Interaktion des A3G Proteins mit der viralen RNA (Henriet et al. 2009) oder über die Bindung des A3G Proteins an die retroviralen Gag Proteine (Bogerd et al. 2006a). Diese Viren können weitere Zellen infizieren und nach erfolgter Auflösung der Kapsidstruktur wird die virale RNA mit den

mitgebrachten Proteinen freigesetzt, wobei das A3G Protein die Zellen vor einer exogenen viralen Infektion warnt (Henriet et al. 2009).

Intrazellulär kommt das A3G Protein entweder in der LMM („low molecular mass“) oder in der HMM („high molecular mass“) Form vor. In der LMM Form beeinflusst A3G die reverse Transkription und ist enzymatisch aktiv, sodass während der Minusstrang DNA Synthese eine Deaminierung des Cytidins zu Uridin erfolgt. Daraufhin wird im Plusstrang der DNA ein Adenin statt Guanin eingebaut, wodurch eine Hypermutation entsteht. Durch die Integration dieser DNA in das humane Genom mit nachfolgender Transkription und Translation entstehen inaktive virale Proteine. Außerdem werden durch das vorhandene Uridin in der viralen DNA zelluläre Reparaturenzyme aktiviert, sodass eine abasische Stelle in der viralen DNA entsteht, wodurch ein Abbau der viralen DNA induziert wird. Bei einer Mutation an den Enden der viralen DNA kann die Integration gehemmt werden (Henriet et al. 2009).

Das A3G Protein kann zu 5-15 MegaDa Große HMM Granula multimerisieren (Chiu & Greene 2008; Henriet et al. 2009). Infolge dessen ist das A3G Protein enzymatisch inaktiv (Chiu & Greene 2008; Henriet et al. 2009). Das A3G Protein besitzt eine N-terminale CD1 Domäne, die für die RNA Bindung und die A3G Multimerisation entscheidend ist, und eine C-terminale CD2 Domäne, die die Deaminase Domäne enthält (Henriet et al. 2009). In der HMM A3G Granula wurden schon verschiedene Retroelemente wie bspw. die ALU-Sequenz und die HERV-K(HML-2) RNA nachgewiesen (Chiu et al. 2006; Block 2016). Durch diese Interaktion der HMM A3G Granula wird die Retrotransposition von ALU und LINE-Elementen im menschlichen Genom inhibiert und die Integrität des humanen Genoms aufrechterhalten (Bogerd et al. 2006b).

1.5.2 PYHIN-200 Proteinfamilie

Die PYHIN-200-Genfamilie ist auf dem humanen Chromosom 1 lokalisiert und codiert vier verschiedene Proteine: IFI16, IFIX, MNDA und AIM2 (Gariglio et al. 2011). Die Expression von PYHIN Proteinen wird hauptsächlich durch Typ 1 und Typ 2 Interferone, aber auch durch oxidativen Stress, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie proinflammatorische Moleküle angeregt

(Mondini et al. 2007). Die aktivierten PYHIN-Proteine agieren als Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) für zytoplasmatische und nukleäre DNA (Sharma et al. 2019; Dell'Oste et al. 2015; Gariglio et al. 2011). Die PYHIN-200 Proteine können mit verschiedensten Zielproteinen interagieren und somit eine Vielzahl von Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose/Pyroptose, Seneszenz und Inflammation regulieren (Gariglio et al. 2011; Lugin & Martinon 2018).

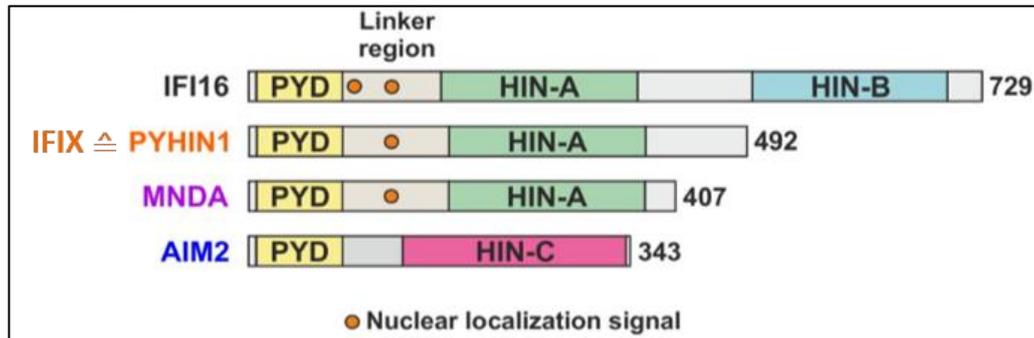


Abbildung 8: Darstellung der PYHIN Proteinfamilie

Dargestellt sind die vier Vertreter der PYHIN-Proteinfamilie: IFI16, PYHIN1 (IFIX), MNDA, AIM2 (Bosso et al. 2020 (modifiziert))

Die Gemeinsamkeit zwischen den vier PYHIN Proteinen besteht aus einer N-terminalen Pyrin Domäne, die für die Protein-Protein Interaktionen entscheidend ist, und einer C-terminalen konservierten Wiederholung aus 200 Aminosäureresten, die als HIN Domäne bezeichnet wird, wodurch die Bindung von einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA ermöglicht wird (Veeranki & Choubey 2012; Gariglio et al. 2011). Zwischen der Pyrin- und der HIN-Domäne befindet sich die Serin-Threonin-Prolin-reiche Linker-Region, in der sich die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) befindet (Johnstone & Trapani 1999). Das IFI16 Protein besitzt eine zweigeteilte Kernlokalisierungssequenz und IFIX/MNDA jeweils eine Kernlokalisierungssequenz, wodurch diese drei Proteine (IFI16, IFIX und MNDA) in den Zellkern transportiert werden und direkt die Transkription regulieren können (Bosso et al. 2020; Lugin & Martinon 2018). AIM2 hingegen besitzt keine Kernlokalisierungssequenz und verbleibt im Zytoplasma (Bosso et al. 2020). Das zytoplasmatische AIM2 Protein bindet an dsDNA und induziert die Bildung von Inflammasomen (Lug-

rin & Martinon 2018), was bei keinem anderen Protein der PYHIN Familie nachgewiesen wurde (Gariglio et al. 2011).

Die PYHIN Proteine erwiesen sich als effektive antivirale Restriktionsfaktoren. Eine Aktivierung von AIM2 Inflammasomen wurde nach der Infektion von humanen Cytomegaloviren (HCMV), Epstein-Barr Viren und humanen Papillomaviren (HPV) nachgewiesen (Huang et al. 2017a; Torii et al. 2017; Reinholz et al. 2013). IFI16 kann mit nukleärer herpesviraler DNA interagieren und bewirkt eine Inhibierung der viralen Transkription von humanen Cytomegaloviren (HCMV), Herpes-simplex-Viren (HSV) und humanen Papillomaviren (HPV) (Gariano et al. 2012; Lo Cigno et al. 2015). Bekannt ist außerdem, dass auch IFIX die virale Genexpression von HSV-1 reduziert (Crow & Crslea 2017). Die Interaktion von HIV-1 mit den PYHIN Proteinen zeigte eine Reduktion der HIV-1 Genexpression bei IFI16, IFIX und MNDA (Bosso et al. 2020). Die antivirale Wirkung von IFI16 wurde für HERV-K(HML-2) nachgewiesen (Zumblick 2019; Savas 2020; Friedrich 2021).

1.6 Stressgranula

1.6.1 Entstehung einer Stressgranula

Die Bildung einer Stressgranula erfolgt im Zytoplasma einer eukaryotischen Zelle und wird durch verschiedene Umwelteinflüsse wie bspw. Hitzeschock, UV-Bestrahlung, Hypoxie, Virusinfektion und Stress am endoplasmatischen Retikulum stimuliert (Anderson & Kedersha 2002).

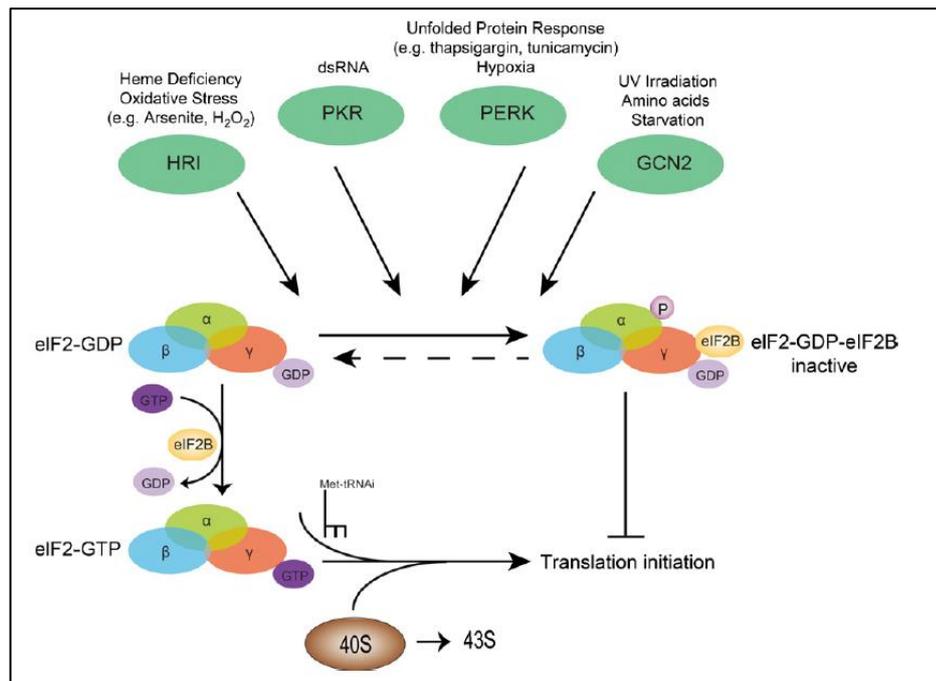


Abbildung 9: Kontrolle der Proteintranslation durch den eukaryotischen Initiationsfaktor 2 (eIF2) (Valiente-Echeverría et al. 2012)

Durch diese Stimuli werden vier verschiedene Serin/Threonin Proteinkinasen: (I) HRI, (II) PKR, (III) PERK/PEK und (IV) GCN2 aktiviert (siehe Abb. 9) (Valiente-Echeverría et al. 2012), wodurch die α -Untereinheit des eIF2 Proteins phosphoryliert wird (Kedersha et al. 1999). eIF2 ist ein heterotrimeres Protein, bestehend aus der α -, β - und γ -Untereinheit, und bildet zusammen mit der tRNA^{Met} und GTP einen ternären Komplex, welcher für die Initiation der Proteintranslation entscheidend ist (Krishnamoorthy et al. 2001). Die Phosphorylierung der α -Untereinheit vom eIF2 wirkt als kompetitiver Inhibitor gegenüber dem GTP-Austauschfaktor (eIF2B), d. h. die regulatorische Untereinheit von eIF2B bindet an die phosphorylierte α -Untereinheit von eIF2, sodass die Entstehung des ternären Komplexes und somit die Proteintranslation inhibiert wird (Krishnamoorthy et al. 2001).

Durch diese Inhibierung der Proteintranslation akkumuliert die mRNA, die 40S Ribosomen und verschiedene RNA-Bindeproteine bspw. Proteintranslationsinitiationsfaktoren (eIF3, eIF4G und PABP), TIA1/ TIAR und G3BP, wodurch die Stressgranula gebildet wird (Kedersha et al. 2002). Die Bildung und die Auflösung dieser Stressgranula ist ein rascher dynamischer Prozess und zwischen der Stressgranula und den Polysomen besteht ein dynamischer

ches Gleichgewicht (Kedersha et al. 2000). In der Stressgranula wird die untranslatierte RNA sortiert, sodass entweder die mRNA wieder zur Proteintranslation verwendet oder über die Processing bodies abgebaut oder in stabile nicht polysomalen mRNA Komplex gespeichert wird (Kedersha et al. 2000).

1.6.2 Virusinfektion und Stressgranula

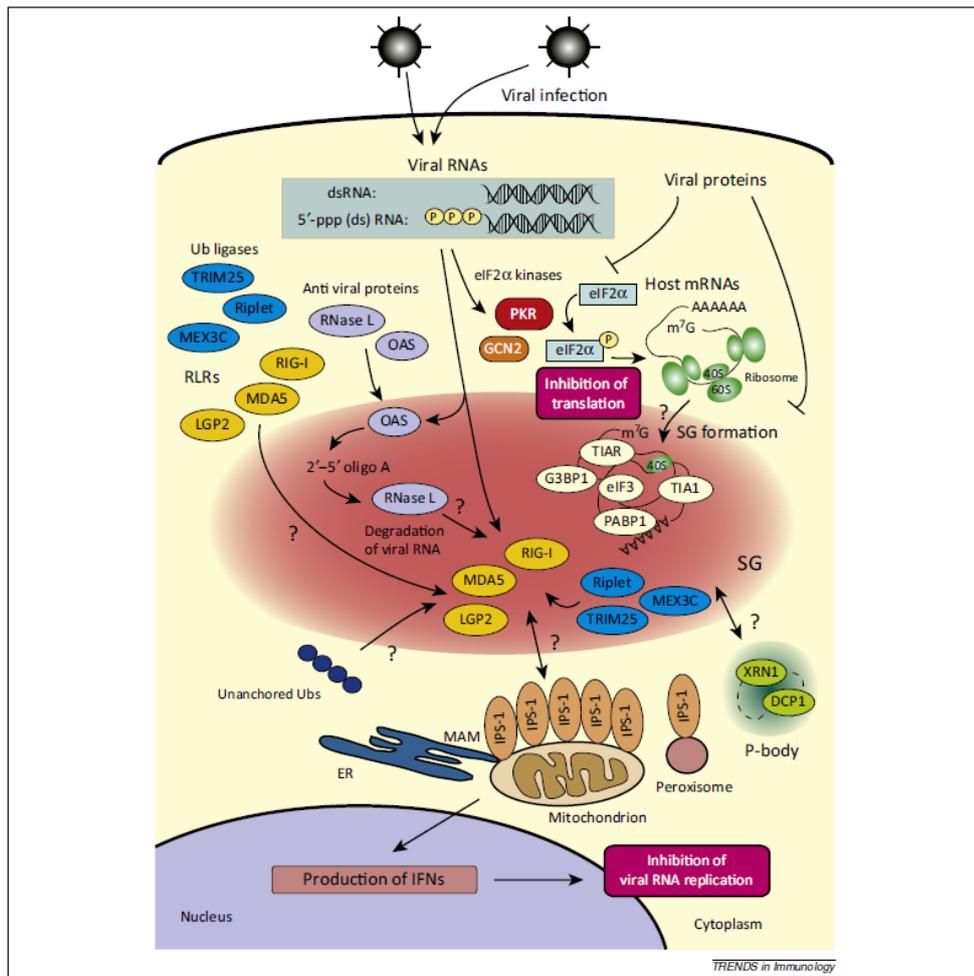


Abbildung 10: Die antivirale Funktionsweise der Stressgranula (Onomoto et al. 2014)

PKR ist ein ubiquitär exprimierte Serin/Threonin Kinase (Williams 1999). Die Bildung von PKR wird durch Interferon induziert und über virale dsRNA, Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Stressstimuli aktiviert (Williams 1999). Durch die Bindung der viralen dsRNA an die regulatorische Domäne der PKR erfolgt eine Autophosphorylierung und Dimerisierung (Dey et al. 2005),

wodurch die Kinase aktiviert und somit EIF2 α phosphorylieren kann. Durch diesen initialen Schritt wird die Proteintranslation inhibiert und die Stressgranula Bildung durch die Virusinfektion induziert (siehe Abb. 10).

Wie die PKR wird auch die Produktion von Oligoadenylatsynthetase (OAS) über Interferone reguliert und durch dsRNA aktiviert. OAS liegt im Zytoplasma als inaktives Monomer vor und aggregiert nach Bindung der dsRNA zu einem Tetramer, wodurch die OAS aktiviert und ATP zu 2`-5`-Oligoadenylat synthetisiert wird. 2`-5`-Oligoadenylat wiederum aktiviert die Ribonuklease L (RNase L), wodurch eine Dimerisierung der RNase L induziert wird. Die aktivierte RNase L spaltet zelluläre wie auch virale dsRNA (Sadler et al. 2008).

Virale Nukleinsäuren werden von verschiedenen zytoplasmatischen Sensoren wie bspw. von den RLRs (retinoic acid inducible gene I (RIG-I)-like receptors) erkannt. Zur Familie der RLRs gehören RIG-I, MDA5 und LGP2. RLRs können zwischen den eigenen und viralen Transkripten unterscheiden und erkennen spezifisch dsRNA mit einem 5`triphosphat Ende (Schlee et al. 2009; Hornung et al. 2006). Durch die Bindung der viralen RNA an die Helikase und an der C-terminale Domäne von den RLRs wird die Konformation der RLRs geändert, sodass die N-terminale CARD-Domäne ubiquitinyliert (Gack et al. 2007) und oligomerisiert (Jiang et al. 2012) werden können. Anschließend können die CARDS von den RLRs an die CARD-Domäne des IPS-1 (interferone- β promotor stimulator 1) Proteins binden (Horner et al. 2011). IPS-1 sind an der mitochondrialen Außenmembran, Peroxisomen oder MAM (Mitochondrien-assoziierte Membran) Regionen des ERs lokalisiert (Belgnaoui et al. 2011; Horner et al. 2011). Durch die Interaktion von RIG/IPS-1 werden Signalmoleküle (TRAFs (tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factors)) rekrutiert, wodurch nachfolgend Transkriptionsfaktoren wie IRF-3, IRF-7 und NF- κ B aktiviert werden (Honda et al. 2006). Diese Transkriptionsfaktoren sind für die Produktion von Type I Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen verantwortlich, die die virale Replikation hemmen (Honda et al. 2006).

2. Zielstellung

Im Fokus der Arbeit sollten Analysen von ausgewählten Faktoren und Mechanismen der HERV-K(HML-2)-Restriktion stehen. Ziel war es zunächst potentielle zelluläre Restriktionsfaktoren auf ihre Aktivität gegen das Virus zu prüfen. In diesem Zusammenhang sollten APOBEC 3G (A3G) sowie Proteine der PYHIN-Familie untersucht werden.

Zunächst sollte die Interaktion von A3G mit dem akzessorischen Protein Rec und dem zellulären Protein Staufen-1 bestätigt werden (Hanke 2010). Diese Interaktion kann durch eine oxidative Stressreaktion mit Ausbildung einer HMM A3G-Granula verstärkt werden (Hanke 2010, Block 2016). Darauf basierend sollte in dieser Arbeit genauer untersucht werden, welchen Einfluss eine ektopische Expression des A3G-Proteins auf die HERV-K(HML-2)-Expression besitzt.

Eine andere Gruppe von Restriktionsfaktoren ist die PYHIN-Proteinfamilie, zu der die IFI16-, AIM2-, MNDA- und IFIX-Proteine gehören. Von der Arbeitsgruppe um Frank Kirchhoff wurde eine HIV-1-Restriktion durch nukleäre PYHIN-Proteine gezeigt (Hotter et al. 2019; Bosso et al. 2020), sodass diese Proteinfamilie auch einen Einfluss auf HERV-K(HML-2) besitzen könnte. Aus vorherigen Untersuchungen der Gruppe am Robert Koch-Institut war zu dem eine Restriktion der HERV-K(HML-2)-Partikelproduktion durch IFI16 bekannt (Zumblick 2019; Savas 2020 & Friedrich 2021). Im Zuge dieser Arbeit sollte deshalb geklärt werden, ob die anderen PYHIN Proteine (AIM2, MNDA und IFIX) ebenfalls die HERV-K(HML-2)-Partikelproduktion reduzieren können. In diesem Falle sollte die Inhibitor genauer charakterisiert werden.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit sollten Untersuchungen zu humanen endogenen Retroviren und Stressgranula Assemblierung bilden. Im Vordergrund soll die Frage der Induktion von Stressgranula durch HERV-K(HML-2)-Expression stehen.

Unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen wie Neoplasien oder Autoimmunerkrankungen können humane endogene Retroviren stark exprimiert werden, sodass eine mögliche Therapie mit antiretroviralen Medika-

menten in Betracht gezogen werden könnte. Dafür soll die Wirkung von nukleosidischen und nukleotidischen reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI & NtRTI), nicht-nukleosidischen reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI), Integraseinhibitoren und Proteaseinhibitoren auf die HERV-K(HML-2)-Infektion untersucht werden.

Diese Promotionsarbeit soll das Verständnis intrazellulärer Restriktionsmechanismen nach einer HERV-K(HML-2)-Reaktivierung erweitern und Möglichkeiten einer therapeutischen Kontrolle der HERV-K(HML-2)-Expression mit antiretroviralen Substanzen aufzeigen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien mit deren Ursprung und Kultivierungsmedium

Zellen	Ursprung	Kultivierungsmedium
786_0	humane epitheliale Nierenkarizomzellen	RPMI + 10 % FKS + 1x Penicillin/Streptomycin
C8166	humane T Zell Leukämiezellen	RPMI + 10 % FKS + 1x Penicillin/Streptomycin
GH	humane Teratokarzinomzellen	DMEM + 10 % FKS + 1x Penicillin/Streptomycin
H9	humane kutane T Lymphozyten aus einem Lymphblasten	RPMI + 10 % FKS + 1x Penicillin/Streptomycin
HEK-293T	humane embryonale Nierenkarzinomzellen	DMEM + 10 % FKS + 1x Penicillin/Streptomycin
HeLa	humane Zervixkarzinomzellen	DMEM + 10 % FKS + 1x Penicillin/Streptomycin
Tera1	humane Teratokarzinomzellen	DMEM + 10 % FKS + 1x Penicillin/Streptomycin

3.1.2 Bakterienstämme

Tabelle 2: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Firma
OneShot® Top10 chemically competent cells	Invitogen

3.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Antikörperliste eingeteilt in primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper	Konzentration	Spezies	Firma
<u>primäre Antikörper</u>			
Anti-A3G	1:50	Kaninchen	Abcam
Anti-CBP	1:500	Kaninchen	Merck Millipore
Anti-EIF2 α	1:100	Maus	Abcam
Anti-Flag	1:1.000	Maus	Sigma-Aldrich
Anti-G3BP	1:150	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Anti-GAPDH	1:5.000	Maus	Sigma-Aldrich
Anti-GAPDH	1:5.000	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Anti-HA	1:1.000	Maus	BioLegend
Anti-p24 (AG3.0)	1:400	Maus	Dr. Stephen Norley, Robert Koch-Institut
Anti-p27 (HERMA-7)	1:50	Maus	Dr. Klaus Boller, PEI
Anti-p27 (VD K140 p5B)	1:400	Kaninchen	Dr. Oliver Hohn, Robert Koch-Institut
Anti-P-EIF2 α (S51)	1:100	Kaninchen	Abcam
Anti-Tubulin	1:5.000	Maus	Sigma-Aldrich
Anti-V5	1:5.000	Maus	Serotec
<u>Sekundäre Antikörper</u>			
Anti-Maus 680 LT	1:5.000	Ziege	Li-Cor
Anti-Kaninchen 680 LT	1:5.000	Ziege	Li-Cor
Anti-Maus 800 CW	1:5.000	Ziege	Li-Cor
Anti-Kaninchen 800 CW	1:5.000	Ziege	Li-Cor
Anti-Maus Alexa 488	1:500	Ziege	Invitrogen
Anti-Kaninchen Alexa	1:500	Ziege	Invitrogen

594

3.1.4 Primer/Sonden

Die lyophilisierten Primer wurden mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt.

Die Primer wurden bei Invitrogen und die Sonden und der ROX-Fluoreszenzfarbstoff wurden bei TIB MOLBIOL bestellt.

Tabelle 4: Primerliste mit deren Sequenzen, eingeteilt in Klonierungsprimern, qPCR- und PERT-Primer

Bezeichnung	Sequenz
<u>Klonierungsprimer</u>	
A3G-HindIII-F	GCG AAG CTT ACC ATG AAG CCT CAC TTC AGA AAC ACA
A3G-HA-EcoRI	CGC GAA TTC TCA AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA GTT TTC CTG ATT CTG GAG AAT GGC CCG
F_A3G_G/S_HA_HindIII	GCG AAG CTT ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GGC GGC TCG GGC AAG CCT CAC TTC AGA AAC ACA
F_A3G_TAP_HA_HindIII	GCG AAG CTT ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GCC CGG GCG GAT CCC CCG GGC TGC AGG AAG CCT CAC TTC AGA AAC ACA
R_A3G_EcoRI	CGC GAA TTC TCA GTT TTC CTG ATT CTG GAG AAT GGC CCG
R_A3G_G/S_HA_EcoRI	CGC GAA TTC TCA AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA GCC CGA GCC GCC GTT TTC CTG ATT CTG GAG AAT GGC CCG
<u>qPCR-Primer</u>	
huA3Gfw_set1 (Exon 5/6)	CAACCAGGCTCCACATAAAC
huA3Grev_set1 (Exon 6)	GGTGAAGCAGGTAACCCTGT
huA3Gfw_set2 (Exon 5)	GAGCGCATGCACAATGAC
huA3Grev_set2 (Exon 6)	GCCTTCAAGGAAACCGTGT
huA3Gfw_set3 (Exon 5/6)	GGCTCCACATAAACACGGTTTC
huA3Grev_set3 (Exon 6)	AAGGGAATCACGTCCAGGAA
huA3Gfw_set4 (Exon 2)	CCATCCTTTCTCGTCGGAATAC

huA3Grev_set4 (Exon 2/3)	AATACACCTGGCCTCGAAAG
huA3Gfw_set5 (Exon 2)	ACACAGTGGAGCGAATGTATC
huA3Grev_set5 (Exon 2)	CCTTGAGGGACCCCTTTGTTT
hGAPDH-66F (Urisman et al. 2006)	GAAGGTGAAGGTCCGGAGTC
hGAPDH-291R (Urisman et al. 2006)	GAAGATGGTGATGGGATTC
HERV_pFor	CCAACGTGGAGGCTTTTCTCTAG
HERV_pVL_Rev1	ATCACCTAGCTTCTTCCGA
GAPDH-44-45_For (Behrendt et al. 2009)	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC
GAPDH-44-45-Rev (Behrendt et al. 2009)	TGGTCCACACCCATGACGA
HERV_Probe (FAM)	6FAM- AGGTACGCTCGAGCGTGGTCATTGAGG- BBQ
GAPDH-44-45 Probe (HEX)	CTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGG
<u>PERT-Primer</u>	
MS2-PERT Probe (FAM) (Horie et al. 2010)	6FAM-TCTTTAGCGAGACGCTACCATGGCTA- BHQ1
Horie2010_PERT-For (Pizzato et al. 2009)	TCC TGC TCA ACT TCC TGT CGA G
Horie2010_PERT-Rev (Pizaato et al. 2009)	CAC AGG TCA AAC CTC CTA GGA ATG
MS2 RNA Template	Sigma Aldrich

3.1.5 Konstrukte

Tabelle 5: Konstrukte

Konstrukte/Plasmide	Beschreibung	Referenzen
HERV-K _{CON} GPP	HERV-K Molekularklon; kodiert virale Strukturproteine und Enzyme, die für die Partikelbildung entscheidend sind	Zennou et al. 2004 zur Verfügung gestellt von Herrn Paul Bieniasz von der Rockefeller Universität
HERV-K _{CON} GFP	HERV-K Molekularklon;	Lee et al. 2007

	kodiert die virale HERV-K113 RNA und besitzt ein CMV-Promotor getriebenes GFP Reporter gen in der Env Region	zur Verfügung gestellt von Herrn Paul Bieniasz von der Rockefeller Universität
pBSK-CMV-oriST-HERV-K113	oriST HERV-K113 Molekular klon mit einem CMV Promotor in der 5`LTR anstelle der U3 Region	Lausch 2013
pBSK-ori-HERV-K113	HERV-K113 Molekular klon mit Rückmutation der nicht synonymen Mutation	Chudak et al. 2013
pBSK-oriST-HERV-K113	HERV-K113 Molekular klon mit Rückmutation der nicht synonymen und synonymen Mutationen	Lausch 2013
pBud-Rec-V5	Rec Expressionsplasmid	Hanke et al. 2013a & b
pcDNA6	Kontrollplasmid (Leervektor)	Invitrogen
pcDNA-A3G	A3G Expressionsplasmid	Adriana Block (im Rahmen dieser Arbeit konstruiert)
pcDNA-A3G-C-G/S-HA	A3G Expressionsplasmid mit einem Glycin/Serin-Linker und HA-Tag C-terminal	Adriana Block (im Rahmen dieser Arbeit konstruiert)
pcDNA-A3G-HA	A3G Expressionsplasmid mit einem C-terminalen HA-Tag	Adriana Block (im Rahmen dieser Arbeit konstruiert)
pcDNA-A3G-N-G/S-HA	A3G Expressionsplasmid mit einem Glycin/Serin-Linker und HA-Tag N-terminal	Adriana Block (im Rahmen dieser Arbeit konstruiert)
pcDNA-A3G-N-NTAP-HA	A3G Expressionsplasmid mit einem NTAP-Linker und HA-Tag N-terminal	Adriana Block (im Rahmen dieser Arbeit konstruiert)

pCMV-Rev	Rev Expressionsplasmid	Addgene
pCMV-Staufen1-Flag	Staufen Expressionsplasmid	Hanke et al. 2013 b
pCMV-VSV-G	Glykoprotein des Vesicular stomatitis virus (VSV)	Addgene
pGL3-Promoter	Luciferase-Expressionsplasmid mit einem SV40 Promotor	Promega
pMAX-GFP	Expressionsplasmid für GFP	Lonza
pNTAP-A3G	A3G Expressionsplasmid mit einer N-terminalen Calmodulin- (CBP) oder Streptavidin-bindende-Domäne (SBP)	Block 2016
psPAX2	Lentiviraler Verpackungsvektor	Addgene
pWPXL-GFP	Lentiviraler Transfervektor mit einem GFP Reporter-gene	Addgene
MB3	Kontrollplasmid (Leervektor)	Hotter et al. 2019; Dr. Frank Kirchhoff (Universität Ulm)
MB6	AIM2 Expressionsplasmid	Hotter et al. 2019; Dr. Frank Kirchhoff (Universität Ulm)
MB7	MNDA Expressionsplasmid	Bosso et al. 2020; Dr. Frank Kirchhoff (Universität Ulm)
MB8	IFIX Expressionsplasmid	Bosso et al. 2020; Dr. Frank Kirchhoff (Universität Ulm)
MB15	Expressionsplasmid für AIM2 Pyrindomäne und Linkerbereich	Bosso et al. 2020; Dr. Frank Kirchhoff (Universität Ulm)
MB17	Expressionsplasmid für	Bosso et al. 2020;

	MNDA Pyrindomäne und Linkerbereich	Dr. Frank Kirchhoff (Universität Ulm)
MB19	Expressionsplasmid für IFIX Pyrindomäne und Linkerbereich	Bosso et al. 2020; Dr. Frank Kirchhoff (Universität Ulm)

3.1.6 Puffer und Nährmedien

Tabelle 6: Puffer und deren Zusammensetzung

Puffer	
1x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2
2 % PFA	2 % Paraformaldehyd in PBS
2% BSA	2 % Bovine Serumalbumin in PBS
2x HBS	5 M NaCl, 0,5 mM HEPES, 0,15 M Na ₂ HPO ₄
2x PERT-Lysispuffer	0,25 % Triton X-100, 50 mM KCL, 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 40 % Glycerol
6x DNA-Probenpuffer	10 mM Tris-Acetat, 50 mM EDTA, 10 % Ficoll-400 (w/v) (Serva), 0,4 % Orange-G (w/v) (Sigma) in H ₂ O
6x Proteinladepuffer	6 % SDS, 30 % Glycerol, 33 µM β-Mercaptoethanol, 0,1 M Tris-HCL (pH 7,4) mit einer Spatelspitze Bromphenolblau
Einbettmedium	20 g Mowiol, 80 mL PBS, 40 mL Glycin
Einfriermedium	FBS + 10 % DMSO
Laufpuffer	25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM Glycin, 1 % SDS
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/l Agar
LB-Medium	1 % Bacto Hefe Extrakt; 1 % NaCl, pH 7,0
NP-40 Lysepuffer	50 mM HEPES, 150 mM KCL, 2 mM EDTA, 0,5 % NP-40
PBS	0,01 M NaH ₂ PO ₄ , 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl in aq. dest., pH 7,2
PBST	0,1 % Tween in PBS
Transferpuffer	25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM Glycin, 20 % Methanol
Tris-Glycin-Puffer	25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM Glycin

3.1.7 Kits

Tabelle 7: Kits

Kit	Firma
Ambion DNase I (RNase-free)	Invitrogen
Turbo DNA-free Kit	Thermo Fisher Scientific
CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT)	Promega
HS-Mg RT Acitivity Kit	Cavidi
Luciferase Assay System + 5x passive Lysepuffer	Promega
Pierce BCA protein assay	Thermo Fisher Scientific
Qiagen Plasmid Maxi Kits	Qiagen
QIAquick PCR purification Kit	Qiagen
QIAre Spin Miniprep Kit	Qiagen
QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis	Thermo Fisher Scientific
RNeasy Kit	Qiagen
HS-Mg RT activity Kit	Cavidi
Lipofectamine 3000 Transfection Kit	Thermo Fisher Scientific

3.1.8 Chemikalien, Enzyme, Größenstandards

Tabelle 8: Chemikalien, Enzyme, Größenstandards

Chemikalie	Firma
100x Penicillin/Streptomycin	Biochrome AG
2',3'-Dideoxycytidin (ddC)	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Roth
3'-Azido-3'-deoxythymidin (AZT)	Sigma-Aldrich
4x Proteinladepuffer	Li-Cor
Adel (fast digest enzym)	Thermo Fisher Scientific
Agarose	Carl Roth GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH
Ampicillin	Carl Roth GmbH
Amprenavir	Sigma-Aldrich

BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	Thermo Fisher Scientific
Brilliant II QPCR Master Mix	Agilent Technologies
SensiFAST Probe No-Rox Kit	Bioline
VeriQuest qPCR SYBR Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific
BSA	Roche
Buffer für Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific; New England Biolabs
Darunavir	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DnaseI	Thermo Fisher Scientific
dNTP's	Fermentas International Inc.
EcoRI (fast digest enzym)	Thermo Fisher Scientific
EDTA	Serva
Elvitegravir	Santa-Cruz
Emtricitabin	Sigma-Aldrich
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethidumbromid	Roche Diagnostics GmbH
Etravirin	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum	Biochrome AG
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Generuler 1kb Ladder	Thermo Fisher Scientific
HindIII (fast digest enzym)	Thermo Fisher Scientific
Indinavir sulfate salt hydrate	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Kanamycin	Carl Roth GmbH
Lamivudin	Sigma-Aldrich
Lopinavir	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Carl Roth GmbH
Mlul	New England Biolabs
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich
Natriumarsenit	Sigma Aldrich
Nevirapin	Sigma-Aldrich
Nonidet P40	PanReac AppliChem
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Passive Lysis Buffer 5x	Promega
Pfu-DNA-Polymerase/- Puffer	Thermo Fisher Scientific
Polybren [1 mg/µl]	Sigma Aldrich
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences
Protease-Inhibitor (Tabletten)	Roche Diagnostics GmbH
PstI	Thermo Fisher Scientific
PvuII	Thermo Fisher Scientific
Raltegravir	Santa-Cruz
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid 30 %)	Carl Roth GmbH
SacI	Thermo Fisher Scientific
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich
Sucrose	Sigma Aldrich Chemie GmbH
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific
TEMED	Sigma Aldrich
Tenofoviridisproxilfumarat	Sigma-Aldrich
Tris-HCl 0,5 M	Sigma Aldrich
Tris-HCl 1,5 M	Sigma Aldrich
Triton X-100	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA	Thermo Fisher Scientific
Tween 20	Sigma Aldrich
XbaI	New England Biolabs
XhoI (fast digest enzym)	Thermo Fisher Scientific
Zeocin	Invitrogen Cooperation

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur-Technik

3.2.1.1 Zellkultivierung

Die eingefrorenen Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden in 10 mL Kulturmedium, bestehend aus DMEM oder RPMI mit 10 % FKS und 1x Penicillin/Streptomycin, aufgenommen und bei Raumtemperatur für 5 min bei 300 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 10 mL Kulturmedium resuspendiert und in T75 cm² Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank mit folgenden Bedingungen: 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit.

Bei den adhärennten Zellen wurde das verbrauchte Kulturmedium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit 10 mL PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen durch die Zugabe der Trypsin/EDTA Lösung. Durch die Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die enzymatische Wirkung des Trypsins aufgehoben und die Zellen wurden für 5 min bei 300 xg pelletiert. Anschließend wurde das überschüssige Medium dekantiert und das Zellpellet in 10 mL Kulturmedium aufgenommen.

Die Suspensionszellen wurden mit dem Kulturmedium abgenommen und bei Raumtemperatur für 5 min bei 300 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 10 mL Kulturmedium resuspendiert.

Die Zellzahl wurde entweder manuell über eine Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH) oder automatisiert über den Beckman Coulter bestimmt und auf eine bestimmte Zellzahl in Abhängigkeit der verwendeten Kultivierungsgefäße und Zelllinie eingestellt und ausgesät (siehe Tab. 9). Die unterschiedlichen Zellzahlen für die 293T und HeLa/786_0 Zellen wurden nach der Verdopplungszeit der Zellen (Wachstumsgeschwindigkeit) bestimmt.

Tabelle 9: eingesetzte Zellzahlen

Kultivierungsgefäß	Zellzahl	
	293T	HeLa/786_0
96-Well-Platte	2,5x10 ⁴ Zellen	1,25x10 ⁴ Zellen
48-Well-Platte	5x10 ⁵ Zellen	2,5x10 ⁴ Zellen
12-Well-Platte	2,5x10 ⁵ Zellen	1,25x10 ⁵ Zellen
6-Well-Platte	5x10 ⁵ Zellen	2,5 x10 ⁵ Zellen
10 cm Zellkulturschale	4x10 ⁶ Zellen	
15 cm Zellkulturschale	8x10 ⁶ Zellen	

Zur Aufbewahrung der Zellen wurde das Zellpellet in Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C für mindestens 24 h eingefroren. Anschließend wurden die Aliquote für die weitere Lagerung in den Stickstofftank überführt.

3.2.1.2 Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode, um Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode, die lipidvermittelte Transfektion mit Lipofektamin und die polymervermittelte Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) angewendet.

3.2.1.2.1 Calciumphosphat-Kopräzipitation

Bei der Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode wurde eine DNA-Calciumchlorid-Lösung mit den enthaltenen Einsatzkonzentrationen der Plasmide hergestellt und auf eine phosphathaltige Lösung (2xHBS) unter vortexen getropft (Ansatz siehe Tab. 10). Dabei fallen Calciumphosphatkomplexe, die DNA Präzipitate enthalten, aus. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung auf die Zellen pipettiert, wobei sich die Komplexe auf den Zellen anlagerten und über Endozytose aufgenommen wurden. Abschließend wurde nach einer Inkubationszeit von 6–8 Stunden im Brutschrank das Kulturmedium ausgetauscht und bis zur weiteren Bearbeitung im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 10: Pipettierschema für die Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode

	DNA-Konzentration	2,5 M CaCl ₂	2xHBS
15 cm Zellkulturschale	48 µg in 900 µl dH ₂ O	100 µl	1 mL

3.2.1.2.2 Transfektion mit Lipofektamin

Lipofektamin bestehen aus positiv geladenen Lipidmolekülen, welche in wässriger Umgebung kationische Liposomen bilden. Diese Liposomen sind in der Lage, die negativ geladene DNA zu komplexieren, sich an die Zelloberfläche anzulagern, und über eine Fusion die DNA ins Zytoplasma der Zielzelle zu transportieren.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben von Thermo Fisher Scientific.

3.2.1.2.3 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Die polymervermittelte Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) wurde hauptsächlich für die Herstellung von viralen Partikeln angewendet. Polyethylenimin ist eine kationische Substanz, die mit der negativ geladenen DNA zu Komplexen kondensiert, welche an der Zelloberfläche bindet und über Endozytose aufgenommen wird.

In eine bestimmte DMEM-Menge (ohne FKS und Penicillin/Streptomycin) wurde eine spezifische Plasmidkonzentration hinzugefügt (siehe Tab. 11). Anschließend wurde PEI im Verhältnis von 1:3 zur DNA-Konzentration in die DNA-Plasmid-Lösung hinzugegeben, gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Kulturmedien von den Kultivierungsgefäßen ausgetauscht. Nach erfolgter Inkubation wurde die Transfektionslösung vorsichtig zu den Zellen pipettiert und die Kultivierungsgefäße im Brutschrank für 6-8 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte ein Austausch der Kulturmedien und die Kultivierungsgefäße wurden bis zur weiteren Bearbeitung im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 11: Pipettierschema für die PEI-Transfektion

	DMEM	Plasmid-Konzentration	PEI (Stock: 2,5 µg/µl)
6-Well-Platte	200 µl	3 µg	3,6 µl
10 cm Zellkulturschale	1 mL	8 µg	9,6 µl
15 cm Zellkulturschale	2 mL	12 µg	14,4 µl

3.2.1.2.4 Ansatz Tabellen für die Virusproduktionen

In den nachfolgenden Tabellen befinden sich die Einsatzkonzentrationen in Prozent für die Herstellung von infektiösen pseudotypisierten viralen HERV-K(HML-2)- und HIV-1-GFP-Reporterviren (siehe Tab. 12 & 13). HERV-K_{CON}-Viren sind rekonstituierte infektiöse virale HERV-K(HML-2)-Partikel (Lee et al. 2007). Für die Herstellung von Reporterviren wurde VSV-G als Hüllprotein verwendet. VSV-G ist das Glykoprotein des vesikulären Stomatitis-Virus, welches die Bindung des Virus an die Wirtszellmembran induziert (Okimoto et al. 2001).

Tabelle 12: Einsatzkonzentration [%] für die Herstellung von viralen HERV-K(HML-2) Partikeln

Plasmide	Prozentualer Anteil
HERV-K _{CON} GFP	50 %
HERV-K _{CON} GPP	30 %
pCMV-Rev	10 %
pCMV-VSV-G	10 %

Tabelle 13: Einsatzkonzentration [%] für die Herstellung von viralen HIV-1 Partikeln

Plasmide	Prozentualer Anteil
pWPXL	50%
psPAX2	37,5%
pCMV-VSV-G	12,5%

3.2.1.2.5 Ansatz tabelle für die HERV-K(HML-2) Restriktionsanalysen

In dieser Arbeit wurden HERV-K(HML-2)-Restriktionsanalysen mit A3G und verschiedene PYHIN-Proteine (AIM2, IFIX und MNDA) durchgeführt. Die

Einsatzkonzentrationen für diese Restriktionsexperimente können aus den folgenden Tabellen 14 & 15 entnommen werden.

Tabelle 14: Einsatzkonzentration für die Restriktionsexperimente mit A3G-Proteinen

Plasmide	Prozentualer Anteil
pBSK oriHERV-K113	50%
A3G-Konstrukte/ Kontrollplasmide	20 %
pBud-Rec	20%
pCMV-Staufen	10%

Tabelle 15: Einsatzkonzentration für die Restriktionsexperimente mit PYHIN-Proteinen

Plasmide	Prozentualer Anteil
pBSK oriST HERV-K113 oder pBSK CMV oriST HERV-K113	40%
PYHIN-Proteine/ Kontrollplasmide	50%
pCMV-Staufen	10%

3.2.1.3 Infektion

Für die Inhibierungsexperimente von HERV-K(HML-2)-Infektion durch antiretrovirale Wirkstoffe wurden Zellen in einer 48-Well-Platte ausgesät und durch die Zugabe von unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen wurden Inhibierungskurven durch die Messung von GFP positive Zellen über die Durchflusszytometrie bestimmt. Die Infektion der Zellen (293T, HeLa, 786_0) erfolgte durch die Zugabe der Viren mit Polybrene in einer Konzentration von 8 µg/mL. Polybrene neutralisierte die Abstoßung zwischen den Viren und der Zelloberfläche, wodurch die Effizienz der Infektion erhöht wurde (Davis et al. 2002). Nach einer Inkubation von 2 Stunden im Brutschrank wurde das Kulturmedium ausgetauscht und neues Kulturmedium mit den unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen hinzugegeben. Danach erfolgte eine 72-stündige Inkubation im Brutschrank.

Bei den Proteaseinhibitoren waren die unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen während der Herstellung der HIV-1- und HERV-K_{CON}-Viren vorhanden

und nach erfolgter Aufkonzentrierung der viralen Überstände wurden die 293T Zellen infiziert.

3.2.1.4 Präparation von Zellen und Zellüberständen

Die Aufkonzentrierung von Virusüberständen kann einerseits per Ultrazentrifugation unter der Verwendung der Beckman Optima-L100K Ultrazentrifuge erfolgen. Dafür wurden die virushaltigen Überstände bei 300 xg für 5 min zentrifugiert, um die enthaltenen Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand durch einen 0,45 µm Sterilfilter filtriert und auf einen 20%igen Sucrosekissen geschichtet mit einer nachfolgenden dreistündigen Zentrifugation bei 30.000 xg und 4 °C. Der Überstand wurde dekantiert und das Viruspellet in PBS oder DMEM (+ FKS & Penicillin/ Streptomycin) resuspendiert.

Andererseits können die Viren über eine Tischzentrifuge pelletiert werden. Dafür wurden die Virusüberstände bspw. von einer 6-Well-Platte in Eppendorf-Tubs überführt, für 5 min bei 300 xg zellfrei zentrifugiert und die Überstand in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Die enthaltenen Viren wurden durch eine dreistündige Zentrifugation bei 15.000 xg und 4°C in der Micro 200 R Zentrifuge von Hettich pelletiert. Das Viruspellet wurde in PBS resuspendiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Für die Vorbereitung der Zelllyse wurden die Mediumsüberstände entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zelllyse durch die Zugabe des NP-40 Lysepuffers. Danach wurden die Zellen mittels eines Zellschabers von der Zellkulturoberfläche abgeschabt und in einen Eppendorf-Tube überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis und einer 10-minütigen Zentrifugation bei 16 000 xg entstand ein zellfreies Lysat, welches in ein neues Eppendorf-Tube überführt wurde. Durch die Zugabe des 6-fachen oder 4-fachen Proteinladepuffers plus Aufkochen des Lysates auf 95 °C für 5 min wurden die Lysate für die Proteingelelektrophorese vorbereitet. Anschließend wurden die Lysate bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Für die Analyse der GFP positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und anschließend mit einer

Trypsin/EDTA-Lösung vom Zellkulturboden abgelöst. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch das Kulturmedium. Anschließend erfolgten zwei Zentrifugationsschritte bei 300 xg für 5 min. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 2 %igem PFA aufgenommen und fixiert. Die fixierten Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und im Kühlschrank gelagert.

Für die Stimulierung einer Stressgranula wurden 0,5 mM Natriumarsenitlösung zu den Zellen gegeben und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Dafür wurde eine 0,05 M Natriumarsenit-Stocklösung mit Kulturmedium auf 0,5 mM verdünnt. Anschließend wurde frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben und weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung oder die Aufarbeitung der Zellen für den Western-Blot.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die HeLa Zellen auf Deckgläschen kultiviert und transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 % PFA für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS (3x) für je 10 Minuten. Die fixierten Zellen wurden im Kühlschrank bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

3.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion erfolgte eine *in vitro* Vervielfältigung von vollständigen DNA-Fragmenten oder Abschnitten. Eine PCR-Reaktion wird in drei verschiedene Phasen (Denaturierung, Primer-Bindung (Annealing) und Elongation) eingeteilt. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA aufgetrennt, bei der Elongation erfolgt die Bindung der Primer an die spezifische Sequenz des DNA-Stranges und bei der Elongation erfolgt die Synthese des komplementären Stranges mithilfe einer thermostabilen Polymerase.

3.2.2.1.1 Amplifikations-PCR

Die Pfu-DNA-Polymerase wurde auf Grund ihrer Korrekturesefunktion für die Amplifizierung von A3G mit den verschiedenen A3G-F-EcoRI- und A3G-R-HindIII-Primern verwendet (siehe Tab. 16). Für die weitere Bearbeitung der

Sequenz wurden Restriktionsschnittstellen angehängen. Die Temperatur für die Primer-Bindung wurde anhand des Purin-Pyrimidin-Gehaltes mittels folgender Formel: $4 \cdot \sum G/C + 2 \cdot \sum A/T - 5$ bestimmt und die Elongationszeit an die amplifizierende Sequenz angepasst (Cycler-Programm siehe Tab. 17).

Tabelle 16: Ansatz für die PCR mit der Pfu-DNA-Polymerase

PCR-Ansatz	eingesetztes Volumen/ Konzentrationen
Pfu-Polymerase-Puffer	5 µl
2,5 mM dNTPs	4 µl
forward/reverse Primer (10 µM)	je 2 µl
Template-DNA	x µl (5-10 ng)
Pfu-Polymerase (Roche Diagnostik)	1 µl
A. bidest	ad. 50 µl

Tabelle 17: Cycler-Programm Pfu-DNA-Polymerase

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Schritt
1	95	2:00	Denaturierung
30	95	0:45	Denaturierung
	56	0:05	Primer-Bindung
	72	3:00	Elongation
1	72-74	5:00	Finale Elongation
	4	∞	Lagerung

3.2.2.1.2 Sequenzierungs-PCR

Für die DNA-Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet. Der Sequenzierungsansatz erfolgte nach einem festgelegten Pipettierschema des Robert Koch-Instituts (siehe Tab. 18). Im Big Dye Premix sind die AmpliTaq DNA-Polymerase, die dNTPs und fluoreszierende 2`3`-Dideoxy-nukleosidtriphosphat-Mix (ddNTPs) enthalten.

Tabelle 18: Pipettierschema für den Sequenzierungsansatz

Sequenzierungsbestandteile	eingesetztes Volumen
Plasmid-DNA	x µl (150-300 ng)
Primer	je 0,5 µl
Big Dye Premix	1 µl
5xABI-Puffer	1,5 µl
A. bidest	ad. 10 µl

Die Sequenzierungsansätze wurden in dem PCR-Cycler von der Firma Bio-Rad überführt und durchläuft folgendes Programm:

Tabelle 19: Cycler-Programm für die Sequenzierungs-PCR

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Schritt
1	96	2:00	Denaturierung
25	96	0:10	Denaturierung
	56	0:05	Primer-Bindung
	60	4:00	Elongation
4	4	∞	Lagerung

Im Sequenzierungslabor des Robert Koch-Instituts erfolgte die Sequenzanalyse. Die Sequenzen wurden mithilfe des Computerprogramms Geneious ausgewertet.

3.2.2.1.3 qPCR

Für die **A3G qPCR** wurde keine Sonde verwendet, sondern die Menge an doppelsträngiger DNA wurde mittels SYBR Green nachgewiesen (Ansatz siehe Tab. 20). SYBR Green bindet an doppelsträngiger DNA und wird bei 498 nm angeregt und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 522 nm, die im Cycler gemessen werden kann. Über die Herstellung einer A3G Standardreihe konnten die Kopienanzahl/µl bestimmt werden.

Tabelle 20: Pipettierschema für qPCR ohne Sonde

Bestandteile	Eingesetztes Volumen
2xVeriQuest qPCR SYBR Green Master Mix	10 µl
Forward/reverse Primer (10 µM)	je 1 µl
Template	4 µl
dH ₂ O	4 µl

Die qPCR Ansätze wurden im PCR Cycler MX300 von der Firma Stratagene überführt und durchläuft folgendes Programm:

Tabelle 21: Cycler-Programm für qPCR ohne Sonde

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Schritt
1	50	2:00	UDG Behandlung
1	95	10:00	Aktivierung Taq DNA Polymerase und UDG Inaktivierung
	95	0:15	Denaturierung
45	60	1:00	Primer-Bindung und Elongation

3.2.21.4 Duplex-qPCR

Der Nachweis der intrazellulären **HERV RNA** erfolgte mittels Duplex qPCR, wobei einerseits die HERV RNA und als Ladekontrolle die GAPDH RNA nachgewiesen wurde. Der Nachweis der PCR Fragmente erfolgte mittels zwei verschiedener Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe (FAM & HEX), die bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt und gemessen wurden (siehe Tab. 22).

Tabelle 22: Pipettierschema Duplex-qPCR

Bestandteile	Eingesetztes Volumen
Brilliant qPCR Master Mix (2x)	12,5 µl
HERV_pFor (10 µM)	1,25 µl
HERV_pVL_Rev (10 µM]	1,25 µl
HERV Sonde FAM (10 µM)	0,5 µl
GAPDH44-45_For (10 µM)	1,25 µl
GAPDH44-45_Rev (10 µM)	1,25 µl
GAPDH44-45 Sonde Hex (10 µl)	0,5 µl
dH ₂ O	1,5 µl
Template	5 µl

Die qPCR Ansätze wurden im PCR Cycler MX300 von der Firma Stratagene überführt und durchläuft folgendes Programm:

Tabelle 23: Cycler-Programm für Duplex-qPCR

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Schritt
1	95	10:00	Denaturierung
45	95	0:30	Denaturierung
	54	1:00	Primer-Bindung
	72	0:30	Elongation

3.2.2.2 Restriktionsansätze mit Endonukleasen

Die bakteriellen Endonukleasen erkennen spezifisch palindromische Sequenzen und schneiden die eingesetzten Plasmide an dieser Stelle, wodurch 5'-, 3'-Überhänge oder glatte Überhänge entstehen. Die Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben verwendet und wie folgt pipettiert:

Tabelle 24: Restriktionsansatz mit Endonukleasen

Restriktionsbestandteilen	eingesetztes Volumen
Vektor/Insert	x µl
Restriktionsenzym	je 1 µl
10xRestriktionspuffer	2 µl
A. bidest	ad. 20 µl

Die Inkubationszeit von 15 min bis 60 min bei 37 °C richtete sich nach den verwendeten Restriktionsenzymen.

3.2.2.3 DNA-Agarosegelelektrophorese und DNA-Gelextraktion

Nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen wurden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im Agarosegel aufgetrennt. Dafür wurde Agarose in 1xTAE-Puffer auf eine Endkonzentration von 1-2 % in Abhängigkeit von den zu erwarteten DNA-Fragmentgrößen eingestellt. Die Agaroselösung wurde bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erhitzt. Anschließend erfolgte das Abkühlen der Lösung auf ca. 40 °C, um Etidiumbromid hinzugeben zu können. Das flüssige Gel wurde in die Gelkammer gegossen, wobei durch das langsame Abkühlen des Gels eine Aushärtung erfolgte. Ethidiumbromid interkalierte in die Doppelhelix der DNA, wodurch die Fragmente unterm UV-Licht sichtbar wurden. Zu jeder Probe wurde 6xDNA-Ladepuffer hinzugegeben und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der „Generuler 1 kb DNA“ Marker oder der „Generuler 100 bp DNA“ Marker von Fermentas. Danach erfolgte die Auftrennung der Fragmente im Agarosegel im 1 %igen TAE-Puffer bei 60-120 V für 45-60 min. Im Anschluss wurde die DNA-Fragmenten mittels UV-Licht sichtbar gemacht, somit konnte ein digitales Bild für die Dokumentation aufgenommen und die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Für die Gelextraktion wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.2.4 Ligation und Transformation

Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, die freie 5`-Phosphat- und 3`-Hydroxylgruppen unter Verbrauch von ATP verknüpft, wodurch eine Phosphordiesterbindung entstand. Diese Methode wurde verwendet, um Insert- und Vektor-Fragmenten nach vorheriger Restriktion mit den gleichen Restriktionsendonukleasen zu ligieren. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes entsprach folgender Tabelle:

Tabelle 25: Ligationsansatz

Ligationsansatz	eingesetztes Volumen/Konzentration
Vektor	80 ng
Insert	Konzentration wird über folgende Formel bestimmt: $\text{ng [Fragment]} = 5 \cdot \text{ng [Vektor]} \cdot \frac{\text{Länge [Insert]}}{\text{Länge [Vektor]}}$
10xT4-DNA-Ligase Puffer	2 μ l
T4-Ligase	0,5 μ l
A. bidest	ad. 20 μ l

Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur und 12 Stunden bei 16 °C erfolgte die chemische Transformation. Dafür wurde der Ligationsansatz zu den chemokompetenten *E. coli* Zellen gegeben und auf Eis für 30 min inkubiert mit einem anschließenden Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C. Danach wurde 250 μ l SOC-Medium zu den *E. coli* Zellen gegeben und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, um die *E. coli* Zellen zu vermehren. Danach wurden die *E. coli* Zellen auf Selektivplatten, bestehend aus LB-Platten mit Antibiotikazusätzen wie Kanamycin, Ampicillin oder Zeocin mit einer Konzentration von 10 mg/ml, ausplattiert.

Auf den Selektivplatten entstanden Kolonien wurden in LB-Medium mit Antibiotikazusätzen in einer Konzentration von 10 mg/mL gegeben und die *E. coli* Zellen wurden über Nacht bei 37 °C vermehrt. Anschließend erfolgte die Plasmidisolierung aus den Bakterienzellen mittels „QIAprep Spin Miniprep Kit“ oder das „Qiagen Plasmid Maxi Kit“, die nach Herstellerangaben verwendet wurden.

Für die Konzentrationsbestimmung von Plasmiden oder DNA-Fragmenten wurde der „Nanodrop-1000“ von Thermo Fisher Scientific verwendet.

3.2.2.5 RNA-Isolierung und cDNA Synthese

Nach den jeweiligen Herstellerangaben wurde die zelluläre RNA aus den Zellen über das RNeasy Kit von Qiagen isoliert. Anschließend erfolgte der DNase Verdau über die Ambion DNase I von Thermo Fisher Scientific und die cDNA Synthese über das Kit von Thermo Fisher Scientific („RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“), wobei die oligo dT Primer verwendet wurden. Alle Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot

Der spezifische Nachweis von Proteinen im Zelllysate oder in den aufkonzentrierten Virusüberständen (Herstellung von Zelllysaten siehe 3.2.1.4) erfolgte über die Western-Blot-Methode. Zuerst mussten die Proteine im SDS-PAGE nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dafür wurde ein 5%iges Sammel- und ein 12%iges Trenngel verwendet (Zusammensetzung siehe Tab. 26). Die Vernetzung von Acrylamid-Monomeren erfolgte durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Die Zelllysate wurden auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und umgeben vom Ladepuffer erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 100 bis 125 V für ca. 1,5 Stunden. Der „Pageruler Prestained Protein“ Marker von Thermo Fisher Scientific wurde als Größenstandard verwendet.

Tabelle 26: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für zwei Gele

Bestandteile	12%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
A. bidest	6,8 ml	5,7 ml
30 % Acrylamid	8 ml	1,7 ml
1,5 M Tris-Lösung	5 ml	
0,5 M Tris-Lösung		2,5 ml
10%iges SDS	200 µl	100 µl
10%iges APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Nach erfolgter Proteingelelektrophorese wurden das SDS-Gel in Transferpuffer äquilibriert und die Proteine mittels eines Semi-Dry-Blotting-Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Nitrocellulosemembran wurde ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. In die Blot-Apparatur wurde ein Sandwich bestehend aus Filterpapier, Nitrocellulosemembran, SDS-Proteingel und Filterpapier gelegt und bei 20 V für 35 min geblottet. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran in 4 %igem Milchpulver in PBST entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. An-

schließlich wurde die Membran in PBST gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe der primären Antikörperlösung. Nach erfolgter Inkubation von 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min mit PBST gewaschen. Dann wurde der Infrarot (IR)-gekoppelter sekundäre Antikörper verdünnt in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen zur Membran gegeben. Nachfolgend wurde die Membran 3-mal für 10 min in PBST gewaschen. Die Detektion des gebundenen IR-Antikörpers erfolgte über das Gerät Odyssey von Li-Cor.

3.2.2.7 Luciferase-Messung

Das Luciferase-Gen diente der Quantifizierung der Luciferase-Aktivität in den Zelllysaten und stammt vom Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Die Luciferase wurde als Reportergen in die Zielzelle transfiziert (siehe 3.2.1.2). Nach einer gewissen Inkubationszeit wurden das Kulturmedium von den Zellen einer 96-Well-Platte entfernt und die Zellen mit 25 µl pro Well eines 1:5 verdünnten passiven Lysepuffers lysiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Zelllysate in PBS aufgenommen und nur eine definierte Menge für die Luciferasemessung genutzt. Das Zelllysate wurde in eine weiße 96-Well-Platte überführt und durch Zugabe von 50 µl Luciferase Assay-Substrat die Lichtemission am Luminometer LUMIstar Omega von der Firma BMG Labtech gemessen. Die Luciferase war in der Lage das Substrat Luciferin durch eine oxidative Decarboxylierung zu Oxyluciferin zu katalysieren, wodurch die Lichtemission ausgelöst wurde (siehe Abb. 11). Die Konzentration an Lichtemission korreliert mit der Menge an exprimierter Luciferase. Die Luciferasemessung wurde angewendet, um zytotoxische Effekte entweder durch die Zugabe von Inhibitoren oder durch die ektopische Proteinexpression zu erkennen.

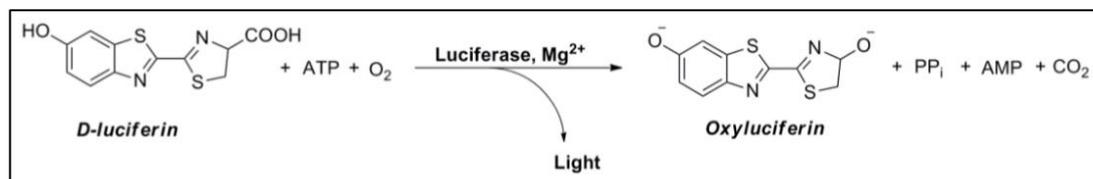


Abbildung 11: Reaktionsprinzip der Luciferasemessung (entnommen aus dem Protokoll von Promega)

3.2.2.8 Durchflusszytometrie

Für die Analyse der Proteinexpression einzelner Zellen wurde die Durchflusszytometrie angewendet. Die Präparation der Proben erfolgte wie in 3.2.1.4 beschrieben. Dabei passiert jede einzelne Zelle einen Laserstrahl, wodurch eine Anregung des Laserstrahls erfolgte und das Licht gestreut und detektiert wurde, somit können bestimmte Eigenschaften der Zelle wie die Form, die Struktur und die Fluoreszenzfärbung bestimmt werden. Nach erfolgter Infektion wurde die Anzahl der GFP positive Zellen über FACS bestimmt und ins prozentuale Verhältnis mit der Konzentration der HERV-K_{CON} infizierten Zellen ohne Inhibitor gesetzt. Insgesamt wurden 20.000 Zellen ausgezählt. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe einer Vorlage, welche durch das Robert Koch-Institut angefertigt wurde.

3.2.2.9 Immunfluoreszenzfärbung (cLSM)

Für die intrazellulären Antigenmarkierungen (Präparation der Proben siehe 3.2.1.4) wurden die Zellen mit 0,5%-igen Triton X-100 permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden mit 2 % BSA für 30 Minuten blockiert. Die primäre wie auch sekundäre Antikörperinkubationen erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter leichter Rotation. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte im Dunklen. Abschließend wurden die Zellen mit Mowiol luftblasenfrei eingebettet. Die Präparate wurden bei 4 °C dunkel gelagert und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (cLSM_780) von Zeiss ausgewertet.

3.2.2.10 Quantifizierung der Virusexpression

Für die Quantifizierung der Virusexpression wurde die Aktivität der reversen Transkriptase in den ultrazentrifugierten Virusüberständen gemessen. Dies erfolgte entweder über den Cavid-Assay oder über den „qPCR-based product-enhanced reverse transcriptase“ (PERT) Assay.

3.2.2.10.1 Cavid-Assay

Das Prinzip des Cavid Assays beruht auf zwei Schritten: 1. die DNA Synthese und 2. die DNA Quantifizierung (siehe Abb. 12). Zum gebundenen RNA Template wurde die Reaktionsreagenz, die die Primer und die Nukleotide (unter anderem auch BrdUTP) enthält, und die Proben hinzugegeben. Die Synthese des DNA Stranges erfolgte durch die reverse Transkriptase, die in den Proben enthalten war. Für die DNA Quantifizierung wurde eine alkalische Phosphatase konjugierter α -BrdU Antikörper verwendet, der an den DNA/RNA Doppelstrang bindet. Anschließend erfolgte eine Substratreaktion der alkalischen Phosphatase, die ein photometrisches Produkt synthetisierte, welches über den ELISA Reader Sunrise von Tecan Group ausgewertet werden konnte.

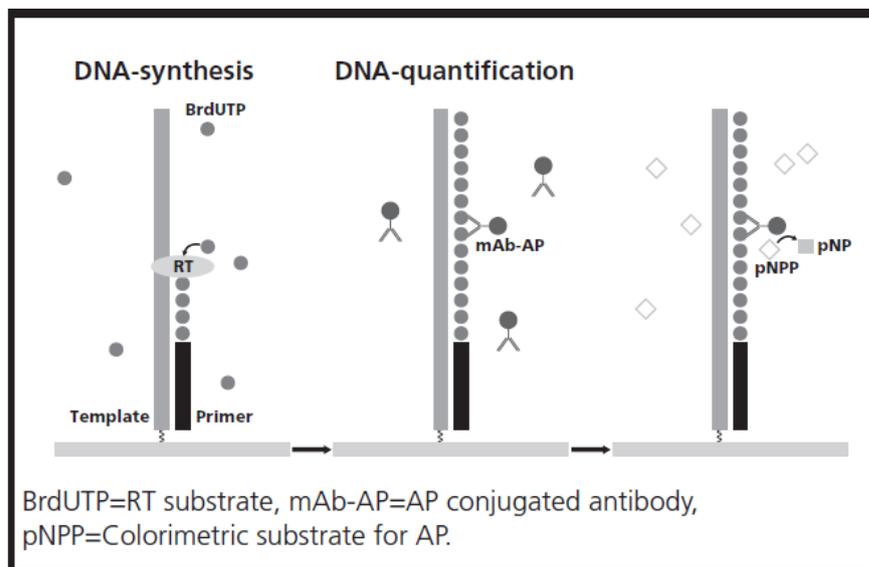


Abbildung 12: Reaktionsprinzip des Cavid Assays (entnommen aus dem Cavid-Protokoll)

Die Durchführung des „HS-Mg RT Activity Kit“ von Cavid erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.2.10.2 PERT-Assay

Das zweite Verfahren für die Quantifizierung der reversen Transkriptase aus den aufkonzentrierten Virusüberständen erfolgte über die „qPCR-based product-enhanced reverse transcriptase“ (PERT) Methode.

Für die Lyse der aufkonzentrierten Virusüberstände wurde RNase Inhibitor zu den 2x PERT-Lysisbuffer im Verhältnis von 1:50 hinzugegeben und davon 5 µl pro Well in eine 96-Well-Platte aliquotiert. Nach erfolgter Zugabe der Probe (5 µl pro Well) und Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur war die vollständige Lyse der Viren abgeschlossen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 90 µl dH₂O abgestoppt. Für die qRT-PCR wurden 9 µl der lysierten Probe und 11 µl Mastermix (siehe Ansatz-tabelle 27) in eine gekühlte PCR-Platte von Bio-Rad pipettiert und im Cyclor (siehe Tab. 28) inkubiert.

Tabelle 27: Reaktionsansatz PERT-Assay

Reagenz	[µl] pro Well
SensiFAST Probe No-Rox Maser Mix	8
RNase Inhibitor 1:10 frisch verdünnt	0,3
Horie2010_PERT-F (10 µM)	1
Horie2010_PERT-F (10 µM)	1
MS2-PERT-Probe FAM (10 µM)	0,5
MS2 RNA Template (0,8 µg/µl)	0,1
RNase-freies Wasser	0,3
Lysierter Virusüberstand	9
Gesamtvolumen pro Well	20

Tabelle 28: Cyclor-Programm PERT-Assay

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

Im Cyclor wurde das Template (in diesem Fall die MS2 RNA vom Bakteriophagen) mithilfe der vorhandenen retroviralen reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR quantifiziert, welche durch die fluoreszenz-markierte Sonde ermöglicht wurde (siehe Abb. 13). Dabei ist die Menge der cDNA direkt proportional zur RT-Aktivität. Zur Quantifizierung

wurde der Standard vom Cavid-Assay mitgeführt und die Auswertung erfolgte am CFX Maestro von der Firma Bio-Rad.

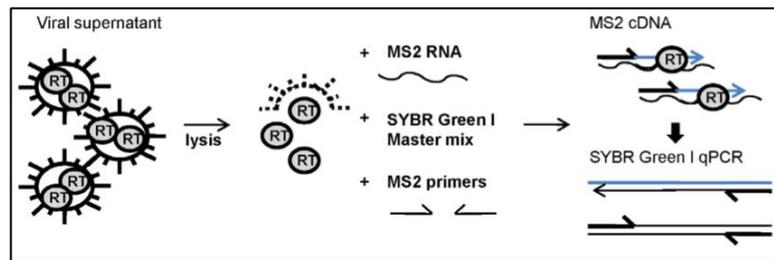


Abbildung 13: Reaktionsprinzip PERT-Assay (Vermeire et al. 2012)

Im Labor wurde anstelle des SYBR Green Master Mix die Sonde MS2-PERT-Probe verwendet (Horie et al. 2010).

4. Ergebnisse

4.1 Restriktionsfaktoren

4.1.1 Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3 G (A3G)

4.1.1.1 GH- und Tera-1-Zelllinien produzieren endogenes A3G/ HERV-K (HML-2) RNA und endogene virale Partikel

Für die Durchführungen der Restriktionsexperimente durch A3G sollte möglichst eine Zelllinie verwendet werden, die entweder kein oder nur geringe Mengen des endogenen A3G Proteins und zusätzlich keine endogene HERV-K(HML-2) RNA-Expression aufweist. Aus vorherigen Experimenten von Frau Thielen und Kolleg*innen ist bekannt, dass die T-Zelllinie H9 endogen A3G und die Zelllinie C8166 kein endogenes A3G Protein exprimieren (Thielen et al. 2007), sodass diese Zelllinien als Positiv- bzw. Negativkontrolle verwendet wurden. Außerdem ist bekannt, dass die Teratokarzinoma Zelllinien (Tera-1 und GH) endogene retrovirale RNA und virale Partikel produzieren können (Ruprecht et al. 2008; Bieda et al. 2001).

Aus den GH, Tera-1, H9, C8166 und 293T Zelllinien wurde die endogene RNA isoliert, die restliche DNA mittels DNase Verdau entfernt und die RNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente als Template für die qPCR für den Nachweis der endogen exprimierten A3G und HERV-K(HML-2) RNA. Die HERV-K(HML-2) qPCR wurde von der Arbeitsgruppe des Robert Koch-Instituts etabliert. In dieser Arbeit erfolgte die Etablierung der qPCR für den Nachweis des endogenen A3G Proteins. Dafür wurden verschiedene Primerpaare konzipiert und die Funktionstüchtigkeit in einer PCR bestätigt, die mittels Agarosegelelektrophorese ausgewertet wurde (siehe Abb. 14 A). Für die A3G qPCR wurde ein Primerset verwendet, in dem die Primer an unterschiedlichen Exons (Vorwärtsprimer: Exon 5; Rückwärtsprimer: Exon 6) bindeten (Primerset 2) (siehe Abb. 14 B).

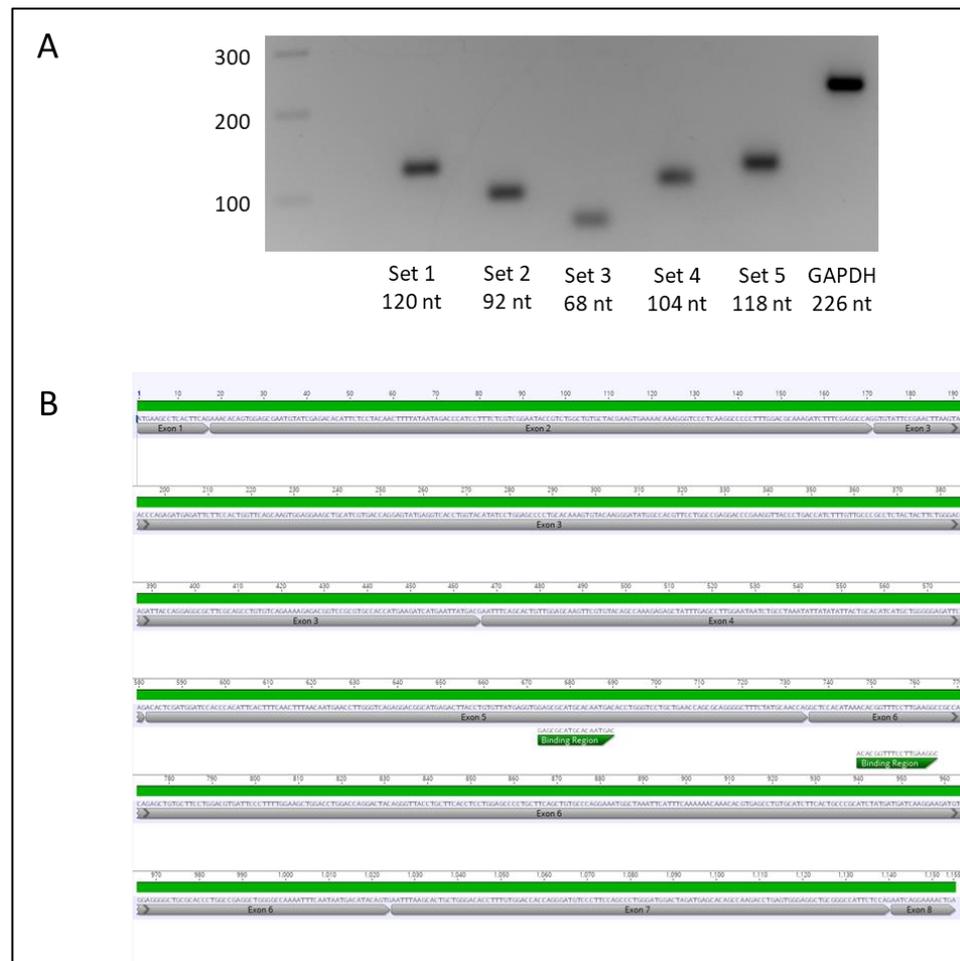


Abbildung 14: Etablierung der A3G qPCR

[A] Auftrennung der PCR-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese; zelluläre RNA aus der H9 Zelllinie wurden isoliert, die restliche DNA mittels DNase Verdau entfernt und in cDNA umgeschrieben; die sechs verschiedenen Primerpaare wurde in einer PCR getestet und die Fragmente aufgetrennt.

[B] Darstellung des verwendeten Primerpaars für die qPCR. Die Primer liegen auf unterschiedlichen Exonfragmenten. Der vorwärtsgerichtete Primer liegt auf dem Exon 5 und der rückwärtsgerichtete Primer auf dem Exon 6.

Eine Expression der endogenen A3G RNA konnte in den H9, Tera-1 und den GH-Zelllinien nachgewiesen werden, wohingegen in den C8166 bzw. 293T Zelllinien keine bzw. nur eine geringfügige Expression der A3G RNA vorhanden war (siehe Abb. 15 A). Daraufhin wurden die Ergebnisse von Frau Thielen und Kolleg*innen, dass die H9 Zelllinien endogen das A3G Protein ex-

primieren und die C8166 Zelllinie nicht (Thielen et al. 2007), und die Zuverlässigkeit der A3G qPCR bestätigt.

Eine Expression der endogenen HERV-K(HML-2) RNA wurde nur in den naiven Tera-1 und GH Zelllinien nachgewiesen (siehe Abb. 15 B). Zusätzlich produzieren diese Zelllinien virale Partikel, sodass die virale RNA in den aufkonzentrierten viralen Überständen detektiert wurde (siehe Abb. 15C).

Für die nachfolgenden Restriktionsexperimente wurde die 293T Zelllinie, die nur eine schwache endogene A3G Proteinexpression und keine endogene HERV-K(HML-2) RNA Expression zeigte, verwendet.

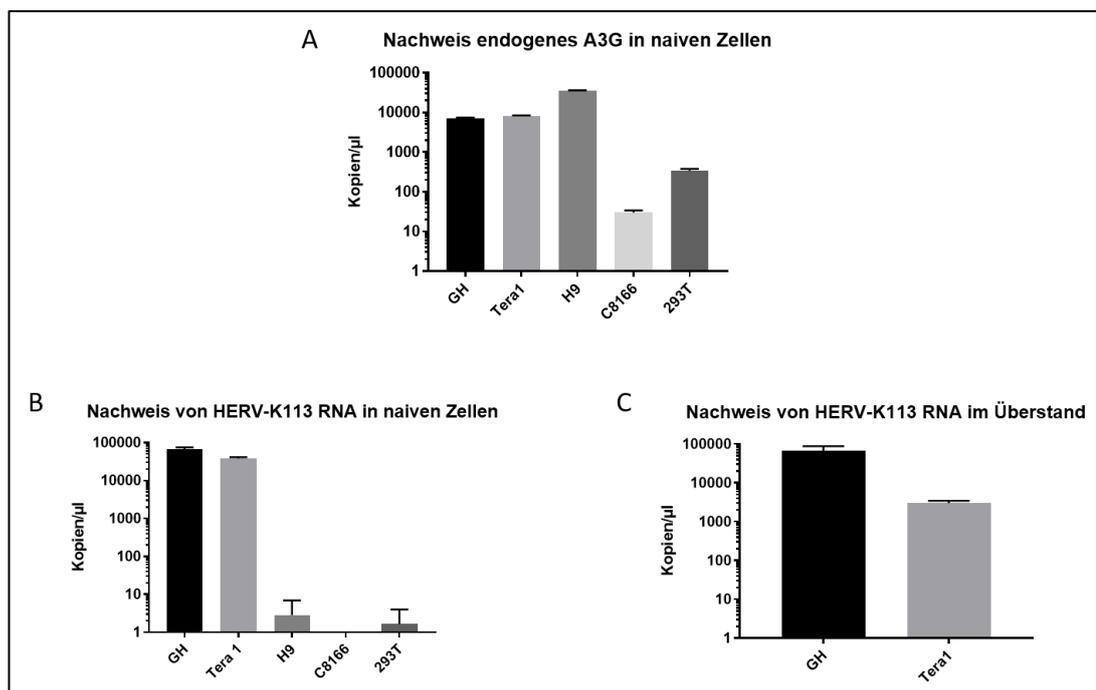


Abbildung 15: Nachweis der endogenen, zellulären A3G und HERV-K(HML-2) RNA bzw. viraler HERV-K(HML-2) RNA im Überstand der GH und Tera-1 Zelllinie.

Für [A] und [B] wurde die endogene virale RNA aus den Zellen isoliert und mittels qPCR wurde die Konzentration der endogenen A3G [A] und HERV-K(HML-2) RNA [B] bestimmt. [C] Nachweis der viralen HERV-K(HML-2) RNA in den aufkonzentrierten viralen Kulturüberständen mittels qRT-PCR.

4.1.1.2 Die ektopische Expression von NTAP-A3G reduziert die HERV-K(HML-2) Viruspartikelproduktion

Für die HERV-K(HML-2) Restriktionsexperimente durch A3G wurden die Einsatzkonzentrationen aus der Tabelle 14 verwendet und die Expression der Proteine wurde in dem Zellysate mittels Western-Blot nachgewiesen. Alle Proben exprimierten in annähernd gleichen Expressionsstärken die Proteine Rec und Staufen (siehe Abb. 16 B). Durch die zusätzliche Transfektion eines Rec und Staufen-1 Konstruktes wurde die Konzentration von Rec und Staufen-1 erhöht und somit die virale Partikelexpression verbessert (Hanke et al. 2013b). Die erste Probe diente als Negativkontrolle für die Virusproduktion, da in dieser Probe kein oriHERV-K113 Plasmid transfiziert wurde, und somit keine Virusexpression erfolgen konnte. Die zweite und dritte Probe diente als Positivkontrollen und enthielten kein A3G-Konstrukt, sondern zwei unterschiedliche Leervektoren, einerseits den pcDNA6 (Probe 2) und andererseits den NTAP Leervektor (Probe 3). Damit wurde geprüft, ob zwischen den jeweiligen Leervektoren ein Unterschied in der Virusexpression besteht. In den Proben 4 bis 6 bzw. 7 bis 9 wurden die zunehmende ektopische NTAP-A3G Proteinexpressionen in den Zellysaten nachgewiesen (siehe Abb. 16 B). Das NTAP-A3G Konstrukt wurde in der Masterarbeit der Autorin hergestellt und diente der Aufreinigung der HMM A3G Granula, die durch eine Stressreaktion mit Natriumarsenit entstanden ist (Block 2016). N-terminal wurde eine Streptavidin- und eine Calmodulin-bindenden Domäne an das A3G Protein angehängt (siehe Abb. A). Der Unterschied zwischen den Proben 4 bis 6 bzw. 7 bis 9 besteht darin, dass in den Proben 4 bis 6 in den Zellen oriHERV-K113 transfiziert und in den Proben 7 bis 9 statt oriHERV-K113 der pcDNA6 Vektor transfiziert wurde, somit konnten nur in den Proben 4 bis 6 HERV-(HML-2) RNA bzw. Proteine exprimiert werden. Diese zwei verschiedenen Probenreihe (4-6 bzw. 7-9) dienten als zusätzliche Kontrollen in Bezug auf einen potentiellen Einfluss von HERV-K(HML-2) auf die Proteinexpression bzw. auf die Zellviabilität. Das oriHERV-K113 Konstrukt wurde von der Arbeitsgruppe des Robert Koch-Institut bereitgestellt, wobei die nicht synonymen Mutationen revertiert wurden (Chudak et al. 2013).

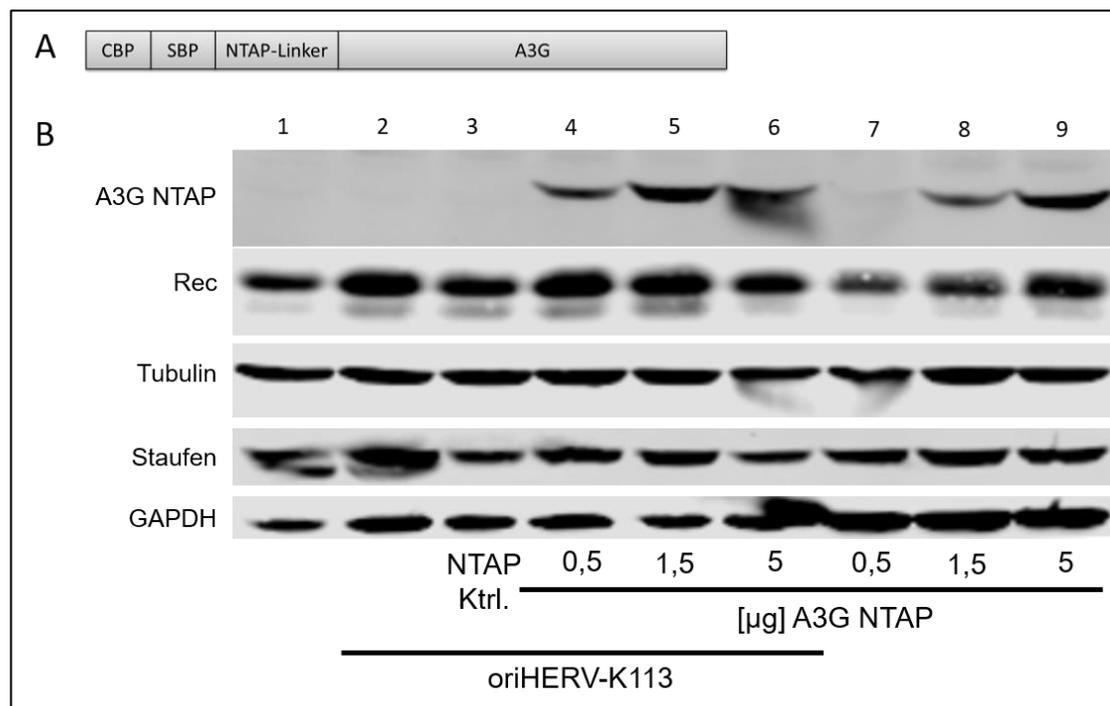


Abbildung 16: Proteinexpression von Rec, Staufen und A3G

[A] Darstellung des pNTAP-A3G Konstrukts

[B] Nachweis von Rec, Staufen und NTAP-A3G mittels Western-Blot. In allen Proben wurde in den 293T Zellen Rec, Staufen und pGL3 Promotor Plasmid und zusätzlich in Probe 2 bis 6 oriHERV-K113 und in Probe 4 bis 6 und 7 bis 9 pNTAP-A3G in unterschiedlichen Konzentrationen hinein transfiziert. A3G wurde über den CBP-Antikörper, Rec über den V5-Antikörper und Staufen über den Flag-Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von Tubulin und GAPDH diente als Ladekontrolle.

Nachfolgend wurde überprüft, ob die HERV-K(HML-2) RNA/Proteine bzw. NTAP-A3G Proteinexpression einen Einfluss auf die zelluläre Proteinexpression bzw. auf die Zellviabilität besitzt. Dafür wurden die 293T Zellen mit der pGL3 Promotor Vektor transfiziert. Der pGL3 Promotor Vektor produzierte ein Firefly Luciferase und enthält einen SV40 Promotor. Durch die Katalyse des Substrates durch die Luciferase entsteht eine Lichtreaktion, die in jeder Probe gemessen wurde. Diese zeigte in allen Proben keine signifikante Veränderung, sodass das NTAP-A3G Protein und die viralen HERV-K(HML-2) Proteine bzw. RNAs keinen Einfluss auf die zelluläre Proteinexpression hatte (siehe Abb. 17 A).

Für die Bestimmung der Restriktion von HERV-K(HML-2) durch das NTAP-A3G Protein wurden die viralen Überstände aufkonzentriert. In den aufkonzentrierten Überständen wurde einerseits die reverse Transkriptase Aktivität in den viralen Partikeln über den Cavid Assay und andererseits die Konzentration des viralen Gag Proteins (p27) im Western-Blot bestimmt. In beiden Methoden konnte mit zunehmender NTAP-A3G Expression eine Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikel im Überstand gemessen werden, wobei eine Reduktion der reversen Transkriptase Aktivität um das ca. 35-fache bestimmt wurde (siehe Abb. 17 B).

In den Proben 2 und 3 wurden zwei unterschiedliche Leervektoren (pcDNA6 und pNTAP) in die 293T Zellen transfiziert. Im Western-Blot wie auch im Cavid-Assay wurden geringfügige Reduktionen nachgewiesen, d. h. schon allein der NTAP Leervektor reduziert die Viruspartikelproduktion im Vergleich zum pcDNA6 Leervektor (siehe Abb. 17 B).

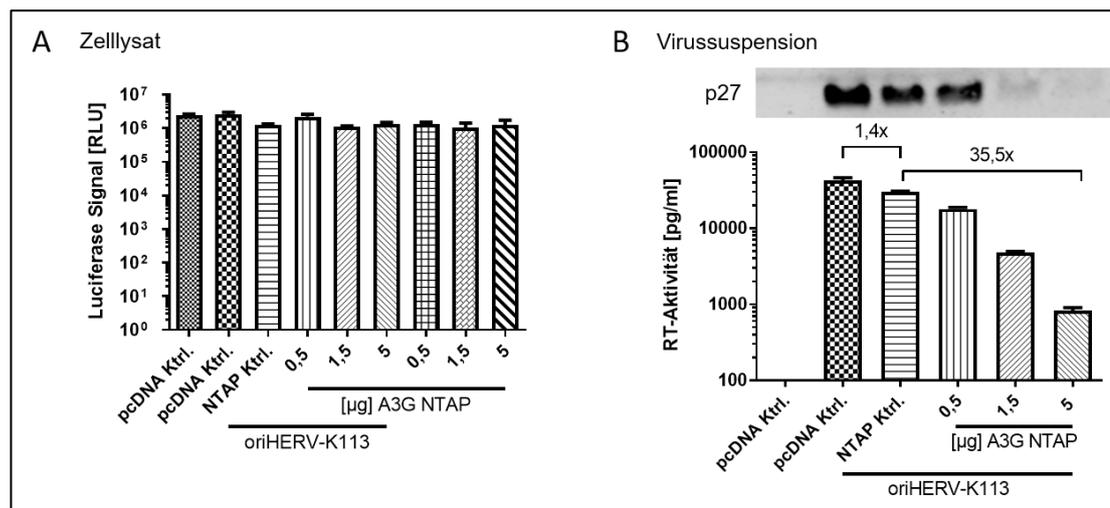


Abbildung 17: NTAP-A3G reduziert die HERV-K(HML-2) Partikelproduktion.

[A] Messung des Luciferase Signals in den Zellysaten; [B] Messung der p27 Konzentration mittels Western-Blot (oben) und die reversen Transkriptase Aktivität mittels Cavid Assay (unten) in den 70-fach aufkonzentrierten Überständen. 293T Zellen wurden mit unterschiedlichen A3G Plasmidkonzentrationen bzw. den zwei verschiedenen Leervektoren und zusätzlich oriHERV-K113, Stufen-1 und Rec Konstrukten transfiziert.

4.1.1.3 Die Proteinexpression von A3G-HA hat keinen Einfluss auf die HERV-K(HML-2) Viruspartikelproduktion

Bei den verwendeten Leervektoren (pcDNA6 und pNTAP) wurden unterschiedliche reverse Transkriptase Konzentrationen in den aufkonzentrierten HERV-K(HML-2) Überständen bestimmt. Beim pcDNA6 Vektor wurden eine erhöhte reverse Transkriptase Aktivität im Gegensatz zum pNTAP Vektor gemessen. Auf Grund dieser Tatsache wurde A3G mit einem HA Tag in den pcDNA6 Vektor hineinkloniert (siehe Abb. 18 A) und überprüft, ob mit diesem Vektor ebenfalls eine Restriktion von HERV-K(HML-2) nachgewiesen werden kann. In den jeweiligen Zellysaten konnte das A3G-HA und das NTAP-A3G Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 18 B), sodass diese Proteine erfolgreich exprimiert wurden. Über den Nachweis des p27 Proteins im Western-Blot in den aufkonzentrierten viralen Überständen kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob tatsächlich eine Restriktion von HERV-K(HML-2) über das A3G Protein erfolgen kann. Erwartungsgemäß reduzierte NTAP-A3G die HERV-K(HML-2) Viruspartikelproduktion im Vergleich zum NTAP Leervektor, dies wurde für das A3G-HA Protein jedoch nicht bestätigt (siehe Abb. 18 C). Im Vergleich der jeweiligen A3G-Konstrukte unterscheiden sich diese nicht nur bezüglich des HA- und NTAP-Tag, sondern die Tags sind beim NTAP-A3G N-Terminal und beim A3G-HA C-Terminal und der NTAP-A3G besitzt ein Linker Region zwischen dem Tag und dem A3G Protein und das A3G-HA Protein hat keinen Linker zwischen Protein und Tag. Dieser Linker könnte möglicherweise essentiell sein, um eine korrekte Proteinfaltung zu gewährleisten. Daraufhin müssen weitere Untersuchungen folgen, um eine eindeutige Aussage zu treffen, ob das A3G Protein tatsächlich die HERV-K(HML-2) Partikelproduktion reduzieren kann.

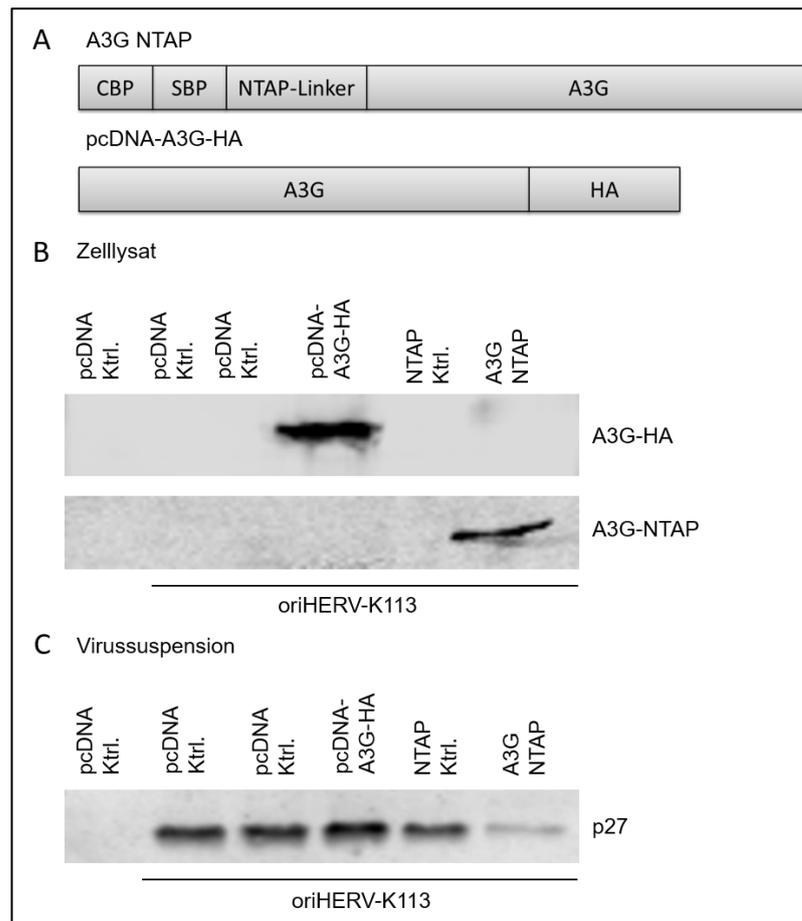


Abbildung 18: Keine Reduzierung der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion durch A3G-HA

[A] Darstellung beider A3G-Konstrukte pcDNA-A3G-HA und NTAP-A3G; [B] Nachweis der exprimierten A3G-Proteine in den Zelllysaten mittels Western-Blot; [C] Nachweis p27 in den 80-fach aufkonzentrierten Virussuspensionen mittels Western-Blot (p27 Antikörper (VD K140/p5B) in einer Konzentration von 1:400). 293T Zellen wurden mit den jeweiligen A3G Konstrukten bzw. Leervektoren (Transfektionsmenge von 5 µg) und zusätzlich mit oriHERV-K113, Stufen-1 und Rec Konstrukten transfiziert.

4.1.1.4 Keine Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion durch A3G

Im vorherigen Experiment wurde keine Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelreduktion durch A3G-HA nachgewiesen, sodass vier weitere A3G Konstrukte hergestellt wurden (siehe Abb. 19 A), um die Aussage, ob A3G einen Einfluss auf die HERV-K(HML-2) Partikelproduktion besitzt, zu überprüfen. In einem Konstrukt wurde A3G ohne einen Tag in den pcDNA6 Vektor hinein kloniert. In den anderen drei Vektoren wurde ein HA-Tag angefügt. Die Unterschiede zwischen den drei pcDNA6-A3G-HA Vektoren lagen einerseits in den verwendeten Linker (NTAP- oder Glycin/Serin-Linker), der sich zwischen den HA-Tag und der A3G-Sequenz befindet, und andererseits in der C- oder N-terminalen Lage des HA-Tags. Nach erfolgter Transfektion der jeweiligen pcDNA-A3G Konstrukte und dem NTAP-A3G Konstrukt konnten alle A3G Proteine erfolgreich im Zelllysate mit den verschiedenen Antikörpern (HA-, CBP- und A3G-Antikörper) nachgewiesen werden (siehe Abb. 19 B).

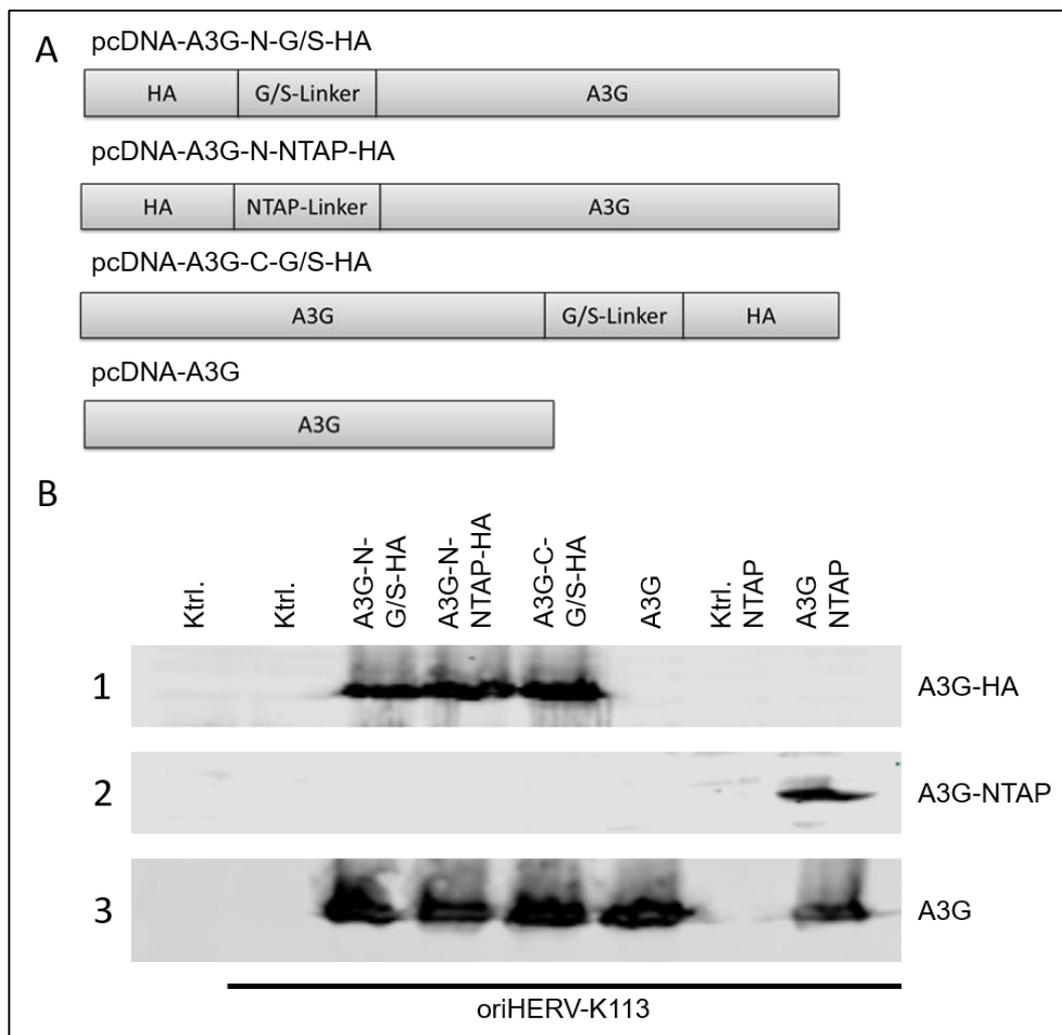


Abbildung 19: Expression von allen A3G Proteinen

[A] Darstellung der vier verschiedenen A3G Konstrukte im pcDNA6 Vektor

[B] Nachweis der Expression der A3G Proteine im Zelllysate mittels Western-Blot unter der Verwendung des HA- Antikörpers (1), des CBP-Antikörpers (2) und des A3G Antikörpers (3).

Eine mögliche HERV-K(HML-2) Partikelreduktion durch A3G wurde einerseits über die Konzentration des p27 Proteins mittels Western-Blot und andererseits über die reverse Transkriptase Aktivität über den Cavid- und PERT-Assay in 20-fach konzentrierten viralen Überständen bestimmt (siehe Abb. 20). Eine Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion konnte nur beim NTAP-A3G Protein nachgewiesen werden. Die reverse Transkriptase Aktivität reduzierte sich im Vergleich zum NTAP Leervektor um das 4,7-fache im PERT-Assay bzw. um das 9,1-fache im Cavid-Assay (siehe Abb. 20 B & C).

Die pcDNA-A3G Konstrukte zeigten keine Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion und schon die alleinige Expression des NTAP Leervektor reduzierte die reverse Transkriptase Aktivität um das 1,8-fache im PERT und um das 2,1-fache im Cavid-Assay. Daraufhin konnte eine Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion durch A3G nicht bestätigt werden.

Der NTAP Leervektor produzierte ein kleines Peptid mit einer Streptavidin- und Calmodulin-bindenden-Domänen. Dieses Peptid reduzierte schon von allein die HERV-K(HML-2) Partikelproduktion, sodass eine gewisse Affinität der Calmodulin- und/oder Streptavidin-bindenden Domäne gegenüber den weiteren transfizierten Proteinen (Staufen, Rec und HERV-K(HML-2) Proteine) vorhanden sein könnte, wodurch die Reduktion der Partikelproduktion erklärbar wäre.

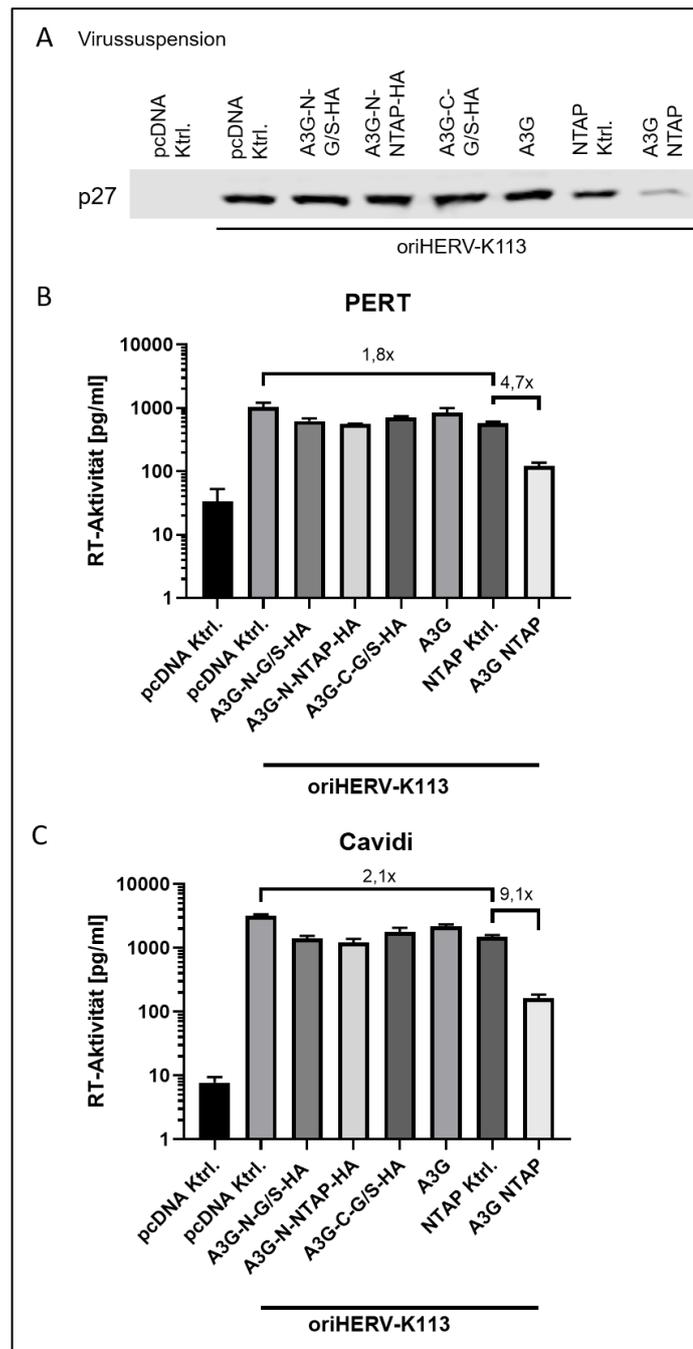


Abbildung 20: Keine Reduzierungen der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion durch das A3G Protein

[A] Nachweis der p27-Konzentration im Western-Blot; Nachweis der reversen Transkriptase-Aktivität im PERT [B] bzw. im Cavid-Assay [C] in 20-fach aufkonzentrierten viralen Überständen. 293T Zellen wurden mit den jeweiligen A3G Konstrukte bzw. Leervektoren mit einer gleichen Transfektionsmenge von 5 µg und zusätzlich mit oriHERV-K113, Stufen-1 und Rec Konstrukten transfiziert.

4.1.2 PYHIN-Proteine

Die Restriktion von HERV-K(HML-2) durch IFI16 wurde von Masterarbeiten, die in der Arbeitsgruppe des Robert Koch-Institutes entstand, bestätigt (Zumblick 2019; Savas 2020; Friedrich 2021). In dieser Arbeit liegt der Fokus darauf, ob AIM2, MNDA oder IFIX, die ebenfalls zur PYHIN Proteinfamilie gehören, eine Restriktion von HERV-K(HML-2) bewirken. Die verwendeten AIM2, MNDA und IFIX Konstrukte wurden von der Arbeitsgruppe um Frank Kirchhoff von der Universität Ulm zur Verfügung gestellt. Für die nachfolgenden Experimente wurden Konstrukte, die entweder eine Expression eines vollständigen PYHIN Proteins bestehend aus der Pyrin-, Linker- und HIN-Domäne oder die nur aus der Pyrin- und Linker-Domäne bestehen, verwendet (siehe Abb. 21).

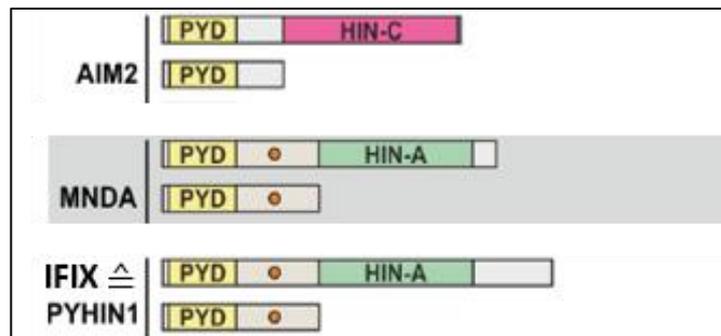


Abbildung 21: Darstellung der Struktur des AIM2, MNDA und IFIX Proteins mit den dazugehörigen Pyrin-Linker Proteinen (Bosso et al. 2020)

Für die Restriktionsversuche wurden zwei HERV-K(HML-2) Konstrukte (oriST HERV-K113 oder CMVoriST HERV-K113) verwendet. Die beiden Moleklarklone wurden von der Arbeitsgruppe um Norbert Bannert konstruiert, wobei postinsertionale Mutationen in der HERV-K113 Sequenz detektiert und revertierte wurden. Durch die Rückmutation von nicht synonymen und synonymen Mutationen entstand der oriST HERV-K113 Moleklarklon (Lausch 2013). Für den CMVoriST HERV-K113 Moleklarklon wurde diese oriST HERV-K113 Sequenz verwendet und ein CMV-Promotor anstelle der U3 Region in die 5`LTR hinein kloniert (Lausch 2013) (siehe Abb. 22).

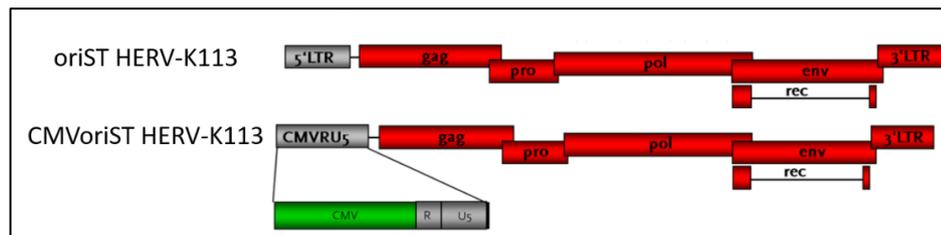


Abbildung 22: Darstellung des oriST HERV-K113 und CMVoriST HERV-K113 Konstrukt (Lausch 2013)

Für die Erhöhung der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion wurde Staufen-1 cotransfiziert. Frau Hanke und Kolleg*innen zeigten eine Interaktion von Staufen-1 mit dem Rec und Gag Protein, was die Partikelproduktion steigerte (Hanke et al. 2013b).

Nach erfolgter Transfektion der 293T Zellen konnten in den verschiedenen Zelllysaten AIM2, MNDA und IFIX und die jeweiligen Pysin-Linker Proteine im Western-Blot nachgewiesen werden (siehe Abb. 23). In den zur Verfügung gestellten Konstrukten von Frank Kirchhoff wurde ein HA-Tag hinein kloniert, sodass die Proteinexpression über einen HA-Antikörper detektiert werden konnte. Keine Banden wurden in den Zelllysaten, in dem ein Kontrollplasmid anstelle der PYHIN Konstrukte verwendet oder in dem die 293T Zellen nicht transfiziert wurden, nachgewiesen. Das vollständige AIM2 Protein besitzt ungefähr eine Größe von ca. 39 kDa, MNDA von ca. 46 kDa und IFIX von ca. 55 kDa (GeneCards [2, 3, 4]). Für MNDA und IFIX sind noch weitere Banden im Western-Blot detektierbar, wobei hier von Spleißvarianten ausgegangen wurde. Die Cotransfektion der jeweiligen PYHIN Proteinen führt zu einer erfolgreichen Expression dieser Proteine, sodass der Einfluss dieser PYHIN Proteine auf die Restriktion von HERV-K(HML-2) untersucht werden kann.

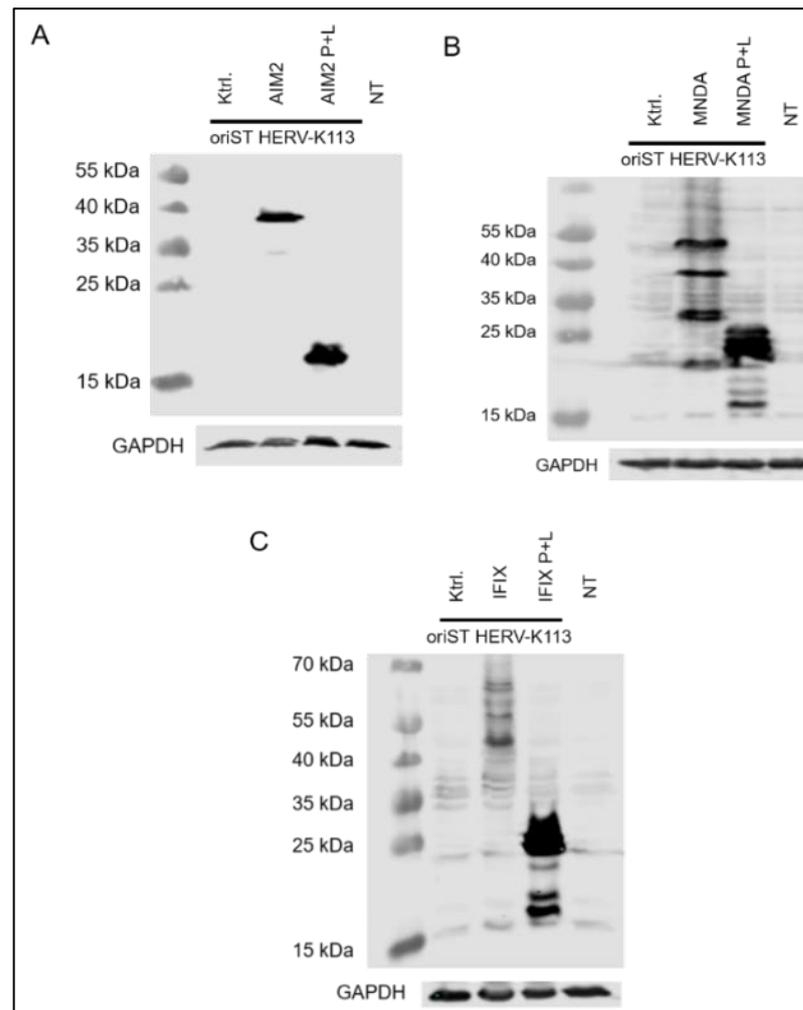


Abbildung 23: Nachweis von AIM2, MND A und IFIX und den jeweiligen Pyrin-Linker Proteinen

[A] Nachweis von AIM2 und AIM2 Pyrin-Linker Proteinen; [B] Nachweis von MND A und MND A Pyrin-Linker Proteine; [C] Nachweis von IFIX und IFIX Pyrin-Linker Proteinen im Zellysate; oben: Nachweis der PYHIN Proteine über einen HA-Antikörper & unten: Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle; Ktrl. steht für die Transfektion eines Kontrollplasmids anstelle der PYHIN Konstrukte. NT steht für nicht transfiziert.

4.1.2.1 Geringfügige Restriktion von HERV-K(HML-2) durch das zyttoplasmatische Protein AIM2

293T Zellen wurden mit dem oriST HERV-K113 Molekularklon, mit dem Staufen-1 Plasmid und mit aufsteigenden AIM2 Plasmidkonzentrationen transfiziert. Zusätzlich wurde ein pGL4.51 Luciferase Plasmid in die 293T Zellen transfiziert, um eine mögliche Auswirkung der ektopischen AIM2 Proteinexpression auf die Proteintranslation bzw. Zytotoxizität zu bestimmen. Das AIM2 Protein konnte im Zelllysat ab einer Plasmid Konzentration von 24 ng im Transfektionsansatz nachgewiesen werden, wobei mit aufsteigenden Plasmid Konzentrationen auch die AIM2 Proteinkonzentration im Western-Blot zunahm (siehe Abb. 24 B oben). Die AIM2 Proteinexpression hatte keinen Einfluss auf die Luciferase Konzentration im Zelllysat (siehe Abb. 24 B unten).

In den 40-fach aufkonzentrierten Virusüberständen wurde die reverse Transkriptase Aktivität mittels PERT Assay bestimmt und bei zunehmenden AIM2 Konzentrationen reduzierte sich die reverse Transkriptase Aktivität geringfügig um das 4,5-fache (siehe Abb. 24 A).

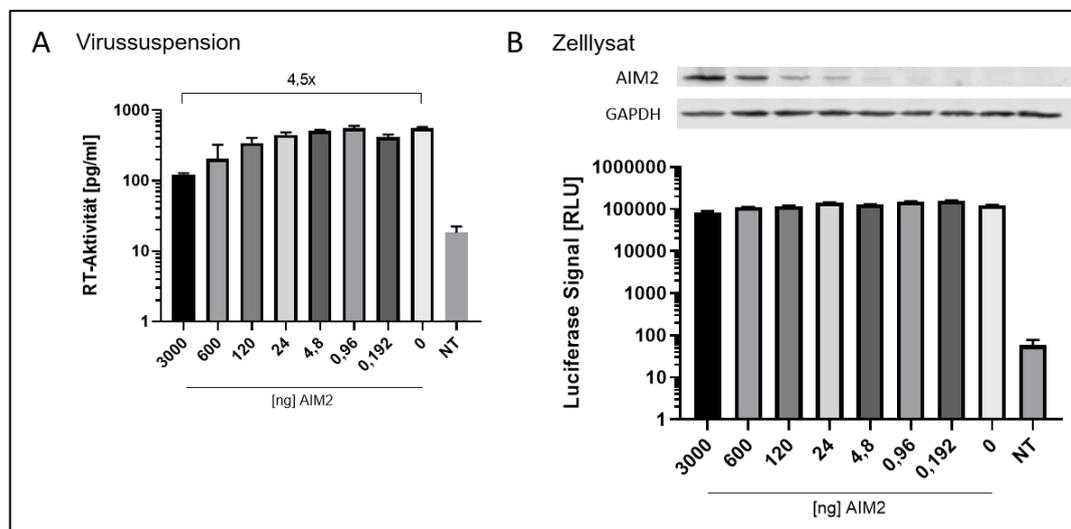


Abbildung 24: Geringfügige Reduktionen der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion durch das AIM2 Protein

[A] Die RT-Aktivität in den 40-fach aufkonzentrierten Virusüberständen wurde mittels PERT-Assay bestimmt. [B] Nachweis der AIM2 Proteinexpression und der Luciferaseaktivität im Zelllysat. Staufen-1 wurde für die erhöhte Partikel-

produktion und pGL4.51 für die Viabilitätskontrolle in die 293T Zellen cotransfiziert. NT steht für nicht transfiziert.

4.1.2.2 Restriktion von HERV-K(HML-2) durch das nukleäre Protein MNDA

Das MNDA Protein kann bei einer Plasmid Konzentration von 3.000 ng bis 120 ng mit abnehmender Protein Konzentration im Western-Blot nachgewiesen werden (siehe Abb. 25 C). Das konstitutiv exprimierte GAPDH Protein zeigte im Western-Blot keine Veränderung, jedoch wurde eine 7x Abnahme der Luciferase Konzentration bei steigender MNDA Konzentration bestimmt (siehe Abb. 25 B). Eine mögliche Begründung für die Reduktion könnte die Interaktion des MNDA Proteins mit dem CMV Promotor des pGL4.51 Luciferase Konstruktes sein.

In den 40-fach aufkonzentrierten Virusüberständen wurde bei steigender MNDA Konzentration eine 87-fache Reduktion der reversen Transkriptase Aktivität bestimmt (siehe Abb. 25 A). Diese Reduktion der oriST HERV-K113 Partikelkonzentration begann ab einer MNDA Konzentration von 24 ng.

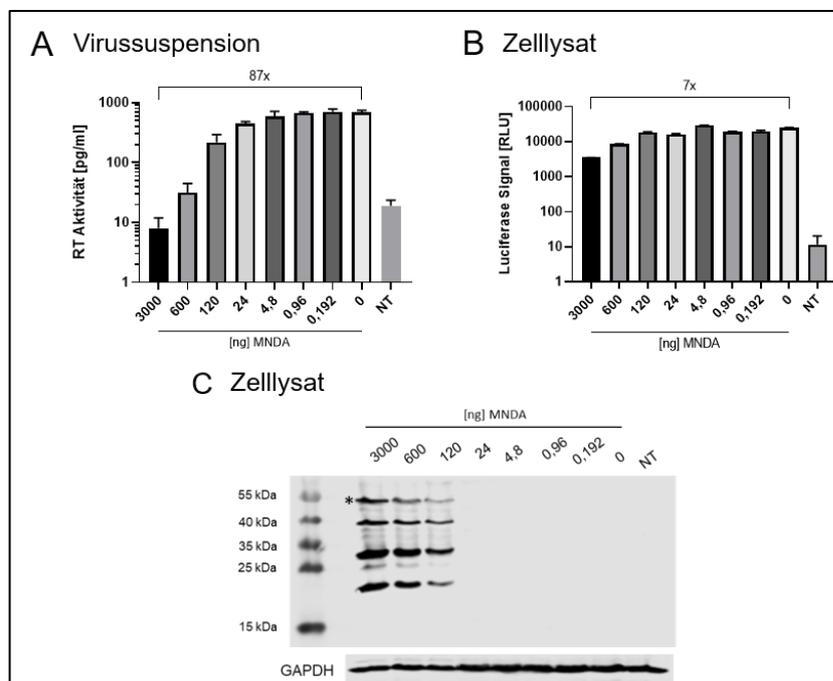


Abbildung 25: MNDA reduziert die HERV-K(HML-2) Partikelproduktion.

[A] Die RT-Aktivität in den 40-fach aufkonzentrierten Virusüberständen wurde mittels PERT-Assay bestimmt. [B] Nachweis der Luciferase Konzentration im

Zelllysate. [C] Nachweis der MNDA Proteinexpression im Zelllysate. Stufen-1 wurde für die erhöhte Partikelproduktion und pGL4.51 für die Viabilitätskontrolle in die 293T Zellen cotransfiziert. NT steht für nicht transfiziert. * Nachweis des MNDA Proteins mit einer Größe von 46 kDa im Western-Blot.

4.1.2.3 Restriktion von HERV-K(HML-2) durch das nukleäre Protein IFIX

Das IFIX Protein wurde bei einer Plasmid Konzentration von 3.000 bis 120 ng mit abnehmender Proteinkonzentration im Western-Blot nachgewiesen (siehe Abb. 26 C). Die Luciferase Konzentration reduzierte sich bei zunehmender IFIX Konzentration geringfügig um das 2,4-fache (siehe Abb. 26 B). Dies könnte gleichermaßen wie beim MNDA Protein auf die Interaktion des IFIX Proteins mit dem CMV Promotor des pGL4.51 Luciferase Konstrukts zurückzuführen sein.

Bei steigender IFIX Konzentration reduzierte sich die RT-Aktivität um das 41-fache (siehe Abb. 26 A). Die Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelkonzentration begann ab einer IFIX Konzentration von 4,8 ng.

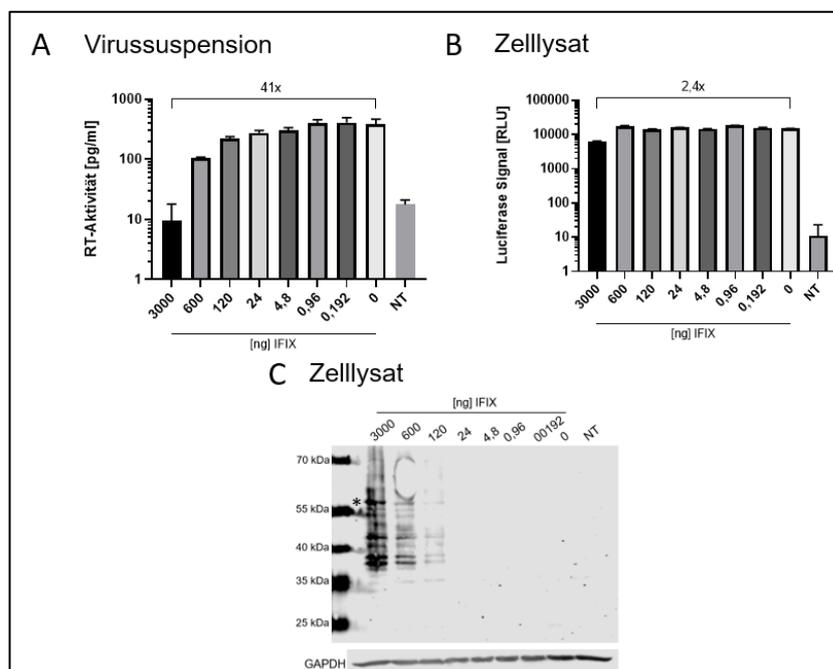


Abbildung 26: Das nukleäre IFIX Protein reduziert wie das MNDA Protein die virale HERV-K(HML-2) Partikelproduktion.

[A] Die RT-Aktivität in den 40-fach aufkonzentrierten Virusüberständen wurde mittels PERT-Assay bestimmt. [B] Nachweis der Luciferase Konzentration im

*Zelllysate. [C] Nachweis der IFIX Proteinexpression im Zelllysate. Staufen-1 wurde für die erhöhte Partikelproduktion und pGL4.51 für die Viabilitätskontrolle in die 293T Zellen cotransfiziert. NT steht für nicht transfiziert. * Nachweis des IFIX Proteins mit einer Größe von 55 kDa im Western-Blot.*

4.1.2.4 Restriktion von HERV-K(HML-2) durch die Pyrin-Linker Domäne von MNDA und IFIX und der Vergleich der Restriktionen von verschiedenen HERV-K(HML-2) Konstrukten

Aus den vorherigen Experimenten wurde eine oriST HERV-K113 Partikelreduktion für AIM2, MNDA und IFIX bestimmt, wobei für AIM2 nur eine geringfügige Reduktion vorhanden war. Anschließend soll überprüft werden, ob schon die Expression der Pyrin-Linker Domäne von den PYHIN Proteinen ausreichend ist, um eine Partikelreduktion von HERV-K(HML-2) zu induzieren. Eine signifikante Reduktion der oriST HERV-K113 Partikelbildung wurde bei der Expression der MNDA und IFIX Pyrin-Linker Domäne gemessen. Die Reduktion wurde einerseits über die Reduzierung der reversen Transkriptase Aktivität in dem aufkonzentrierten Virusüberstand mittels PERT-Assay und andererseits über die p27 Konzentration im Überstand mittels Western-Blot bestimmt (siehe Abb. 27 A). Daraufhin scheint die Bindung von doppelsträngiger oder einzelsträngiger viraler DNA an die HIN-Domäne der PYHIN Proteine für die HERV-K(HML-2) Partikelreduktion nicht entscheidend zu sein.

Anschließend wurde der Einfluss von AIM2, MNDA und IFIX Proteinen auf zwei verschiedene HERV-K(HML-2) Konstrukte untersucht. Der Unterschied zwischen den HERV-K(HML-2) Konstrukten (oriST HERV-K113 & CMVoriST HERV-K113) besteht darin, dass CMVoriST HERV-K113 einen CMV Promotor anstelle der U3-Region in der 5'LTR besitzt. Durch die Transfektion von CMVoriST HERV-K113 anstelle des oriST HERV-K113 Plasmids wurde die geringfügige Reduktion durch AIM2 komplett aufgehoben und für MNDA und IFIX wurden nur noch geringfügige Reduktionen nachgewiesen (siehe Abb. 27 C). Bei CMVoriST HERV-K113 wurde für IFIX eine 2,6-fache Reduktion der reversen Transkriptase Aktivität bestimmt. Bei der IFIX Titration wurde bei der höchsten IFIX Konzentration eine 2,4-fache Reduktion der Luciferase Aktivität im Zelllysate gemessen. Beide Konstrukte CMVoriST HERV-

K113 bzw. pGL4.51 besitzen einen CMV Promotor und eine mögliche Interaktion von IFIX mit dem CMV Promotor könnte die Ursache für die gemessene Reduzierung der Partikelkonzentration bzw. Luciferaseaktivität sein. Diese Reduktion wurde gleichermaßen für MNDA nachgewiesen. In dem Zellysat wurden bei höchster MNDA Konzentration eine 7-fache Reduktion der Luciferase Aktivität und für CMVoriST HERV-K113 eine 10,5-fache Reduktion der reversen Transkriptase Aktivität im Virusüberstand gemessen.

Durch den Austausch von der U3 Region der 5`LTR mit dem CMV Promotor wurde die vollständige Restriktion von HERV-K(HML-2) durch MNDA und IFIX aufgehoben und nur noch geringfügige Reduktionen in der reversen Transkriptase Aktivität wurden bestimmt (siehe Abb. 27 B). Das Fazit aus diesem Experiment besteht darin, dass eine intakte 5`LTR-Region für die Restriktion von HERV-K(HML-2) durch MNDA und IFIX entscheidend zu sein scheint.

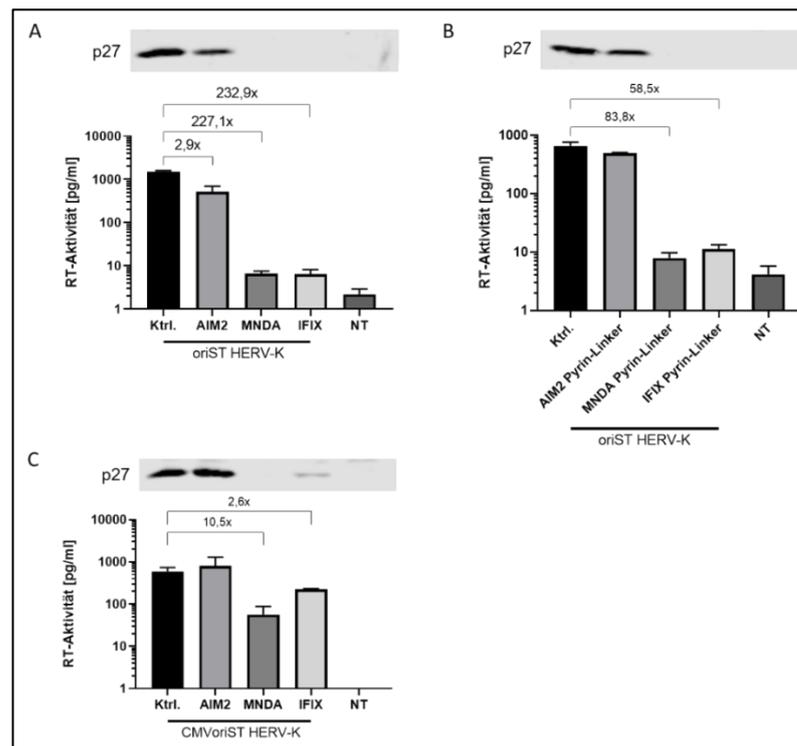


Abbildung 27: Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelbildung durch die Pyrin-Linker Domäne von MNDA und IFIX; Aufhebung der vollständigen Restriktion von MNDA und IFIX durch die Verwendung des CMVoriST HERV-K113 Konstruktes.

[A] Nachweis der oriST HERV-K113 Partikelreduktion durch AIM2, MNDA und IFIX. [B] Nachweis der oriST HERV-K113 Partikelreduktion durch die Pyrin-Linker Domäne des AIM2, MNDA und IFIX Proteins. [C] Nachweis der CMVoriST HERV-K113 Partikelreduktion durch AIM2, MNDA und IFIX. NT steht für nicht transfiziert. Oben: Nachweis des p27 Proteins in 100-fach aufkonzentrierten Virusüberständen über Western-Blot mittels p27 Antikörper; unten: Nachweis der reversen Transkriptase Aktivität mittels PERT-Assay in 100-fach aufkonzentrierten Virusüberständen.

4.2 Stressgranula

4.2.1 G3BP

G3BP („Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein“) ist ein RNA-bindendes zytoplasmatisches Protein, welches an die SH3 Domäne vom GAP (GTPase-aktivierendes Protein) bindet. Das GAP Protein reguliert die GTPase Aktivität von G Proteinen wie bspw. Ras (Marshall et al. 1989). Durch die Interaktion von Ras mit GAP und G3BP wird die Bindung, die Stabilität und die Translationseffizienz der mRNA in einer GTP-abhängigen Art und Weise moduliert (Parker et al. 1996). Ras ist ein essentieller Bestandteil von verschiedensten zellulären Signalwegen, die für die Regulation des Zellwachstums, -proliferation und -differenzierung verantwortlich ist (Olson & Marais 2000).

Durch eine immunzytochemische Färbung konnte die Lokalisation des G3BP Proteins in den HeLa Zellen bestimmt werden (siehe Abb. 28). In ungestressten Zellen lag G3BP diffuse im Zytoplasma verteilt vor. Durch eine oxidative Stressreaktion mittels Natriumarsenit wurden die G3BP Proteine in großen punktförmigen Strukturen nachgewiesen. Diese Strukturen werden als Stressgranula bezeichnet und konnten somit erfolgreich nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass der HERMA7 Antikörper nicht unspezifisch an die nicht-transfizierten HeLa Zellen bindet.

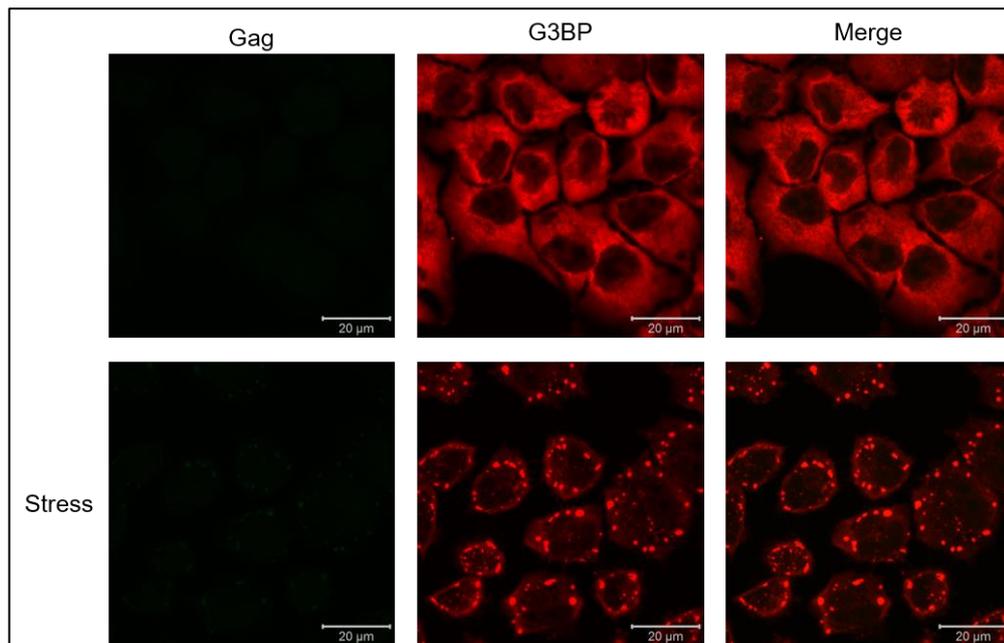


Abbildung 28: Lokalisation des G3BP Proteins in ungestressten und gestressten Zellen

Ein Teil der nicht-transfizierten HeLa Zellen wurden nach 24 Stunden mit 0,5 mM Natriumarsenit gestresst. Danach erfolgte die Fixierung der HeLa Zellen und die zytoplasmatische Färbung des Gag (HERMA7 (α -p27)-Antikörper) und des G3BP Proteins. Die Aufnahme erfolgte über das konfokale Laserscanning Mikroskop 780 von Zeiss.

Im nachfolgenden Experiment wurde überprüft, ob HERV-K(HML-2) in den HeLa Zellen eine Stressgranula Bildung induziert und/oder ob HERV-K(HML-2) nach erfolgter Stressreaktion durch Natriumarsenit die Bildung einer Stressgranula verhindern kann. Herr Abrahamyan und Kolleg*innen zeigten, dass in ungestressten und gestressten Zellen die Bildung einer Stressgranula durch HIV-1 ausblieb (Abrahamyan et al. 2010), somit wurde HIV-1 als Kontrolle verwendet.

Die HeLa Zellen wurden mit dem pNL4.3 oder mit dem CMVoriST HERV-K113 Moleklarklon transfiziert. Der CMV Promotor erhöhte die virale RNA Transkription und die Proteinexpression, sodass eine erhöhte Gag Expression in den HeLa Zellen erfolgte. Nach 24 Stunden wurden gegebenenfalls die Zellen für 30 min mit Natriumarsenit gestresst. Anschließend erfolgte eine immunzytochemische Färbung, wobei das Gag und das G3BP Protein nach-

gewiesen wurden. Für HIV-1 und HERV-K(HML-2) mussten zwei verschiedene Gag Antikörper verwendet werden. Für HIV-1 wurde das p24 Protein über den AG3.0 Antikörper und für HERV-K(HML-2) wurde das p27 Protein über den HERMA7 Antikörper nachgewiesen. In den transfizierten HeLa Zellen konnte das Gag und das G3BP Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 29 A). Nach erfolgter Transfektion mit den HIV-1 Molekularklon (pNL4.3) zeigten die ungestressten Zellen eine gleichmäßige Verteilung des zytoplasmatischen G3BP Proteins, sodass durch eine HIV-1 Transfektion die Ausbildung einer Stressgranula nicht induziert wurde. In dem überwiegenden Anteil der HIV-1 positiven Zellen wurde nach erfolgter Stressreaktion durch Natriumarsenit ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung des zytoplasmatischen G3BP Proteins nachgewiesen. Die Bildung einer Stressgranula wurde folglich verhindert. Wenn die Expression des HIV-1 Gag Proteins nur sehr schwach nachgewiesen wurde, dann wurde in diesen Zellen eine Stressgranula ausgebildet, sodass im gestressten Zustand noch $30,8 \pm 3,7$ % der HIV-1 positiven Zellen eine Stressgranula besaßen (siehe Abb. 29 B).

Für HERV-K(HML-2) wurden nach erfolgter Transfektion des CMVoriST HERV-K113 Molekularklon in einigen HeLa Zellen eine Stressgranula nachgewiesen, jedoch war in den überwiegenden Zellen G3BP gleichmäßig im Zytoplasma vorhanden, sodass nur $29,0 \pm 0,7$ % der HERV-K(HML-2) positiven HeLa Zellen eine Stressgranula ausbildeten (siehe Abb. 29). Nach einer Stressreaktion durch Natriumarsenit zeigten die überwiegenden HERV-K(HML-2) positiven Zellen eine Stressgranula ($81,3 \pm 2,4$ %) (siehe Abb. 29 B). Schlussfolgernd kann HERV-K(HML-2) die Stressgranula Bildung nach einer Stressreaktion nicht verhindern.

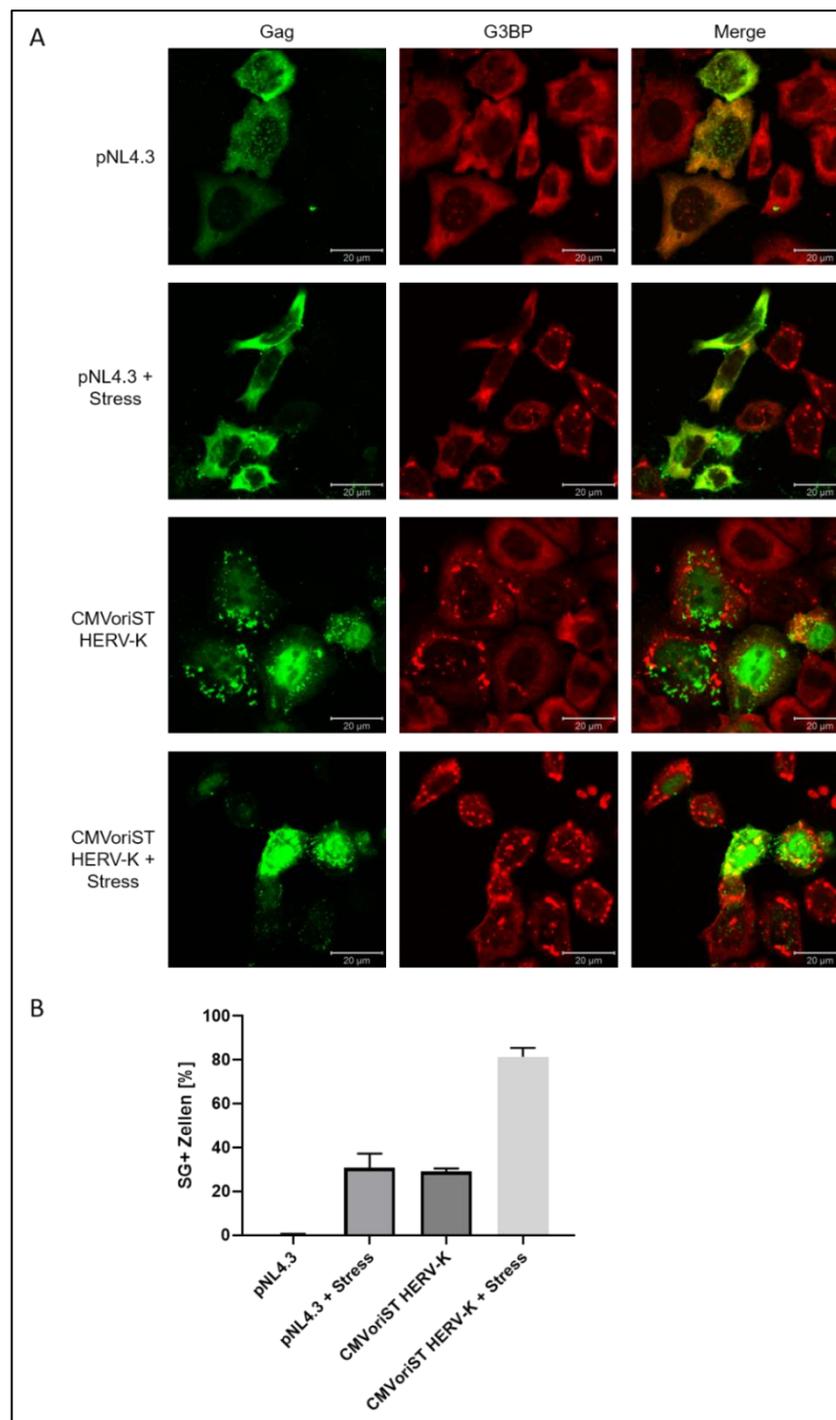


Abbildung 29: HERV-K(HML-2) induziert eine Stressreaktion mit einhergehender Ausbildung einer Stressgranula.

Die HeLa Zellen wurden entweder mit den pNL4.3 (HIV-1) oder den CMVoriST HERV-K113 (HERV-K(HML-2)) Molekularklon transfiziert. Nach 24 Stunden wurde ein Teil der HeLa Zellen mit 0,5 mM Natriumarsenit gestresst. Danach erfolgte die Fixierung der HeLa Zellen und die zytoplasmatische

Färbung des Gag (AG3.0 (α -p24) oder HERMA7 (α -p27)) Proteins jeweils in einer Konzentration von 1:50) und des G3BP (Antikörper in einer Konzentration von 1:150) Proteins. Die Aufnahme erfolgte über das konfokale Laserscanning Mikroskop 780 von Zeiss. [A] mikroskopische Aufnahme & [B] Quantifizierung der Stressgranula (SG) positiven Zellen in den HERV-K(HML-2) oder HIV-1 transfizierten Zellen.

4.2.2 P-EIF2 α

Der initiale Schritt für die Bildung einer Stressgranula ist die Phosphorylierung von EIF2 α . Diese Phosphorylierung kann entweder über eine oxidative Stressreaktion bspw. durch Natriumarsenit oder andererseits über die virale RNA ausgelöst werden, wobei entweder die HRI Kinase („heme-regulated eIF2 α kinase“) oder die Proteinkinase K aktiviert wird (Valiente-Echeverría et al. 2012; Kedersha et al. 1999).

Als Erstes wurde die Spezifität des P-EIF2 α Antikörper in ungestressten und gestressten nicht-transfizierten HeLa Zellen bestimmt. In ungestressten Zellen war nur ein geringes Phosphorylierungssignal des EIF2 α Proteins nachweisbar (siehe Abb. 30 A). Aus den mikroskopischen Bildern kann geschlossen werden, dass EIF2 α während der mitotischen Zellteilung phosphoryliert wurde. In gestressten Zellen durch die Natriumarsenitbehandlung wurde ein starkes Phosphorylierungssignal von EIF2 α nachgewiesen (siehe Abb. 30 A). Daraufhin kann für alle weiteren Analysen dieser P-EIF2 α Antikörper verwendet werden.

Durch die Transfektion von HIV-1 und HERV-K(HML-2) Moleklarklonen wurde ein etwas erhöhtes Phosphorylierungssignal von EIF2 α gegenüber den nicht-transfizierten Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 30 A & B). Die Publikation von Herrn Abrahamyan und Kolleg*innen zeigten, dass HIV-1 die Phosphorylierung von EIF2 α nicht verhindern kann, sondern über einen anderen Signalweg die Stressgranula Assemblierung verhinderte (Abrahamyan et al. 2010). Daraufhin konnte für HIV-1 im Western-Blot bzw. in der mikroskopischen Aufnahme ein leicht erhöhtes Phosphorylierungssignal nachgewiesen werden, welches diffuse im Zytoplasma verteilt war. Für HERV-K(HML-2) hingegen lagerte sich das P-EIF2 α Protein in diesen typischen

punktförmigen Strukturen an, sodass P-EIF2 α ein möglicher Bestandteil der Stressgranula sein könnte.

Die Phosphorylierung des EIF2 α Proteins ist der initiale Schritt für die Bildung einer Stressgranula. Da eine erhöhte Phosphorylierung des EIF2 α Proteins in ungestressten, HERV-K(HML-2) transfizierten HeLa Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte, ist dies ein zusätzlicher Indiz für eine Stressreaktion in ungestressten, HERV-K(HML-2) transfizierten Zellen. Somit wurde erneut bestätigt, dass HERV-K(HML-2) in ungestressten Zellen eine Stressreaktion induziert kann, wodurch der Nachweis von Stressgranula positiven HERV-K(HML-2) Zellen ($29,0 \pm 0,7 \%$), die durch die intrazelluläre Färbung des G3BP Proteins nachgewiesen wurde, erklärt wird.

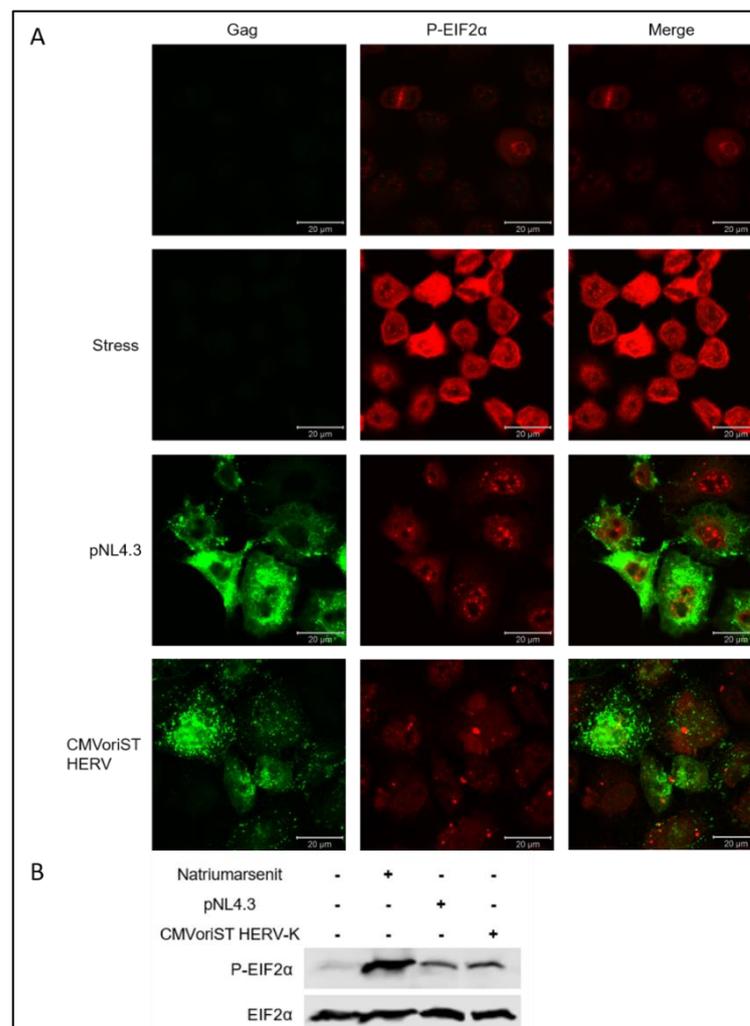


Abbildung 30: HIV-1 und HERV-K(HML-2) induzieren eine Phosphorylierung von EIF2 α .

Für den Nachweis des Phosphorylierungssignals von EIF2 α wurden entweder nicht-transfizierte oder transfizierte HeLa Zellen verwendet. Es wurden entweder der pNL4.3 oder CMVoriST HERV-K113 Moleklarklon in die Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden ein Teil der HeLa Zellen mit 0,5 mM Natriumarsenit gestresst.

[A] Nachweis von P-EIF2 α über die immunzytochemische Färbung, wofür die HeLa Zellen fixiert und das Gag (AG3.0 (p24 HIV-1 in einer Konzentration von 1:50) oder HERMA7 (p27 HERV-K(HML-2) in einer Konzentration 1:50)) und das P-EIF2 α (in einer Konzentration von 1:100) Protein angefärbt wurden. Die Aufnahme erfolgte über das konfokale Laserscanning Mikroskop 780 von Zeiss.

[B] Nachweis von P-EIF2 α (in einer Konzentration von 1:100) und EIF2 α (in einer Konzentration von 1:100) über die Western-Blot Methode.

4.3 Inhibition von HERV-K(HML-2) durch HIV-Therapeutika

Die reversen Transkriptase Inhibitoren, die Integraseinhibitoren und die Proteaseinhibitoren sind Substanzen, die gezeigt haben, dass diese den HIV-1 Replikationszyklus hemmen. Im Folgenden soll untersucht werden, ob diese Substanzen eine Inhibierung der HERV-K(HML-2) Infektion bewirken.

4.3.1 Reverse Transkriptase Inhibitoren

4.3.1.1 Nukleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI)

Die nukleosidischen reversen Transkriptaseinhibitoren (NRTI) sind Nukleosidanaloga, d. h., dass sich diese Substanzen gegenüber den physiologischen Nukleosiden nur über geringfügige Modifikationen an der Desoxyribose unterscheiden und keine 3` Hydroxygruppe besitzen (Goody et al. 1991). Nach erfolgter Aufnahme der Nukleosidanaloga werden diese durch intrazelluläre Kinasen an der 5` Position der Desoxyribose zu Nukleosidtriphosphatanaloga phosphoryliert (Furman et al. 1986) und können als Nukleotidanaloga um die aktive Bindestelle der reversen Transkriptase konkurrieren, wodurch diese Analoga als kompetitive Inhibitoren fungieren (Goody et al. 1991). Durch den Einbau der Nukleotidanaloga in die DNA kann die Kettenverlängerung nicht mehr erfolgen, weil keine Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden gebildet werden können, somit wird der retrovirale Replikationszyklus schon bereits bei der cDNA Synthese durch die reverse Transkriptase gehemmt (Goody et al. 1991).

4.3.1.1.1 NRTI Azidothymidin (Zidovudine; AZT) inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion

Zidovudin war das erste Medikament in der HIV-Therapie und wurde erstmals 1964 von Jerome P. Horwitz synthetisiert (Horwitz et al. 1964), aber erst 1985 wies Hiroaki Mitsuya die Wirksamkeit von Zidovudin gegen HIV nach (Mitsuya et al. 1985). Der Name Azidothymidin leitet sich davon ab, dass an der 3` Position der Ribose eine Azidverbindung statt der Hydroxyg-

ruppe vorhanden ist, somit wirkt Zidovudin als Thymidinanalogon (Horwitz et al. 1964).

In mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) wurde ein IC₅₀-Wert für HIV-1 von 0,002 µM für Zidovudin bestimmt (Machado et al. 1999). Der IC₅₀-Wert gibt an, bei welcher Konzentration eine 50 % Inhibition der Virusinfektion erfolgt. Der IC₅₀-Wert für HIV-1 kann in Abhängigkeit der verwendeten Zellen variieren.

Für alle verwendeten Inhibitoren wurde eine Zytotoxizitätsanalyse durchgeführt. Dafür wurde eine 5-fache serielle Verdünnung, die sich anhand des IC₅₀-Wertes von HIV richtete, hergestellt (siehe Abb. 32A) und die 293T Zellen wurden mit dem Luciferase Konstrukt (pGL3 Promotor) transfiziert. Die Luciferaseaktivität bei unterschiedlichen Inhibitor Konzentrationen wurde nach 48 Stunden im Zelllysat gemessen. Zidovudin wirkte bei einer Konzentration von 3,9 mM zytotoxisch, weil eine reduzierte Luciferase Konzentration gemessen wurde (siehe Abb. 32 A). Für die nachfolgenden Experimente wurde ein Konzentrationsbereich für Zidovudin von 0,016 nM bis 781,25 µM genutzt.

HeLa und 786_0 Zellen wurden mit VSV-G pseudotypisierten HIV-1 und HERV-K_{CON} Viren bei unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen infiziert. HERV-K_{CON} ist eine rekonstituierte HERV-K(HML-2) Sequenz, die aus zehn verschiedenen Proviren generiert wurde, und infektiöse virale Partikel produziert, die eine stabile Integration der HERV-K(HML-2) Sequenz ins Genom induzieren kann (Lee et al. 2007). Anstelle des Hüllproteins wurde eine GFP Kassetten hinein kloniert, sodass infizierte Zellen das GFP Protein exprimieren (Lee et al. 2007).

Für die Untersuchung der Reduktion der GFP positiven Zellen nach erfolgter Behandlung mit nukleosidischen und nichtnukleosidischen reversen Transkriptaseinhibitoren und Interagaseinhibitoren wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Dies waren die 786_0 Zelllinie, die eine adhärenente epitheliale Nierenkarzinomzelllinie ist, und die HeLa Zelllinie, die eine adhärenente epitheliale Zervixkarzinomzelllinie ist. HIV-Pseudotypen infizierte ~ 90 % der HeLa Zellen und ~ 80 % der 786_0 Zellen, wohingegen HERV-Pseudotypen nur ~ 2 % HeLa Zellen und ~ 1 % der 786_0 Zellen infizierte. Schlussfolgernd ist die Virusinfektion in Bezug auf die 786_0 Zellen etwas niedriger im Gegen-

satz zu den HeLa Zellen. Für die Berechnung der Reduktion der GFP positiven Zellen durch die Wirkstoff Behandlung wurde die Gesamtzahl der GFP positiven, nicht behandelten Zellen auf 100 % gesetzt, wobei nachfolgend das prozentuale Verhältnis in den jeweiligen Konzentrationsstufen ermittelt wurde (siehe Abb. 31).

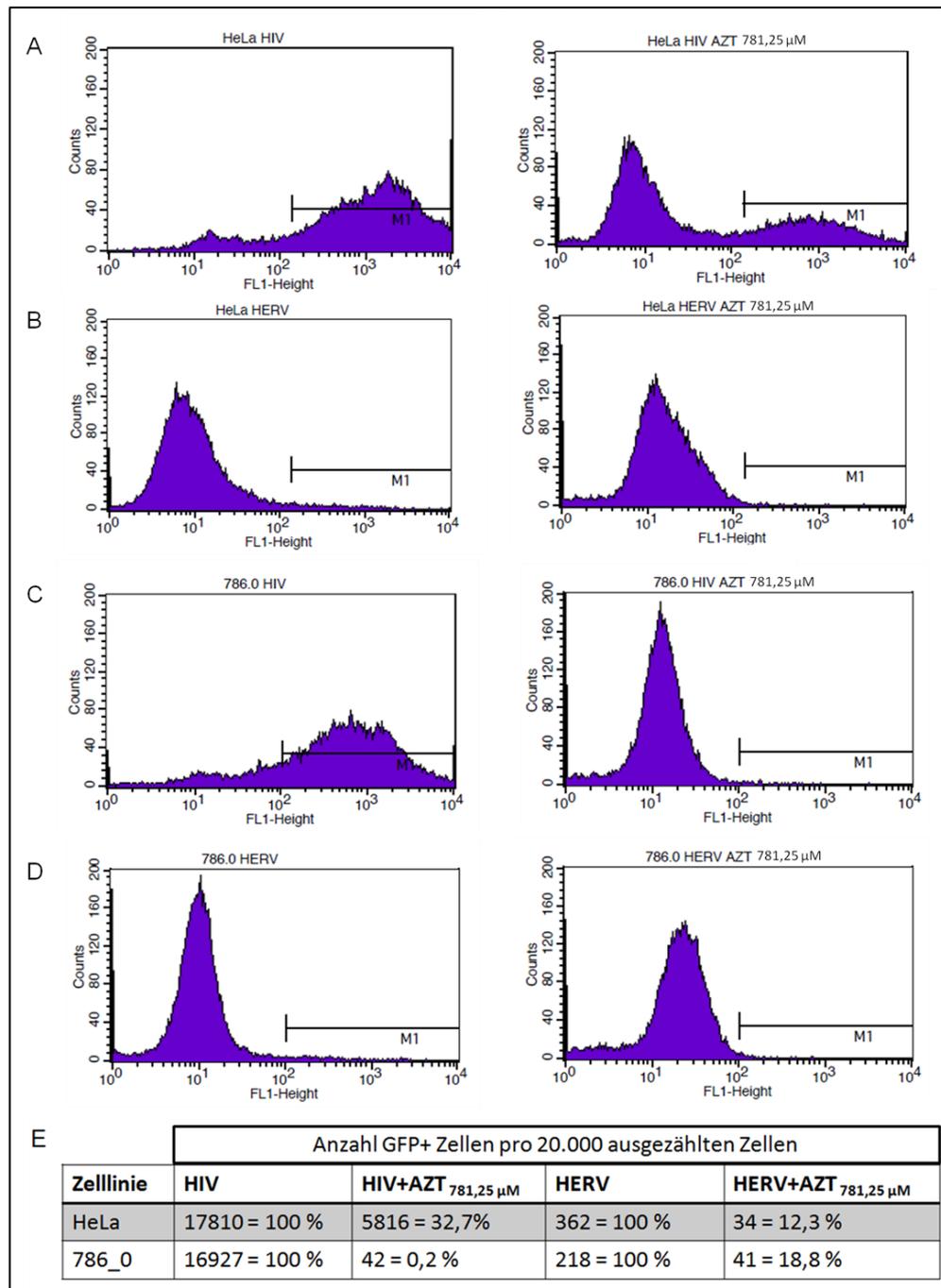


Abbildung 31: Reduktion der GFP+ Zellen durch den Wirkstoff Ziduvudin nach erfolgter HIV-1 und HERV-K(HML-2) Infektion.

FACS Auswertungen der GFP positiven Zellen nach erfolgter HIV-1 [A & C] und HERV-K(HML-2) [B & D] Infektionen in HeLa [A & B] und 786_0 [C & D] Zellen mit und ohne Behandlung mit dem Wirkstoff Zidovudin (AZT) bei maximaler Konzentration von 781,25 μM . [E] Anzahl der GFP+ Zellen und daraus resultierende prozentuale Reduktion der GFP+ Zellen durch die Zidovudin Behandlung.

Bei steigender Zidovudin Konzentration nahm die Anzahl der GFP positiven Zellen ab, somit konnte eine Inhibierungskurve für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 786_0 und HeLa Zellen bestimmt werden (siehe Abb. 32 B & C). Für HIV-1 konnte bei einer Zidovudinkonzentration von 156,25 μM und 781,25 μM nach wie vor noch circa 30 % GFP positive HeLa Zellen gemessen werden.

Die berechneten IC₅₀-Werte für HIV-1 in 786_0 Zellen liegen bei $1,53 \pm 1,57 \mu\text{M}$ und in HeLa Zellen bei $1,40 \pm 0,50 \mu\text{M}$ (siehe Abb. 32 D). Für HERV-K(HML-2) konnten niedrigere IC₅₀-Werte von $0,17 \pm 0,11 \mu\text{M}$ in 786_0 Zellen und von $0,26 \pm 0,11 \mu\text{M}$ für HeLa Zellen bestimmt werden, somit besitzt Zidovudin eine höhere Sensitivität gegenüber HERV-K(HML-2) als HIV-1. Die berechneten IC₅₀-Werte in 786_0 und HeLa Zellen für HIV-1 liegen deutlich über dem IC₅₀-Wert von $0,002 \mu\text{M}$, der in PBMCs bestimmt wurde. Mögliche Erklärungen könnten sein, dass einerseits die Anzahl der Kanäle für die Wirkstoffe auf der Zelloberfläche der HeLa bzw. 786_0 Zellen in einer etwas geringeren Konzentration gegenüber den PBMCs exprimiert wurden oder andererseits die Inhibitoren in den HeLa bzw. 786_0 Zellen schneller aus der Zelle transportiert werden könnten.

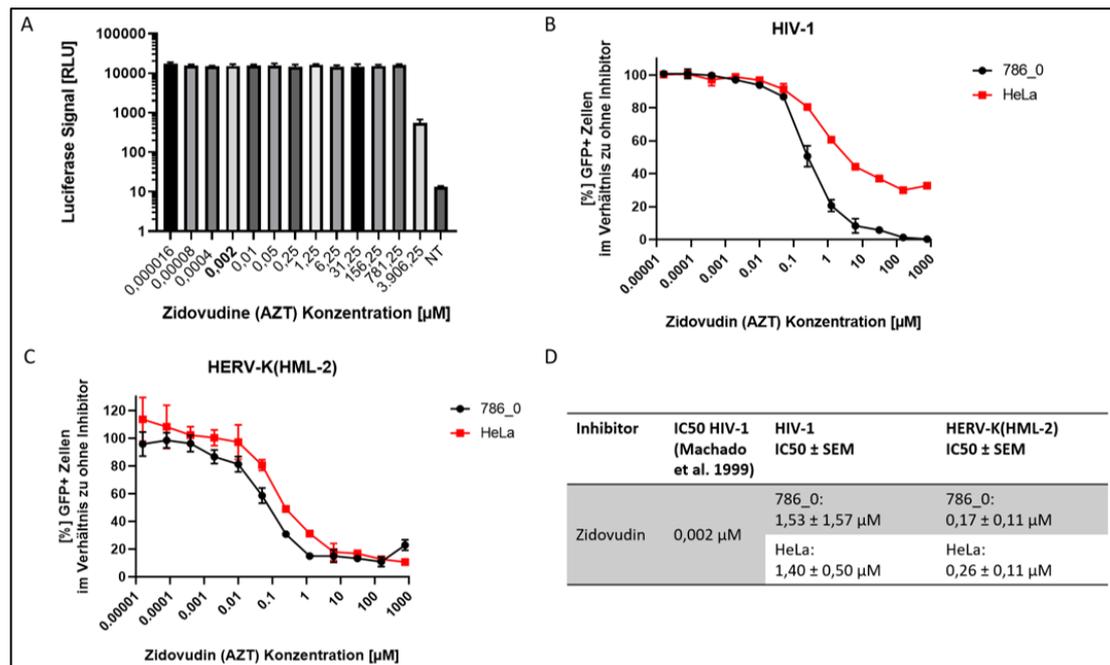


Abbildung 32: Das Thymidinanalogon Zidovudin inhibiert die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Infektion.

[A] Für die Zidovudin Zytotoxizitätsanalyse wurde ein Luciferase Konstrukt (pGL3-Promoter Plasmid) in 293T Zellen transfiziert und in Abhängigkeit der verschiedenen Zidovudin Konzentrationen die Luciferase Konzentration in den Zelllysaten gemessen. Der IC50-Wert von **0,002 μM** für Zidovudin, der für HIV-1 in PBMCs bestimmt wurde (Machado et al. 1999), wurde in der x-Achse hervorgehoben. NT steht für nicht transfiziert. Für die Inhibierungsanalyse wurden 786_0 oder HeLa Zellen zu den jeweiligen Zidovudin Konzentrationen mit VSV-G pseudotypisierten HIV-1 GFP Viren [B] oder HERV-K_{CON} Viren [C] infiziert. [D] Darstellung der ermittelten IC50-Werte für Zidovudin aus zwei unabhängigen Experimenten für HIV und HERV, die in 786_0 und HeLa Zellen bestimmt wurden.

4.3.1.1.2 NRTI Stavudin (2',3'-Didehydro-3'-deoxythymidine, d4T) inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion

Stavudin wurde genauso wie Zidovudin von Jerome P. Horwitz synthetisiert und ist ebenfalls ein Thymidin Nucleosidanalogon. Durch eine Dehydratisierung der 2` und 3` Position der Desoxyribose von Thymidin entstand eine Doppelbindung und somit Stavudin (Horwitz et al. 1966).

In einer T-Zelllinie wurde für HIV-1 ein IC₅₀-Wert von 0,15 µM bestimmt (Riddler et al. 1995) und Stavudin zeigte im Konzentrationsbereich von 0,0012 bis 468,75 µM keinen zytotoxischen Effekt (siehe Abb. 33 A). Für HIV-1 und HERV-K(HML-2) wurde eine vollständige Inhibierung der Virusinfektion bei steigenden Stavudin Konzentrationen in 786_0 und HeLa gemessen, da sich die Anzahl der GFP positiven Zellen reduzierte (siehe Abb. 33 B & C). Die ermittelten IC₅₀-Werte liegen für HIV-1 in 786_0 Zellen bei $6,98 \pm 1,36$ µM und in den HeLa Zellen bei $10,86 \pm 2,55$ µM und für HERV-K(HML-2) in 786_0 bei $4,32 \pm 0,34$ µM und in HeLa Zellen bei $4,68 \pm 1,45$ µM (siehe Abb. 33 D), somit hat Stavudin eine höhere Sensitivität gegenüber HERV-K(HML-2) als HIV-1.

Zidovudin und Stavudin als Thymidinanaloga haben auf Grundlage der höheren Sensitivität gegenüber HIV-1 eine gute Grundvoraussetzung als Therapeutikum gegen HERV-K(HML-2) aus der Gruppe der nukleosidischen reversen Transkriptase Inhibitoren eingesetzt zu werden.

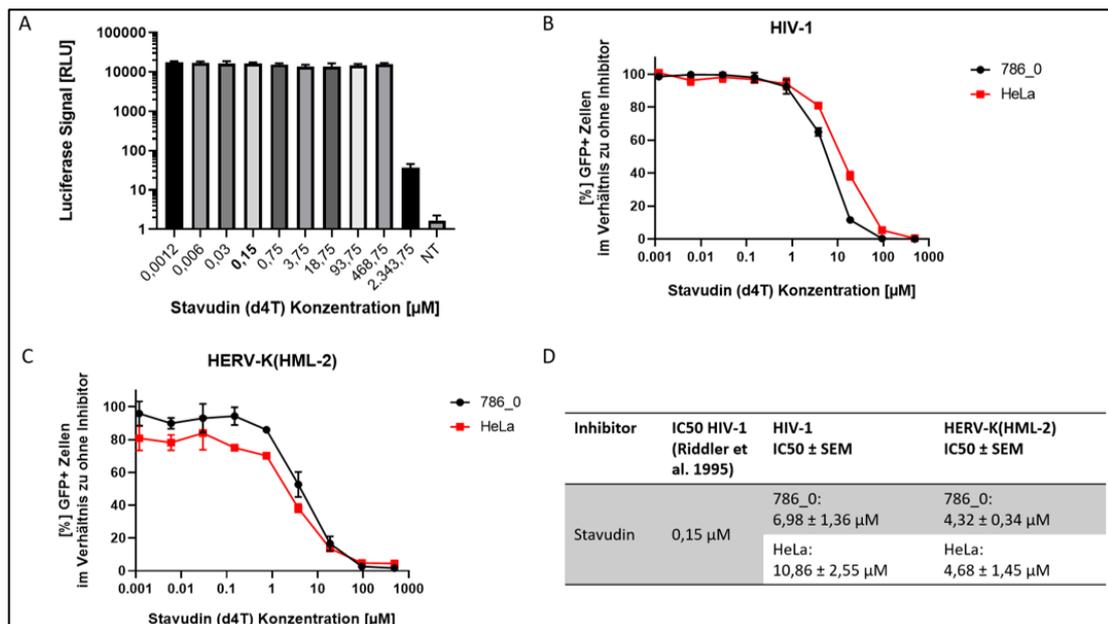


Abbildung 33: Das zweite Thymidinanaloga Stavudin reduziert die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Infektion.

[A] Zytotoxizitätsanalyse: gemessene Luciferase Konzentration bei unterschiedlichen Stavudin Konzentrationen. **0,15 µM** ist der publizierte IC₅₀-Wert für HIV-1 (Riddler et al. 1995). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Inhibierungskurven für HIV-1 [B] und HERV-K(HML-2) [C] bei steigenden Stavudin Konzentrationen

[D] ermittelter IC50-Wert für Stavudin für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 786_0 und HeLa-Zellen aus zwei unterschiedlichen Experimenten.

4.3.1.1.3 NRTI Lamivudin (3TC) reduziert geringfügig die HERV-K(HML-2) Infektion

Lamivudin ist eine Cytidinanalogon, der im Konzentrationsbereich von 0,00008 bis 781,25 μM eingesetzt werden kann (siehe Abb. 34 A). Der publizierte IC50-Wert für Lamivudin liegt bei 0,01 μM für HIV-1 (Balzarini et al. 1996). Für HIV-1 wurde eine vollständige Inhibierung der Infektion bei steigenden Lamivudin Konzentrationen in 786_0 und HeLa Zellen bestimmt (siehe Abb. 34 B), wohingegen für HERV-K(HML-2) nur eine Reduktion der Infektion bei steigenden Lamivudin Konzentrationen in 786_0 und HeLa Zellen nachgewiesen wurde (siehe Abb. 34 C). Die ermittelten IC50-Werte belegen das Lamivudin eine niedrigere Sensitivität für HERV-K(HML-2) gegenüber HIV-1 besitzt (siehe Abb. 34 D). Darüber hinaus wurde eine deutlich höhere Lamivudin Konzentration im Gegensatz zum publizierten IC50-Wert von 0,01 μM benötigt, um in den 786_0 und HeLa Zellen eine 50 % Inhibierung der HIV-1 Infektion zu erhalten.

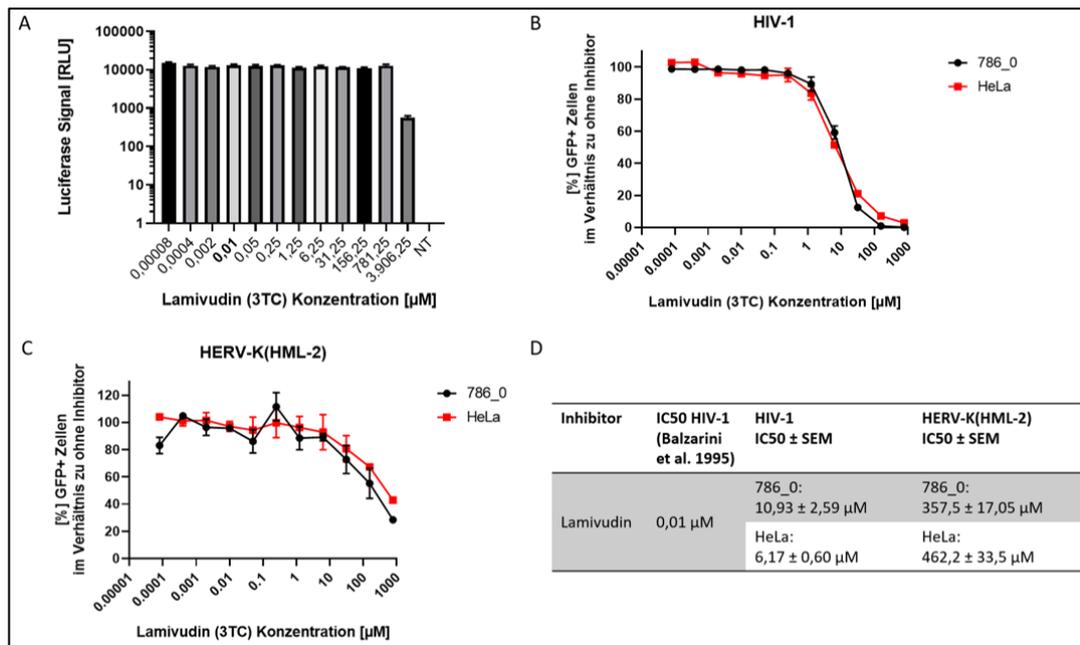


Abbildung 34: Das Cytosinanaloga Lamivudin inhibiert nur bei hohen Konzentrationen die HERV-K(HML-2) Infektion.

[A] Zytotoxizitätsanalyse: gemessene Luciferase Konzentration bei unterschiedlichen Lamivudin Konzentrationen. **0,01 μM** ist der publizierte IC50-Wert für HIV-1 (Riddler et al. 1995). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Inhibierungskurven für HIV-1 [B] und HERV-K(HML-2) [C] bei steigenden Lamivudin Konzentrationen

[D] ermittelter IC50-Wert für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 786_0 und HeLa-Zellen aus zwei unterschiedlichen Experimenten.

4.3.1.1.4 NRTI Zalcitabin (ddC) inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion

Zalcitabin ist ebenfalls ein Cytosinanalogen und für HIV-1 wurde ein IC50-Wert von 0,04 μM publiziert (Balzarini et al. 1996). Für die weiterführenden Experimenten konnte ein Konzentrationsbereich von 0,00032 bis 625 μM verwendet werden (siehe Abb. 35 A). Im Gegensatz zum Cytosinanalogen Lamivudin konnte jetzt eine vollständige Inhibierung der HIV-1 wie auch HERV-K(HML-2) Infektion nachgewiesen werden (siehe Abb. 35 B & C). Bei den 786_0 Zellen wurde ein IC50-Wert für HIV-1 von 15,03 \pm 0,94 μM und für HERV-K(HML-2) von 18,05 \pm 1,86 μM bestimmt, woraus sich eine geringfügige niedrige Zalcitabin Sensitivität für HERV-K(HML-2) gegenüber HIV-1 ergab (siehe Abb. 35 D). Andererseits wurde in

Hela Zellen eine geringfügig höhere Zalcitabin Sensitivität für HERV-K(HML-2) (IC_{50} $3,85 \pm 1,19 \mu M$) gegenüber HIV-1 (IC_{50} $4,06 \pm 1,38 \mu M$) nachgewiesen (siehe Abb. 35 D), sodass daraus geschlossen werden kann, dass eine gleiche Zalcitabin Sensitivität für HERV-K(HML-2) und HIV-1 vorhanden ist.

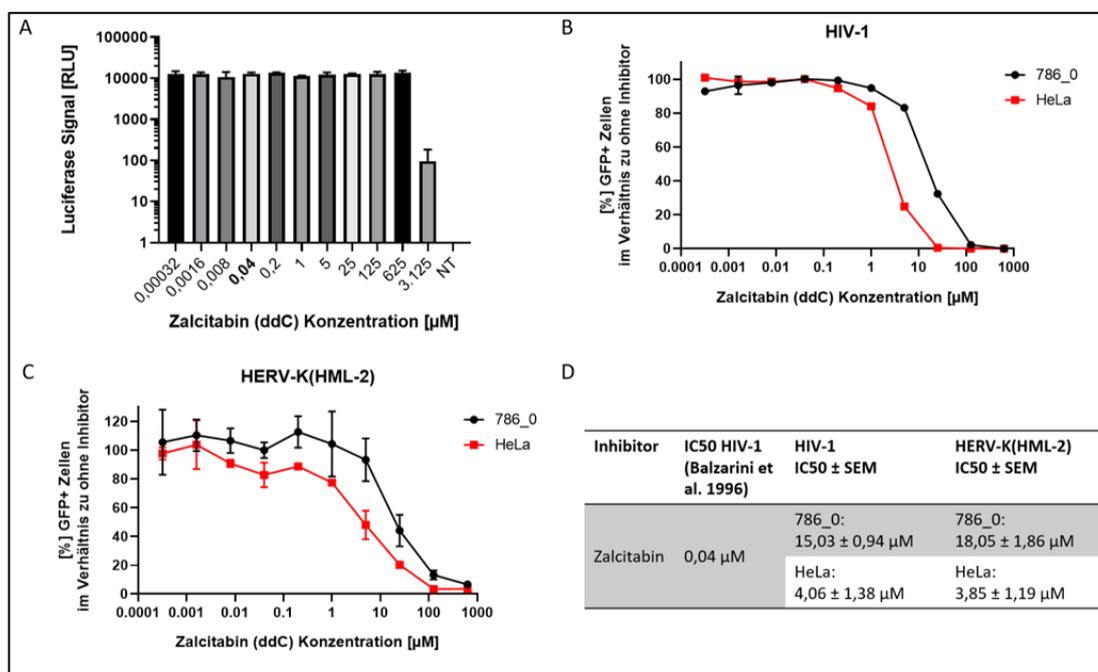


Abbildung 35: Das Cytosinanalogen Zalcitabin inhibiert die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Infektion mit ähnlichen IC_{50} -Werte.

[A] Zytotoxizitätsanalyse: gemessene Luciferase Konzentration bei unterschiedlichen Zalcitabin Konzentrationen. $0,04 \mu M$ ist der publizierte IC_{50} -Wert für HIV-1 (Balzarini et al. 1996). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Inhibierungskurven für HIV-1 [B] und HERV-K(HML-2) [C] bei steigenden Zalcitabin Konzentrationen.

[D] ermittelter IC_{50} -Wert für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 786_0 und HeLa-Zellen aus zwei unterschiedlichen Experimenten.

4.3.1.1.5 NRTI Emtricitabin (FTC) beeinflusst die HERV-K(HML-2) Infektion

Der letzte verwendete Cytosinanalogen ist Emtricitabin. Für die serielle Verdünnungsreihe wurde der IC_{50} -Wert von $0,36 \mu M$ für HIV-1 herangezogen (Maeda et al. 2014) und für alle weiterführenden Experimente konnte eine

Konzentrationsspanne von 0,00288 bis 5,625 μM verwendet werden (siehe Abb. 36 A). Mit steigender Emtricitabin Konzentration reduzierte sich die HIV-1 Infektion in 786_0 und HeLa Zellen und die HERV-K(HML-2) Infektion in 786_0 Zellen (siehe Abb. 36 B & C), sodass Emtricitabin einen Einfluss auf die HERV-K(HML-2) wie auch HIV-1 Infektion besaß. Durch die ermittelten IC50-Werte konnte geschlossen werden, dass Emtricitabin eine geringere Sensitivität für HERV-K(HML-2) gegenüber HIV-1 besitzt (siehe Abb. 36 D).

Zusammenfassend zeigte die Gruppe der Cytosinanalogen eine Reduktion der HERV-K(HML-2) Infektionen, aber nur Zalcitabin zeigte eine gleiche Sensitivität im Vergleich zu HIV-1 und sollte nach dem jetzigen Stand der Untersuchungen als mögliches Therapeutikum aus der Gruppe der Cytosinanalogen verwendet werden.

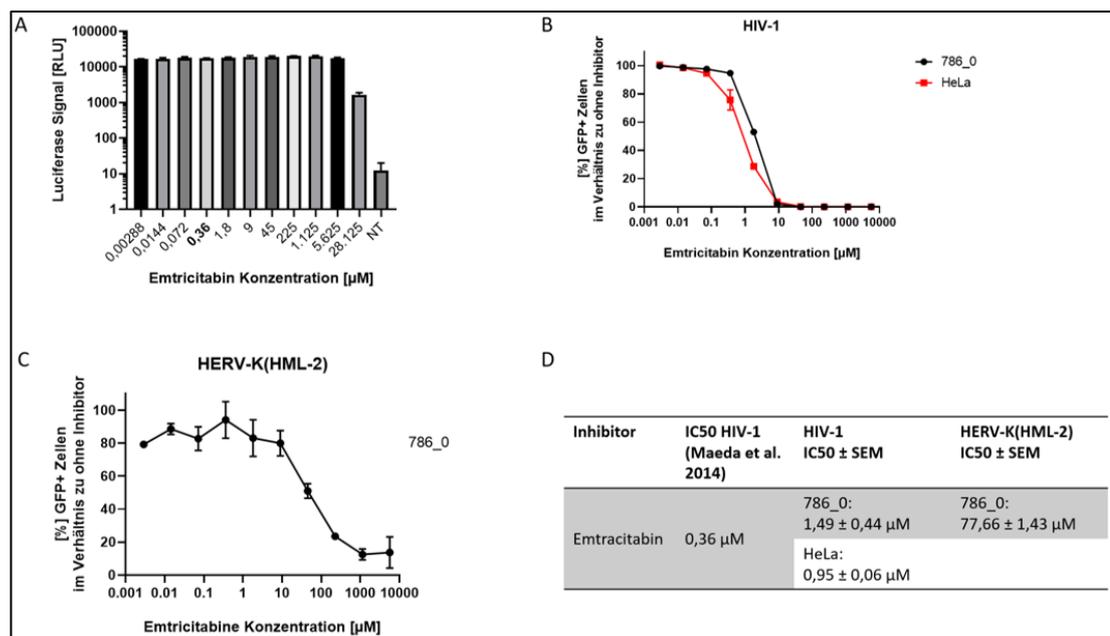


Abbildung 36: Das Cytosinanalogon Emtricitabin inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion mit geringerer Sensitivität gegenüber HIV-1.

[A] Zytotoxizitätsanalyse: gemessene Luciferase Konzentration bei unterschiedlichen Emtricitabin Konzentrationen. **0,36 μM** ist der publizierte IC50-Wert für HIV-1 (Maeda et al. 2014). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Inhibierungskurven für HIV-1 [B] und HERV-K(HML-2) [C] bei steigenden Emtricitabin Konzentrationen.

[D] ermittelter IC50-Wert für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 786_0 und HeLa-Zellen aus zwei unterschiedlichen Experimenten.

4.3.1.2 Nukleotidische reverse Transkriptase Inhibitoren (NtRTI)

Die Inhibierung der NtRTIs erfolgte in gleicher Weise wie die NRTIs. Der einzige Unterschied besteht darin, dass Nukleosidmonophosphatanaloga von den Zellen aufgenommen wurde.

4.3.1.2.1 NtRTI Tenofoviridisoproxilfumarat (TDF) zeigt eine vollständige Inhibierung der HERV-K(HML-2) Infektion

Tenofoviridisoproxilfumarat (TDF) ist ein Adenosin-Nukleotidanalogen und für die Inhibierungsexperimente wurde ein Konzentrationsbereich von 0,002 bis 78,125 μM verwendet (siehe Abb. 37 A). Die Verdünnungsstufen richteten sich nach dem publizierten IC50-Wert für HIV-1 von 0,025 μM (Maeda et al. 2014). Für HIV-1 und HERV-K(HML-2) konnte eine vollständige Inhibierung der Infektion bei steigenden Tenofovir Konzentrationen in 786_0 und HeLa Zellen bestimmt werden (siehe Abb. 37 B & C). Auf Grundlage der berechneten IC50-Werte konnte geschlussfolgert werden, dass Tenofovir eine höhere Sensitivität für HERV-K(HML-2) gegenüber HIV-1 besitzt (siehe Abb. 37 D) und eignet sich somit bestens als Therapeutikum, um in möglichen klinischen Studien im Zusammenhang mit einer HERV-K(HML-2) Überexpression angewendet zu werden.

Zusammenfassend sind die nukleosidischen und nukleotidischen reversen Transkriptase Inhibitoren eine gute Grundlage für eine mögliche Kombinationstherapie gegenüber HERV-K(HML-2).

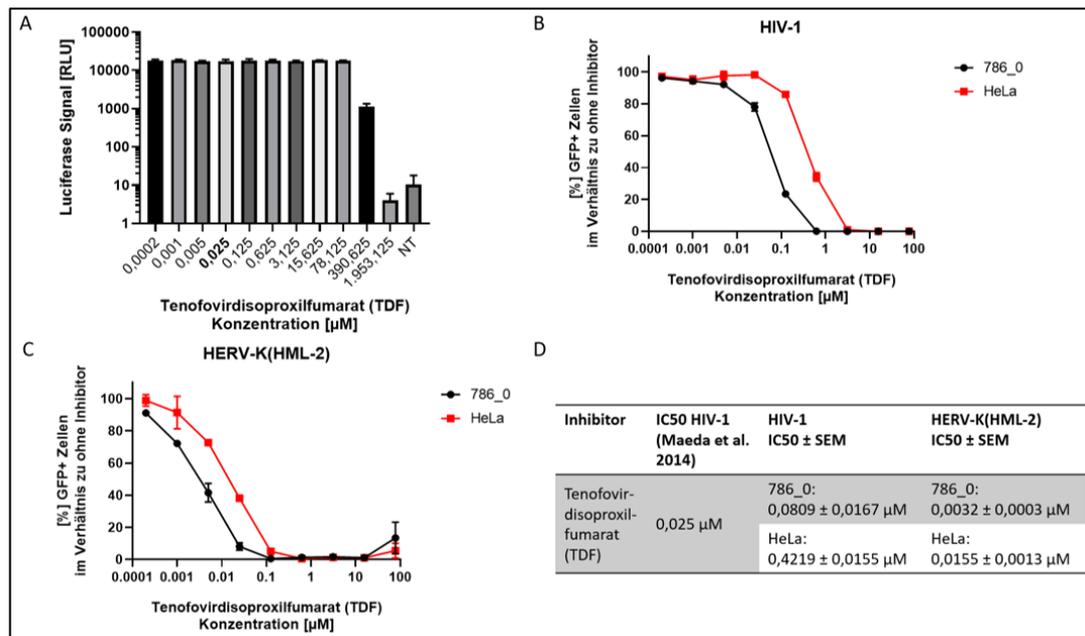


Abbildung 37: Das Adenosinnukleotidanalogon Tenofovirdisoproxilfumarat (TDF) inhibiert schon bei geringsten Konzentrationen die HERV-K(HML-2) Infektion.

[A] TDF Zytotoxizitätsanalyse: Änderung der Luciferase Konzentration bei steigenden TDF Konzentrationen. **0,025 μM** ist der publizierte IC₅₀-Wert für HIV-1 (Maeda et al. 2014). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Reduktion der GFP+ 786_0 und HeLa Zellen bei steigenden TDF Konzentrationen, die mit pseudotypisierten HIV-1 GFP Viren [B] oder HERV-K_{CON} Viren [C] infiziert wurden.

[D] Darstellung der ermittelten IC₅₀-Werte für TDF aus zwei unabhängigen Experimenten für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 786_0 und HeLa Zellen.

4.3.1.3 Nicht nukleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI)

Die nicht nukleosidischen reversen Transkriptase Inhibitoren (NNRTI) sind eine Gruppe von kleinen hydrophoben Molekülen (<600 Da) und binden direkt und nicht-kompetitiv an die reverse Transkriptase. Die Bindestelle liegt nahe am aktiven Zentrum des Enzyms, wodurch eine Konformationsänderung induziert wird. Das hat zur Folge, dass die Bindung der Nukleotide erschwert und die Polymerisation verlangsamt wird, sodass eine Hemmung der Virusreplikation erfolgt. Im Gegensatz zu den NRTI müssen die NNRTI nicht von der Zelle aktiviert werden (Sluis-Cremer et al. 2004).

4.3.1.3.1 NNRTI Etravirin beeinflusst die HERV-K(HML-2) Infektion nicht

Alle weiterführenden Experimente für Etravirin erfolgten im Konzentrationsbereich von 0,0112 bis 874 nM, da Etravirin in dieser Konzentrationsspanne keine zytotoxische Wirkung zeigte (siehe Abb. 38 A). Der publizierte IC₅₀-Wert für HIV-1 liegt bei 1,4 nM (Andries et al. 2004). Eine Inhibierung der Infektion bei steigenden Etravirin Konzentrationen erfolgte nur für die HIV-1 in 786_0 mit einem IC₅₀-Wert von $9,29 \pm 0,9$ nM und in HeLa mit einem IC₅₀-Wert von $7,99 \pm 2,27$ nM (siehe Abb. 38 B & D). Für die HERV-K(HML-2) Viren konnte keine Reduktion der GFP positiven Zellen bei steigenden Etravirin Konzentrationen gemessen werden (siehe Abb. 38 C), somit hat Etravirin keinen Einfluss auf die HERV-K(HML-2) Infektion.

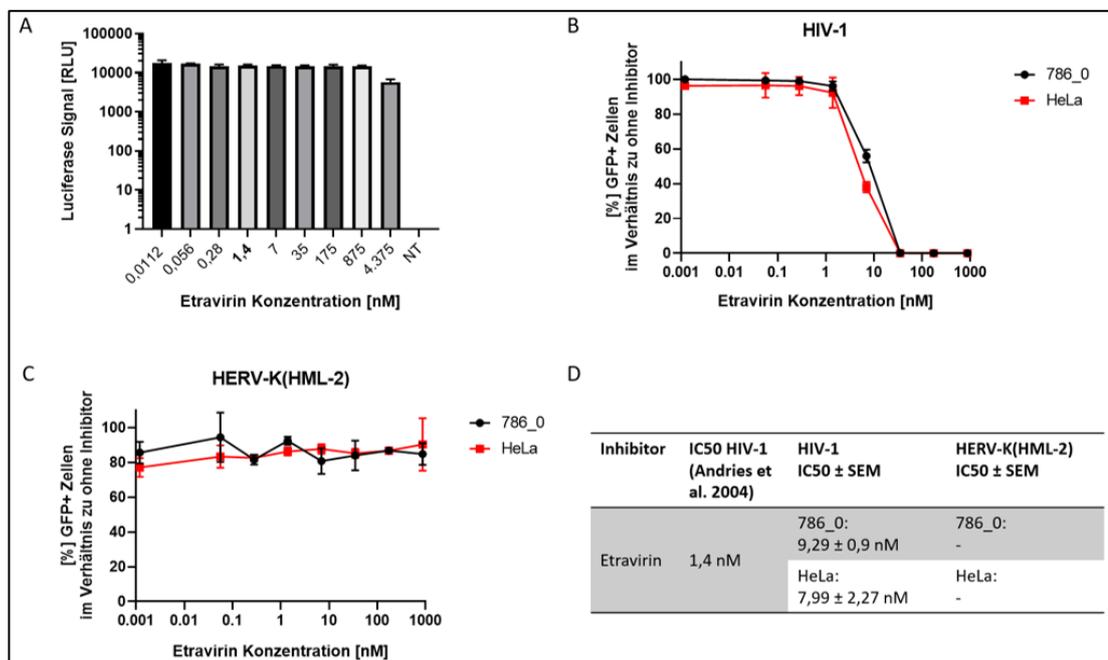


Abbildung 38: Das NNRTI Etravirin zeigt keine Beeinflussung der HERV-K(HML-2) Infektion.

[A] Änderungen der Luciferase Konzentration bei steigenden Etravirin Konzentrationen in den Zelllysaten. **1,4 nM** ist der IC₅₀-Wert für HIV-1 (Andries et al. 2004). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Inhibierungsanalysen bei steigenden Etravirin Konzentrationen mit VSV-G pseudotypisierten HIV-1 GFP Viren [B] oder HERV-K_{CON} Viren [C] in 786_0 und HeLa Zellen.

[D] Darstellung der ermittelten IC50-Werte für Etravirin aus zwei unabhängigen Experimenten für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 786_0 und HeLa Zellen.

4.3.1.3.2 NNRTI Nevirapin (NVP) ist kein Inhibitor die HERV-K(HML-2) Infektion

Der zweite Vertreter aus der Gruppe der NNRTIs ist der Wirkstoff Nevirapin, der im Konzentrationsbereich von 0,32 bis 125.000 nM verwendet werden konnte (siehe Abb. 39 A). Die serielle Verdünnungsreihe richtete sich nach dem publizierten IC50-Wert für HIV-1, der bei 40 nM liegt (Grob et al. 1992). Für Nevirapin sind die Ergebnisse ähnlich wie bei Etravirin, sodass nur die HIV-1 Infektion bei steigenden Nevirapin Konzentrationen inhibiert, jedoch die HERV-K(HML-2) Infektion durch Nevirapin nicht beeinträchtigt wurde (siehe Abb. 40 B, C & D). Daraufhin kann geschlussfolgert werden, dass die Gruppe der NNRTIs anhand der Wirkstoffe Nevirapin und Etravirin nicht an die HERV-K(HML-2) reverse Transkriptase binden können und somit die enzymatische Aktivität der HERV-K(HML-2) reversen Transkriptase nicht beeinträchtigt wurde.

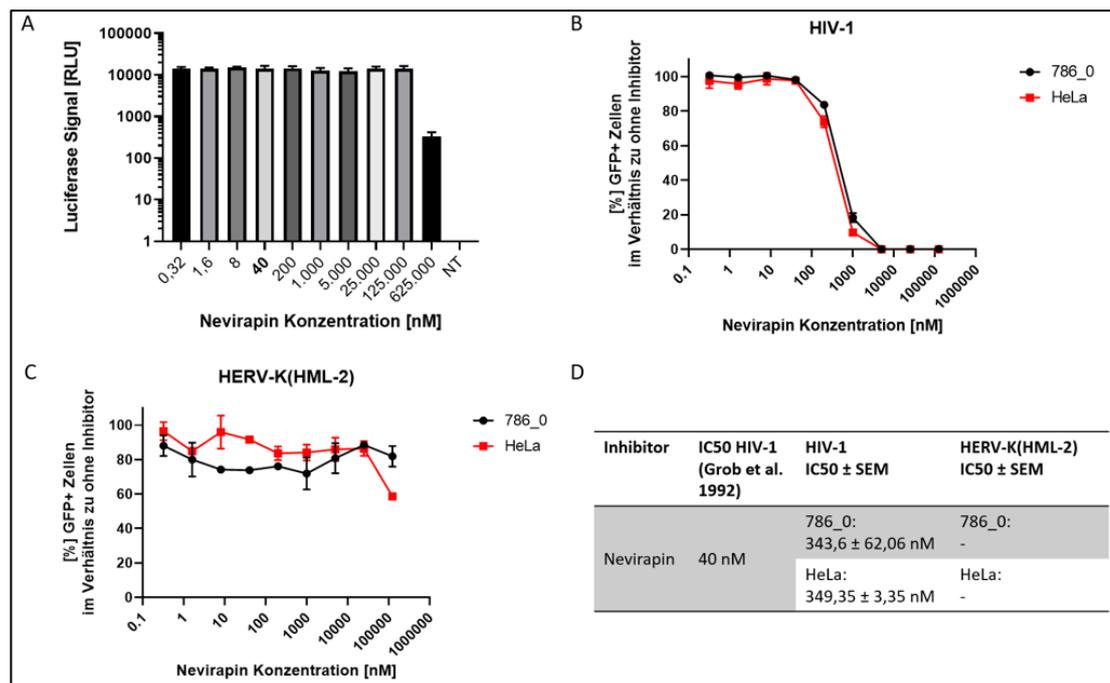


Abbildung 39: Auch das zweite NNRTI Nevirapin inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion nicht.

[A] Änderungen der Luciferase Konzentration bei steigenden Nevirapin Konzentrationen in den Zelllysaten. **40 nM** ist der IC50-Wert für HIV-1 (Grob et al. 1992). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Inhibierungsanalysen bei steigenden Nevirapin Konzentrationen mit VSV-G pseudotypisierten HIV-1 GFP Viren [B] oder HERV-K_{CON} Viren [C] in 786_0 und HeLa Zellen.

[D] Darstellung der ermittelten IC50-Werte für Nevirapin aus zwei unabhängigen Experimenten für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 786_0 und HeLa Zellen.

4.3.2 Integraseinhibitoren

Die verwendeten Integraseinhibitoren gehören zu den Strangtransferinhibitoren und verhindern die irreversible Bindung der Hydroxylenden der viralen DNA an die Phosphodiesterbrücken der Wirts-DNA (Lataillade & Kozal 2006).

4.3.2.1 Integraseinhibitor Elvitegravir reduziert die HERV-K(HML-2) Infektion

Für Elvitegravir liegt der publizierte IC50-Wert für HIV-1 bei 0,4 nM (Roquebert et al. 2008) und für die Inhibierungsexperimenten konnte ein Konzentrationsbereich von 0,032 bis 6.250 nM verwendet werden (siehe Abb. 40 A). Bei steigenden Elvitegravir Konzentrationen wurde eine vollständige Inhibierung der HIV-1 Infektion in 786_0 und in HeLa Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 40 B & D), wohingegen für HERV-K(HML-2) eine deutlich höhere Elvitegravir Konzentrationen eingesetzt werden musste, um eine Reduktion der HERV-K(HML-2) Infektion zu erzielen (siehe Abb. 40 C & D). Daraufhin kann geschlossen werden, dass Elvitegravir eine niedrige Sensitivität für HERV-K(HML-2) gegenüber HIV-1 besitzt.

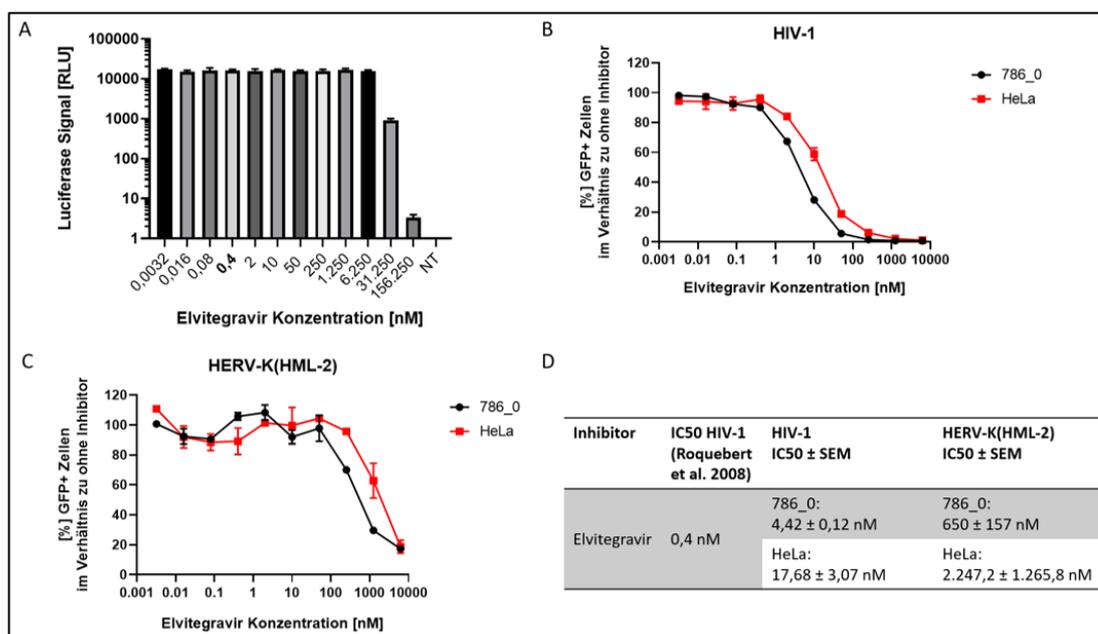


Abbildung 40: Der Integraseinhibitor Elvitegravir inhibiert die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Infektion mit einer niedrigeren Sensitivität für HERV-K(HML-2) gegenüber HIV-1.

[A] Elvitegravir Zytotoxizitätsanalyse: Änderung der Luciferase Konzentration bei steigenden Elvitegravir Konzentrationen. **0,4 nM** ist der IC50-Wert für HIV-1 (Roquebert et al. 2008). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Inhibierungsanalyse: prozentuale Verhältnis der GFP+ Zellen bei steigenden Elvitegravir Konzentrationen in 786_0 und HeLa Zellen nach erfolgter HIV-1 [B] und HERV-K_{CON} [C] Infektion

[D] ermittelten IC50-Werte für Elvitegravir aus zwei unabhängigen Experimenten für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 786_0 und HeLa Zellen.

4.3.2.2 Integraseinhibitor Raltegravir inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion

Raltegravir ist der zweiten Vertreter der Integraseinhibitoren und der publizierte IC50-Wert für HIV-1 liegt bei 3 nM (Roquebert et al. 2008). Die Luciferase Konzentration änderte sich im Konzentrationsbereich von 0,024 bis 46.875 nM nicht, sodass alle weiterführenden Experimente innerhalb dieser Konzentrationsspanne erfolgen konnten (siehe Abb. 42 A). Im Gegensatz zu Elvitegravir wurden bei steigenden Raltegravir Konzentrationen die HIV-1 wie auch die HERV-K(HML-2) Infektion mit ähnlichen IC50-Werte in HeLa sowie in 786_0 Zellen inhibiert (siehe Abb. 42 B, C & D), sodass Raltegravir eine gleiche Sensitivität für HIV-1 wie auch HERV-K(HML-2) besitzt.

Zusammenfassend inhibiert die Gruppe der Integraseinhibitoren die HERV-K(HML-2) Infektion jedoch mit einer unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber HIV-1, sodass bei einer möglichen Kombinationstherapie gegenüber HERV-K(HML-2) der Wirkstoff Raltegravir anstatt Elvitegravir genutzt werden sollte.

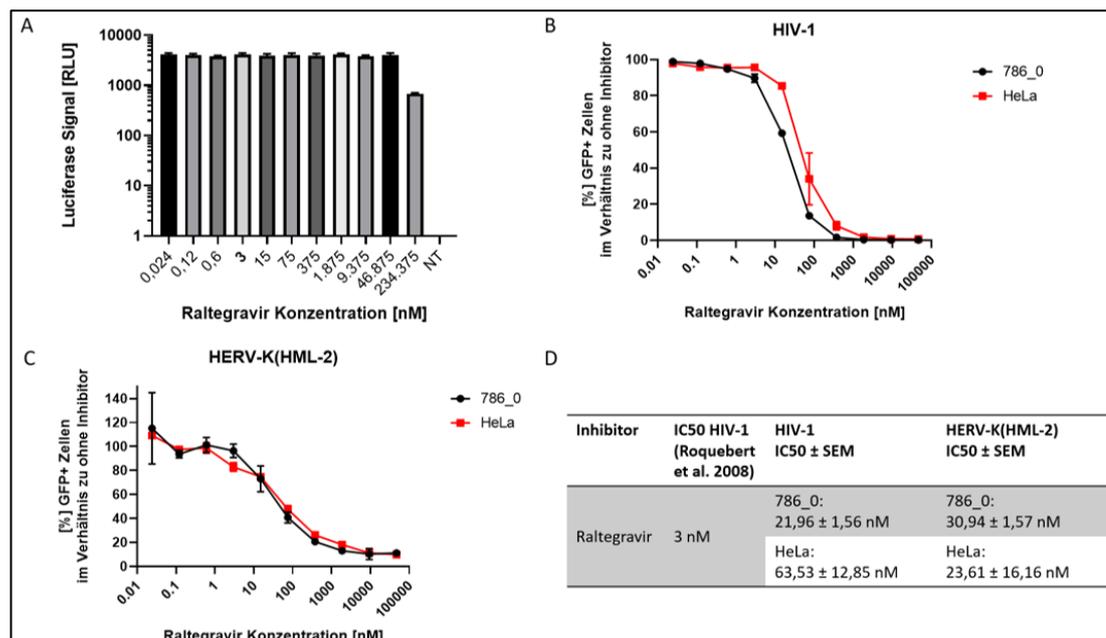


Abbildung 41: Der Integraseinhibitor Raltegravir inhibiert die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Infektion mit gleicher Sensitivität.

[A] Raltegravir Zytotoxizitätsanalyse: Änderung der Luciferase Konzentration bei steigenden Raltegravir Konzentrationen. **3 nM** ist der IC50-Wert für HIV-1 (Roquebert et al. 2008). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Inhibierungsanalyse: prozentuale Verhältnis der GFP+ Zellen bei steigender Raltegravir Konzentrationen in 786_0 und HeLa Zellen nach erfolgter HIV-1 [B] und HERV-K_{CON} [C] Infektion

[D] ermittelten IC50-Werte für Raltegravir aus zwei unabhängigen Experimenten für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 786_0 und HeLa Zellen.

4.3.3 Proteaseinhibitoren

Die HIV-1 Protease ist eine Aspartatprotease, die spezifische Aminosäuresequenzen (Phenylalanin-Prolin oder Tyrosin-Prolin) erkennt und die hydrolytische Spaltung des Gag und des Gag-Pol Polyproteins in die jeweiligen Strukturproteine katalysiert, um die Reifung von infektiösen viralen Partikeln zu gewährleisten. Die HIV-1 Proteaseinhibitoren sind Analogon, die diese spezifische Aminosäuresequenz nachahmt und kann somit an die aktive Bindestelle der HIV-1 Protease binden, wodurch die Partikelreifung inhibiert wird (Flexner 1998).

4.3.3.1 Proteaseinhibitor Amprenavir inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion nicht

Für die Herstellung der Amprenavir Verdünnungsreihe wurde die publizierte IC50-Spanne von 12-80 nM für HIV-1 herangezogen (Lv et al. 2015). Im Konzentrationsbereich zwischen 0,4 bis 31.250 nM änderte sich die Luciferase Konzentration nicht, sodass alle weiterführenden Experimente innerhalb dieser Spanne erfolgen konnten (siehe Abb. 42 A).

Die Durchführung der Inhibierungsexperimente musste für die Proteaseinhibitoren angepasst werden, weil diese Wirkstoffe die Reifung der Viren und damit die Entstehung von infektiösen Viren verhindern. Daraufhin waren die Proteaseinhibitoren während der Herstellung von viralen HIV-1 und HERV-K(HML-2) Partikeln anwesend. Nach Aufkonzentrierung dieser Viren wurden 293T Zellen infiziert und die Anzahl der GFP positiven Zellen über FACS bestimmt.

Bei steigenden Amprenavir Konzentrationen nahm die Anzahl der GFP positiven Zellen bei HIV-1 ab, somit wurde die Herstellung von infektiösen HIV-1 Partikeln durch die Anwesenheit von Amprenavir inhibiert. In den 293T Zellen konnte ein IC50-Wert für HIV-1 von $121,25 \pm 4,05$ nM bestimmt werden und befindet sich in der Nähe des publizierten IC50-Wertes von 12-80 nM (siehe Abb. 42 B & D). Amprenavir inhibiert die Reifung von infektiösen HERV-K(HML-2) Partikeln nicht, woraufhin keine Reduktion der GFP positiven 293T Zellen im FACS gemessen wurde (siehe Abb. 42 C).

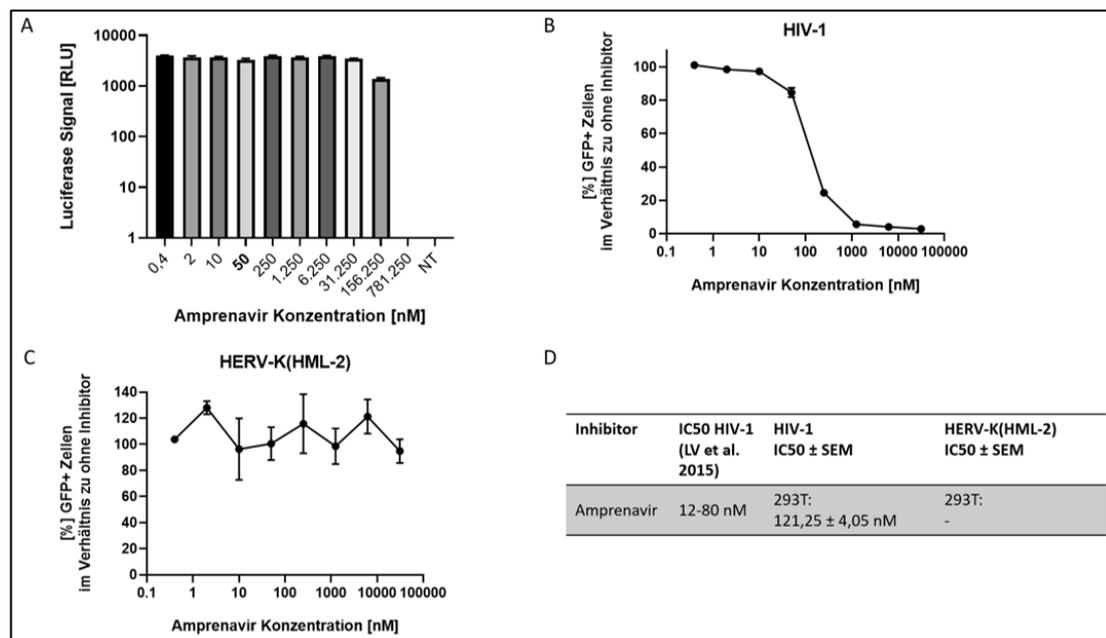


Abbildung 42: Proteaseinhibitor Amprenavir inhibiert die HERV-K(HML-2) Infektion nicht

[A] Amprenavir Zytotoxizitätsanalyse: Darstellung der Luciferase Konzentration bei unterschiedlichen Amprenavir Konzentrationen in den Zelllysaten. 12-80 nM ist der IC50-Wert für HIV-1 (Lv et al. 2015). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Bei der Herstellung von VSV-G pseudotypisierten HIV-1 GFP Viren [B] und HERV-K_{CON} Viren [C] waren unterschiedliche Amprenavir Konzentrationen vorhanden. Nach erfolgter Aufkonzentrierung dieser HIV-1 und HERV-K_{CON} Viren wurden 293T Zellen infiziert und die Anzahl der GFP positiven Zellen übers FACS bestimmt, woraus sich die Inhibierungskurve ergab.

[D] ermittelten IC50-Werte für Amprenavir aus zwei unabhängigen Experimenten für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 293T Zellen.

4.3.3.2 Der Proteaseinhibitor Darunavir ist kein Inhibitor der HERV-K(HML-2) Infektion

Für Darunavir wurde ein IC50-Wert von 1-2 nM für HIV-1 publiziert (Lv et al. 2015). Darunavir zeigte im Konzentrationsbereich von 0,016 bis 31.250 nM keine Zytotoxizität (siehe Abb. 43 A) und inhibiert die Reifung zu infektiösen HIV-1 Viren (siehe Abb. 43 B). Der ermittelte IC50-Wert für HIV-1 von $2,79 \pm$

0,62 nM in 293T Zellen entspricht dem publizierten IC₅₀-Wert von 1-2 nM (siehe Abb. 43 D). Dagegen hat Darunavir keinen Einfluss auf die Reifung der HERV-K(HML-2) Viren und änderte die Anzahl der GFP positiven Zellen nicht (siehe Abb. 43 C).

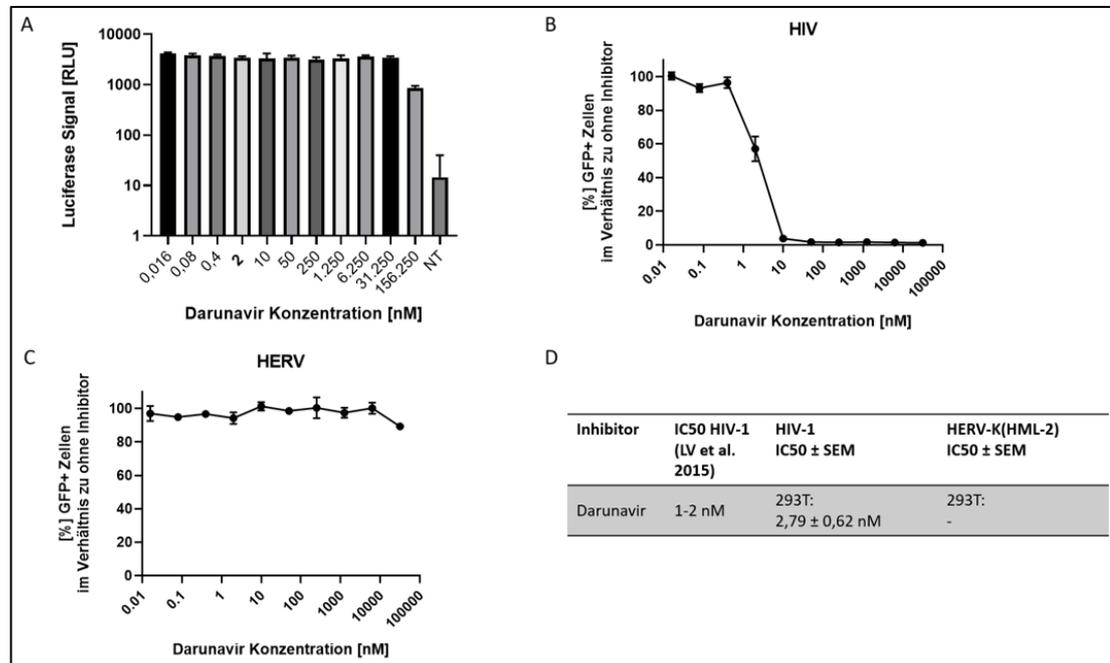


Abbildung 43: Auch der zweite Proteaseinhibitor Darunavir beeinflusst die HERV-K(HML-2) Infektion nicht.

[A] Darunavir Zytotoxizitätsanalyse: Darstellung der Luciferase Konzentration bei unterschiedlichen Darunavir Konzentrationen in den Zelllysaten. **2 nM** ist der IC₅₀-Wert für HIV-1 (Lv et al. 2015). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Bei der Herstellung von VSV-G pseudotypisierten HIV-1 GFP Viren [B] und HERV-K_{CON} Viren [C] waren unterschiedliche Darunavir Konzentrationen vorhanden. Nach erfolgter Aufkonzentrierung dieser HIV-1 und HERV-K_{CON} Viren wurden 293T Zellen infiziert und die Anzahl der GFP positiven Zellen übers FACS bestimmt, woraus sich die Inhibierungskurve ergibt.

[D] ermittelten IC₅₀-Werte für Darunavir aus zwei unabhängigen Experimenten für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 293T Zellen.

4.3.3.3 Proteaseinhibitor Indinavir beeinflusst die HERV-K(HML-2) Infektion nicht

Für die Herstellung der Indinavir Verdünnungsreihe wurde der publizierte IC50-Wert von 5,5 nM für HIV-1 herangezogen (Lv et al. 2015). Für alle weiterführenden Experimente wurde eine Indinavir Konzentrationsspanne von 0,044 bis 85.938,5 nM verwendet (siehe Abb. 44 A). Wie zuvor bei Amprenavir und Darunavir beeinflusste Indinavir ebenfalls die Reifung der HIV-1 Partikel jedoch nicht die Reifung der HERV-K(HML-2) Partikel, sodass ein IC50-Wert für HIV-1 von $49,75 \pm 13,47$ nM bestimmt werden konnte (siehe Abb. B, C & D).

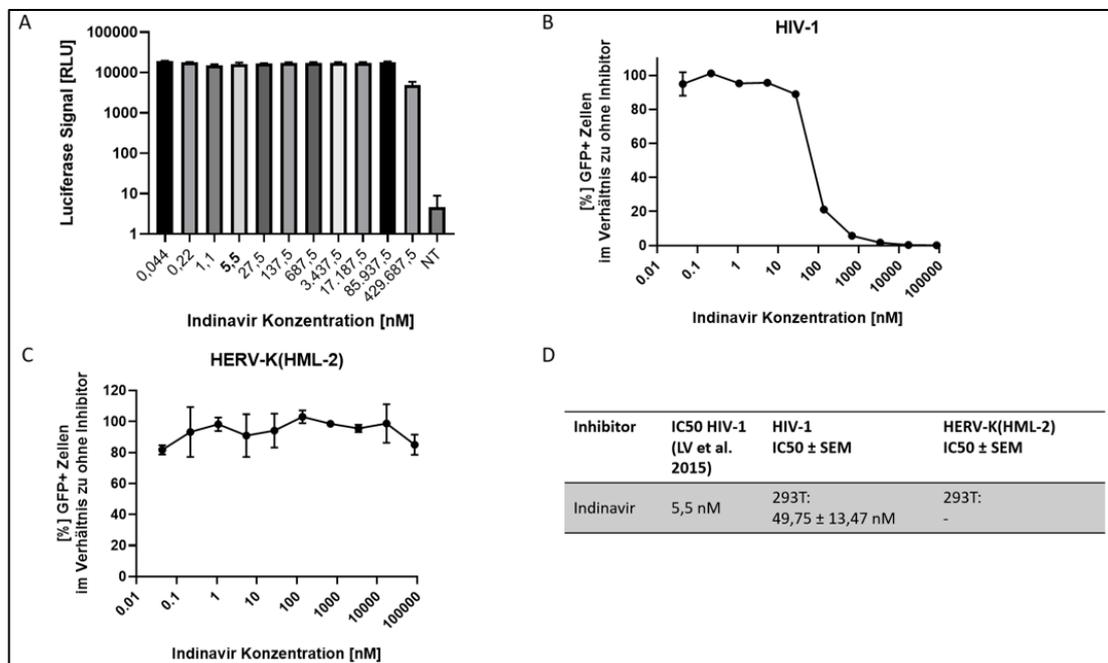


Abbildung 44: Der dritte Proteaseinhibitor Indinavir zeigt ebenfalls keine Beeinflussung die HERV-K(HML-2) Infektion

[A] Indinavir Zytotoxizitätsanalyse: Luciferase Konzentration bei unterschiedlichen Indinavir Konzentrationen in den Zelllysaten. **5,5 nM** ist der IC50-Wert für HIV-1 (Lv et al. 2015). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Bei der Herstellung von VSV-G pseudotypisierten HIV-1 GFP Viren [B] und HERV-K_{CON} Viren [C] waren unterschiedliche Indinavir Konzentrationen vorhanden. Nach erfolgter Aufkonzentrierung dieser HIV-1 und HERV-K_{CON} Viren wurden 293T Zellen infiziert und die Anzahl der GFP positiven Zellen übers FACS bestimmt, woraus sich die Inhibierungskurve ergibt.

[D] ermittelten IC₅₀-Werte für Indinavir aus zwei unabhängigen Experimenten für HIV-1 und HERV-K(HML-2) in 293T Zellen.

4.3.3.4 Proteaseinhibitor Lopinavir reduziert die HERV-K(HML-2) Infektion nicht

Dieses Ergebnis bestätigte sich auch für den letzten getesteten Wirkstoff Lopinavir aus der Reihe der Proteaseinhibitoren, sodass Lopinavir nur die Reifung der HIV-1 viralen Partikel mit einem IC₅₀-Wert von $8,72 \pm 2,88$ nM beeinträchtigt (siehe Abb. B, C & D). Dieser ermittelte IC₅₀-Wert entspricht dem publizierten Wert von 17 nM (Lv et al. 2015).

Zusammenfassend inhibiert kein einziger Wirkstoff aus der Gruppe der Proteaseinhibitoren die HERV-K(HML-2) Infektion, sodass die Proteaseinhibitoren nicht an die aktive Bindestelle der HERV-K(HML-2) Protease binden können.

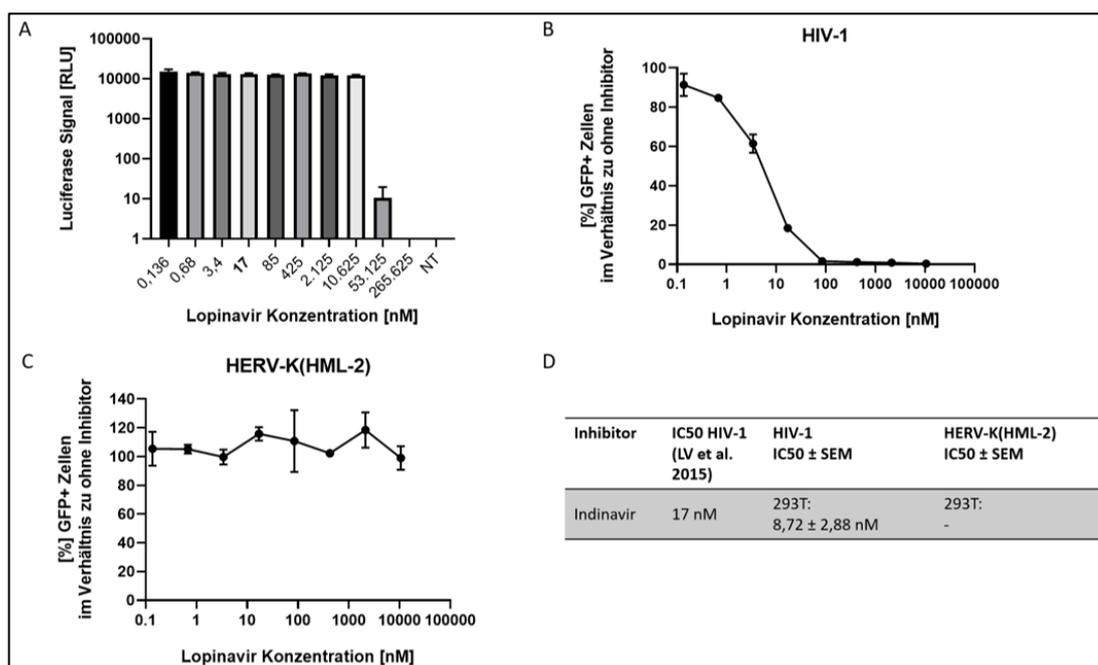


Abbildung 45: Wie zu erwarten war, inhibiert der vierte Proteaseinhibitor Lopinavir ebenfalls die HERV-K(HML-2) Infektion nicht.

[A] Lopinavir Zytotoxizitätsanalyse: Luciferase Konzentration bei unterschiedlichen Lopinavir Konzentrationen in den Zelllysaten. **17 nM** ist der IC₅₀-Wert für HIV-1 (Lv et al. 2015). NT steht für nicht transfiziert.

[B & C] Bei der Herstellung von VSV-G pseudotypisierten HIV-1 GFP Viren [B] und HERV-K_{CON} Viren [C] waren unterschiedliche Lopinavir Konzentrationen vorhanden. Nach erfolgter Aufkonzentrierung dieser HIV-1 und HERV-K_{CON} Viren wurden 293T Zellen infiziert und die Anzahl der GFP positiven Zellen übers FACS bestimmt, woraus sich die Inhibierungskurve ergibt.

[D] ermittelten IC50-Werte für Lopinavir aus zwei unabhängigen Experimenten für HIV-1 und HERV-K(HML2) in 293T Zellen.

5. Diskussion

In dieser Promotionsarbeit wurden verschiedene Restriktionsmechanismen untersucht um zu verstehen, wie bei einer möglichen HERV-K(HML-2) Reaktivierung die Virus Expression eingedämmt werden könnte. Einerseits wurde überprüft, ob die Restriktionsfaktoren wie das APOBEC 3G (A3G) Protein und die PYHIN Proteinfamilie einen Einfluss auf die HERV-K(HML-2) Partikelproduktion besitzen. Andererseits wurde nachgewiesen, dass HERV-K(HML-2) intrazellulär eine Stressreaktion mit einhergehender Assemblierung einer Stressgranula induzieren kann.

Die Expression von HERV-K(HML-2) kann auch durch eine Behandlung von antiretroviralen Wirkstoffen herunter reguliert werden. Daraufhin wurden verschiedene bekannte und gegen HIV-1 wirksame Wirkstoffe gegenüber HERV-K(HML-2) getestet und auf die Sensitivität im Vergleich zu HIV-1 untersucht, um ein mögliches Spektrum an potentiellen Wirkstoffen für eine HERV-K(HML-2) Behandlung zu erhalten.

5.1 Keine Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion durch das A3G Protein

Retroviren werden neben epigenetischen Kontrollmechanismen auch über Restriktionsfaktoren in ihrer Expression reguliert. HIV-1 wird unter anderem durch das TRIM5 α , SAMHD1 und Proteine der APOBEC3 Familie in Ihrer Expression reguliert (Engelmann & Cherepanov 2012). TRIM5 α verhindert die retrovirale Replikation von HIV zwischen dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle und der reversen Transkription (Nisole et al. 2005). Die APOBEC3 Proteinfamilie und SAMHD1 beeinflusst den viralen Replikationszyklus von HIV1, wobei durch APOBEC3 Mutationen im DNA-Strang induziert und durch SAMHD1 die Menge an intrazellulären Desoxyribonukleosidtriphosphaten verringert wird (Hanke et al. 2016; Zheng et al. 2012).

Eine Restriktion durch das A3G Protein kann das HIV-1 Virus durch das akzessorische Protein Vif („viral infectivity factor“) verhindern. Das Vif Protein besitzt verschiedene antivirale Funktionen. Einerseits kann das HIV-1 Vif

Protein an die A3G mRNA binden und somit die Translation des A3G Proteins verhindern (Henriet et al. 2009). Andererseits interagiert das Vif Protein mit dem A3G Protein und der U3 Ubiquitin Ligase, sodass das A3G Protein polyubiquitinyliert und über den proteasomalen Weg abgebaut werden kann (Henriet et al. 2009). Das Vif Protein kann auch die A3G Cytidin Deaminase Aktivität inhibieren und somit die G zu A Hypermuationen reduzieren (Wang et al. 2014). Außerdem verhindert das Vif Protein, dass das A3G Protein in die neu entstehenden viralen HIV-1 Partikeln eingebaut werden kann, weil das Vif Protein mit der viralen HIV-1 RNA ein Ribonukleoproteinkomplex bildet und somit das A3G Protein nicht an die virale RNA binden kann (Henriet et al. 2009).

Carmi et al. 2011 und Anwar et al. 2013 beschäftigten sich mit der Sequenz von integrierten Retroelementen und beobachteten, dass eine gewisse Häufigkeit von G zu A Hypermuationen im Genom von HERV-K Elementen vorhanden sind, die sich nur durch die Interaktion der retroviralen Sequenz mit der APOBEC3 Proteinfamilie erklären lässt. Die Arbeitsgruppe um Herrn Bannert am Robert Koch-Institut zeigte in ungestressten und gestressten Zellen eine Interaktion des A3G Proteins mit Stau1 und dem viralen Protein Rec (Hanke 2010). Das zelluläre Stau1 Protein interagiert mit dem Rec Protein und dirigiert den spezifischen viralen RNA Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma (Hanke et al. 2013). Nach erfolgtem Export der viralen RNA bleibt Stau1, Rec und die virale RNA als Stau1 Ribonukleoproteinkomplexe assoziiert, wodurch der Transport der viralen RNA zu den Ribosomen bzw. zur Zellmembran gefördert wird (Hanke et al. 2013). Daraufhin wird die Translation von viralen Proteinen und die virale Partikelbildung gesteigert (Hanke et al. 2013). In einer zellulären Stresssituation wurde eine Fusionierung dieser Stau1 Ribonukleoproteinkomplexe zu einer Stressgranula bzw. zur HMM A3G Granula durch die Anwesenheit des Rec bzw. Stau1 Protein mit TIA als Stressgranulamarker bzw. A3G nachgewiesen, wodurch die Translation von viralen Proteinen inhibiert wird (Hanke 2010). Die Zusammensetzung der HMM A3G Granula besteht aus verschiedenen assoziierten Proteinen und werden bspw. in RNA Co-Faktoren, in Stau1 enthaltenen RNA-Transport Granula, in Ro Ribonukleoproteine, in Prä-

spleißosom enthaltene Proteine und in Transkriptionsregulatorproteine eingeteilt (Chiu et al. 2006). In dieser Publikation wurde gezeigt, dass die Alu Retrotransposition durch die zytoplasmatische HMM A3G Granula Assemblierung inhibiert wurde, wodurch die Integrität des humanen Genoms vor einer Reintegration bewahrt wird (Chiu et al. 2006; Bogerd et al. 2006b). Diese Publikation war die Grundlage für die Klonierung des NTAP-A3G Konstrukts. Die Klonierung des NTAP-A3G Vektors erfolgte in der Masterarbeit der Autorin im Jahr 2016. In dieser Masterarbeit wurde die HMM A3G Granula, die durch die Stressreaktion durch Natriumarsenit entstand, aufgereinigt und die akkumulierte virale HERV-K(HML-2) RNA bzw. Proteine als Bestandteil der HMM A3G Granula nachgewiesen (Block 2016).

Für die nachfolgenden A3G Restriktionsexperimente wurden oriHERV-K113, Rec, Stufen-1, pGL3 Promotor und unterschiedliche NTAP-A3G Plasmidkonzentrationen in die 293T Zellen transfiziert. 72 h nach erfolgter Transfektion wurden die Virusüberstände aufkonzentriert und die reverse Transkriptase Aktivität im Cavid Assay bzw. die p27 Konzentration im Western-Blot bestimmt. Bei zunehmender NTAP-A3G Konzentration nahm zunächst die HERV-K(HML-2) reverse Transkriptase Aktivität um das 35,5-fache ab und auch eine Reduktion der p27 Konzentration im Western-Blot konnte gemessen werden (siehe Abb. 16). Bei den verwendeten Leervektoren (pcDNA6 und pNTAP) wurden unterschiedliche reversen Transkriptase Aktivitäten bestimmt, wobei die reverse Transkriptase Aktivität beim pNTAP Leervektor um das 1,4-fache im Vergleich zum pcDNA6 Vektor abnahm. In Folge dessen wurde die A3G Sequenz mit einem HA-Tag in den pcDNA6 Vektor hineinkloniert und die HERV-K(HML-2) Restriktionsexperimente wiederholt. Durch die ektopische A3G-HA Expression wurden keine Änderungen in der p27 Konzentration im Vergleich zum pcDNA6 Leervektor nachgewiesen, sodass A3G-HA keinen Einfluss auf die HERV-K(HML-2) Partikelproduktion besaß. Im Vergleich der beiden A3G Konstrukte (pcDNA-A3G-HA und pNTAP-A3G) wurden einerseits der HA-Tag C-terminal und der NTAP-Tag N-terminal an das A3G Protein angefügt und andererseits befindet sich beim NTAP-A3G Protein ein Linker zwischen dem Tag und dem A3G Protein, sodass die ausbleibende Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion auf eine mögli-

che inkorrekte Faltung des A3G-HA Proteins zurückzuführen sein könnte. Daraufhin wurden weitere Klonierungen durchgeführt, in dem nur das A3G Protein in den pcDNA6 Vektor hineinkloniert oder der HA-Tag entweder N- oder C-terminal bzw. verschiedene Linker (NTAP- oder Glycin-Serin-Linker) an das A3G Protein angefügt wurden. Eine Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion konnte nur beim NTAP-A3G Protein nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte der NTAP Leervektor eine geringfügige Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion gegenüber dem pcDNA6 Leervektor. Der NTAP Leervektor produzierte ein kleines Peptid mit einer Calmodulin- und Streptavidin-bindenden Domäne. Für HIV-1 ist bekannt, dass das Calcium-abhängige Calmodulin an das HIV-1 Matrixprotein bindet und somit die Konformation des Matrixproteins verändert (Chow et al. 2010). Daraufhin wäre eine mögliche Interaktion des HERV-K(HML-2) Matrixproteins mit dem Calmodulin-Tag eine Erklärung für die Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion.

Nachfolgend könnte überprüft werden, ob das A3G Protein in die entstehenden viralen HERV-K(HML-2) Partikeln eingebaut und die HERV-K(HML-2) Replikation in den infizierten Zellen inhibiert werden könnte. Das A3G Protein kann an die virale HERV-K(HML-2) RNA bzw. an die Gag Proteine binden und kann somit in die neuentstehenden HERV-K(HML-2) Viren eingebaut werden (Henriet et al. 2009; Bogerd et al. 2006a). Im Vergleich wurden bei Δ Vif HIV-1 Viren das A3G Protein in die neuentstehenden viralen HIV-1 Partikel eingebaut (Mariani et al. 2003; Stopak et al. 2003), wodurch die HIV-1 Replikation in den infizierten Zellen gehemmt wurde (Xu et al. 2007). Außerdem zeigte die Arbeitsgruppe um Herrn Liu, dass die Infektiosität der Δ Vif HIV-1 Viren durch die Anwesenheit des A3G Proteins abnahm (Wang et al. 2014). Daraufhin könnte auch die Infektiosität der HERV-K(HML-2) produzierten Viren durch die Anwesenheit des A3G Proteins abnehmen, auch wenn die Anzahl der produzierten HERV-K(HML-2) Viruspartikel nicht abgenommen hat. Daraufhin sollten GFP positive infektiöse HERV-K(HML-2) Viren mit und ohne ektopische A3G Expression hergestellt, aufkonzentriert und Zellen mit den HERV-K(HML-2) Viren infiziert werden, sodass die Anzahl der GFP positiven Zellen mit und ohne A3G Expression verglichen werden kann.

Ein ähnlicher Versuchsablauf wurde von der Heidmann Arbeitsgruppe durchgeführt, wobei die Infektiosität der HERV-K(HML-2) Partikeln durch die Anwesenheit von APOBEC 3A, 3B, 3DE, 3F und 3G abnahm (Esnault et al. 2008), sodass geschlussfolgert werden kann, dass der HERV-K(HML-2) Replikationszyklus in den infizierten Zellen inhibiert wird.

Ruprecht et al. 2008 und Bieda et al. 2001 zeigten, dass naive Teratokarzinomazellen, wozu die Tera-1 und GH Zelllinien gehören, virale HERV-K(HML-2) Partikel produzieren können, sodass in den naiven Zellen bzw. in den aufkonzentrierten viralen Überständen HERV-K(HML-2) RNA nachgewiesen werden konnte. Außerdem produzierten diese Zellen endogenes A3G. Eine Überlegung während der Erstellung dieser Arbeit war, ob ein knock-out des endogenen A3G Proteins über CRISPR Cas 9 die HERV-K(HML-2) Partikelproduktion beeinflussen würde. Jedoch wurde die HERV-K(HML-2) Partikelreduktion durch die verschiedenen A3G Konstrukte nicht bestätigt, sodass die anfängliche Überlegung nicht weiterverfolgt wurde.

5.2 Restriktion von HERV-K(HML-2) durch nukleäre PYHIN Proteine

Die PYHIN Proteinfamilie besitzt einen Einfluss auf die Genexpression von verschiedensten Viren. Herrn Gariano und Kolleg*innen zeigten, dass ein Knock-Down von IFI16 eine erhöhte Replikation der humanen Cytomegaloviren (HCMV) zur Folge hatte bzw. eine erhöhte Expression des IFI16 Proteins die virale Partikelproduktion reduzierte (Gariano et al. 2012). Die PYHIN Proteine IFI16 und IFIX wirkten als Restriktionsfaktoren gegenüber den Herpes Simplex Viren (HSV-1) (Gariano et al. 2012; Crow & Cristea 2017). Herr Conrady und Kolleg*innen beobachteten, dass das IFI16 Protein die Produktion von IFN- α in Epithelzellen aktivieren kann, wodurch die Aktivität von Herpes Simplex Viren inhibiert wurde (Conrady et al. 2012). Irene Lo Cigno und Kolleg*innen zeigten den inhibitorischen Einfluss von IFI16 auf die virale Transkription und Replikation von humanen Papillomaviren (HPV) (Lo Cigno et al. 2015). Die Arbeitsgruppe vermutete, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren beispielsweise die Sp1 Bindestelle für die Hemmung von HPV durch

IFI16 verantwortlich sein könnte. IFI16 als Vertreter der PYHIN Proteine wirkte als Restriktionsfaktor gegenüber Retroviren beispielsweise HIV-1. Herr Jakobsen und Kolleg*innen zeigten, dass IFI16 die virale DNA, die während dem HIV-1 Replikationszyklus entsteht, erkennt und das angeborene Immunsystem aktiviert, wodurch die HIV-1 Replikation gehemmt wird (Jakobsen et al. 2013). Daraufhin liegt der Fokus dieser Arbeit auf die Restriktion von HERV-K(HML-2) durch die PYHIN Proteine. In den Masterarbeiten, die am Robert Koch-Institut unter der Leitung von Herrn Bannert angefertigt wurde, wurde die Restriktion von HERV-K(HML-2) durch IFI16 bestätigt (Zumblick 2019; Savas 2020; Friedrich 2021).

Ein Ziel meiner Arbeit lag in der Untersuchung, ob die anderen Vertreter der PYHIN Proteinfamilie (AIM2, MND4 und IFIX) einen restriktiven Einfluss auf HERV-K(HML-2) besitzen. Eine Cotransfektion bei unterschiedlichen AIM2, MND4 und IFIX Konzentrationen erfolgte mit oriST HERV-K113 und Staufen-1. Die Anzahl der viralen Partikeln wurde mittels reverse Transkriptase Aktivität über den PERT-Assay quantifiziert. Staufen-1 ist ein Interaktionspartner des Rec und Gag Proteins und dient der Erhöhung der Partikelproduktion (Hanke et al. 2013b). Des Weiteren wurden die PYHIN Expressionsplasmide von dem Institut für Virologie der Universität Ulm zur Verfügung gestellt, womit HIV-1 Restriktionsanalysen durchgeführt wurden (Hotter et al. 2019; Bosso et al. 2020).

Durch die ektopische MND4 und IFIX Proteinexpression erfolgte eine vollständige Restriktion der Partikelexpression von HERV-K(HML-2), wohingegen für AIM2 nur eine geringfügige Reduktion der Partikelproduktion gemessen wurde. Außerdem zeigt Frau Zumblick erstmals in ihrer Masterarbeit eine vollständige Restriktion der HERV-K(HML-2) Partikelexpression bei einer IFI16 Überexpression (Zumblick 2019). Im Linker Bereich der IFI16, IFIX und MND4 Proteine befinden sich die Kernlokalisierungssequenz(en), sodass diese Proteine in den Zellkern transportiert werden können (Bosso et al. 2020). Die nukleären PYHIN Proteine bewirken eine vollständige Restriktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion. Das AIM2 Protein verblieb durch die fehlende Kernlokalisierungssequenz im Zytoplasma (Bosso et al. 2020) und bewirkte nur eine geringfügige Restriktion der HERV-K(HML-2) Partikelpro-

duktion. Frau Zumblick zeigte in ihrer Masterarbeit, dass diese Restriktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion aufgehoben wurde, wenn die Kernlokalisierungssequenz des IFI16 Proteins mutiert war, wodurch das IFI16 Protein nicht mehr in den Zellkern hinein transportiert werden konnte (Zumblick 2019). Daraufhin kann geschlossen werden, dass für eine effektive HERV-K(HML-2) Restriktion die Anwesenheit der PYHIN Proteine im Zellkern essentiell ist. Herr Bosso und Kolleg*innen zeigten für HIV-1 die gleichen Resultate, d. h. eine HIV-1 Restriktion erfolgte über nukleäre PYHIN Proteine (IFI16, IFIX und MND A) (Bosso et al. 2020). Die Anwesenheit der HIN-Domäne hingegen ist für die HERV-K(HML-2) wie auch für die HIV-1 Restriktion nicht essentiell (Bosso et al. 2020), sodass eine Restriktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion schon bei IFI16 (Zumblick 2019), MND A und IFIX Proteinen erfolgte, die nur die Pyrin-Linker-Domänen besitzen. Für das humane Cytomegalovirus wurde ebenfalls bestätigt, dass Deletionen in der HIN-Domäne des IFI16 Proteins die HCMV Restriktion nicht aufhebt (Gariano et al. 2012). Andererseits erhöhte sich die HCMV Replikation, wenn Deletionen in der Pyrin-Domäne des IFI16 Proteins vorhanden sind (Gariano et al. 2012). In der Pyrin Domäne befindet sich die Protein-Protein-Interaktionsstelle, sodass die HERV-K(HML-2) Restriktion durch eine mögliche Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit dem nukleären PYHIN Protein erfolgen könnte. In der Publikation von Dominik Hotter und Kolleg*innen im Jahr 2019 wurden die Interaktion von dem Transkriptionsfaktor Sp1 mit dem IFI16 Protein als Ursache für die HIV-1 Restriktion benannt. Das IFI16 Protein ist in der Lage den Transkriptionsfaktor Sp1 zu binden und somit die HIV-1 Transkription zu inhibieren (Hotter et al. 2019). In der Masterarbeit von Frau Zumblick wurde untersucht, ob die HERV-K(HML-2) Restriktion durch die nukleären PYHIN Proteine ebenfalls über das Sp1 Protein erfolgen könnte (Zumblick 2019). Die Löwer Arbeitsgruppe zeigte als Bindestelle des Transkriptionsfaktors Sp1 vier GC-Boxen, die sich in der 5`LTR Region von HERV-K(HML-2) befinden (Fuchs et al. 2011). Frau Zumblick mutierte in ihrer Masterarbeit diese GC-Boxen in der 5`LTR und klonierte diese 5`LTR Sequenz in einem Luciferasevektor hinein (Zumblick 2019). Die Luciferase Konzentration änderte sich zwischen der mutierten und der nicht mutierten

5`LTR Sequenz nicht (Zumblick 2019), sodass eventuell auch andere Bereiche nicht nur allein die 5`LTR der proviralen Sequenz für die Restriktion durch die nukleären PYHIN Proteine essentiell sein könnten. Außerdem änderte sich durch eine Überexpression des Sp1 Proteins die HERV-K(HML-2) Partikelproduktion nur geringfügig und eine Überexpression von IFI16 und Sp1 erhöhte die HERV-K(HML-2) Transkription nicht signifikant (Zumblick 2019). Schlussfolgernd könnten auch andere Transkriptionsfaktoren einen Einfluss in der Restriktion von HERV-K(HML-2) durch die nukleären PYHIN Proteine besitzen, weil für das Sp1 Protein keine eindeutigen Ergebnisse, die den Einfluss auf die Restriktion von HERV-K(HML-2) durch die nukleäre PYHIN Proteine belegen, vorhanden sind. In der 5`LTR Sequenz von HERV-K(HML-2) befinden sich eine Vielzahl von verschiedensten GC-reichen Bereichen, die eine mögliche Bindestelle von Transkriptionsfaktoren sein könnten.

In einem Versuch erfolgte ein Vergleich der HERV-K(HML-2) Partikelreduktion durch AIM2, MNDA und IFIX, wobei zwei verschiedene Moleklarklonen einerseits oriST HERV-K113 und andererseits CMVoriST HERV-K113 eingesetzt wurden. Durch den Austausch der U3 Region mit dem CMV Promotor in der 5`LTR entstand das CMVoriST HERV-K113 Konstrukt, das von der Arbeitsgruppe um Herrn Bannert zur Verfügung gestellt wurde. Die vier GC-Boxen, die für die Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 entscheidend sind, befinden sich in der RU5 Region und sind somit in dem CMVoriST HERV-K113 Konstrukt vorhanden. Die Partikelreduktion wurde durch die Verwendung des CMVoriST HERV-K113 Konstruktes durch AIM2 komplett aufgehoben. MNDA und IFIX reduzierte weiterhin die Partikelproduktion durch die Verwendung des CMVoriST HERV-K113 Konstrukts um das 10,5-fache für MNDA oder um das 2,6-fache für IFIX, wobei keine vollständige Restriktion im Gegensatz zum oriST HERV-K113 Konstrukt mehr nachweisbar war. Eine Reduktion der Luciferase Konzentration wurde im Zelllysat durch die Verwendung der CMV-Promotor getriebene Luciferase (pGL4.51) im Zelllysat gemessen, wobei für MNDA eine 7-fache und für IFIX eine 2,4-fache Reduktion vorhanden war. Daraufhin wurden vergleichbare Reduktionen im Zelllysat wie im Virusüberstand gemessen, sodass ein geringfügiger Einfluss von

MNDA und IFIX auf den CMV-Promotor des humanen Cytomegalovirus dargestellt wurde. Antonia Zumblick zeigte in ihrer Masterarbeit für das IFI16 Protein keine Reduktion der Partikelproduktion bei der Verwendung des CMVoriST HERV-K113 Konstruktes, somit scheint eine vollständig intakte 5`LTR Sequenz für die Restriktion durch nukleäre PYHIN Proteine entscheidend zu sein (Zumblick 2019). Außerdem scheint eine mögliche Interaktion der nukleären PYHIN Proteine mit dem Sp1 Transkriptionsfaktor bei der Restriktion im Bezug zum CMVoriST HERV-K113 Konstruktes nicht ausschlaggebend zu sein, weil der CMV Promotor ein sehr starker Promotor im Gegensatz zur 5`LTR ist. Die LTR von HERV-K(HML-2) agieren als unabhängige Promotoren, sprich diese LTRs besitzen kein Initiator Motiv und werden nicht durch Kernpromotor-Elemente reguliert (Fuchs et al. 2011). Mindestens 50 % der HERV-K(HML-2) LTRs besitzen eine Promotoraktivität und das Transkriptionsniveau der einzelnen LTRs kann sehr stark variieren (Buzdin et al. 2006). Eine hohe Promotoraktivität befindet sich in der 5` proviralen LTR (Buzdin et al. 2006).

Für das zytoplasmatische AIM2 Protein wurde nur geringfügige Inhibierungen für HERV-K(HML-2) gezeigt, sodass die Assemblierung von AIM2 Inflamasomen inhibiert sein könnte. Die Arbeitsgruppe um Frank Kirchhoff zeigte für HIV-1 keine Assemblierung und Aktivierung von AIM2 Inflamasomen (Bosso et al. 2020). Eine AIM2 Inflamasom Aktivierung erfolgte nach Bindung von doppelsträngiger viraler DNA an AIM2 mit anschließender AIM2 Oligomerisierung, wodurch die Caspase-1 rekrutiert und aktiviert werden kann (Lugin & Martinon 2018; Sharma et al. 2019). Die Caspase-1 spaltet und aktiviert Interleukine (IL-1 β & IL-18) und Gasdermin D (GSDMD) (Lugin & Martinon 2018; Sharma et al. 2019). Gasdermin D lagert sich zu großen Poren in die Zellmembran ein, wodurch die Pyroptose induziert wird und Freisetzung von Interleukine (IL-1 β und IL-18) erfolgen kann (Lugin & Martinon 2018; Sharma et al. 2019). In verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass virale Proteine die Aktivierung und Assemblierung von Inflamasomen inhibieren können. Bei dem humanen Cytomegalovirus interagiert das virale Protein pUL83 mit dem AIM2 Protein, wodurch die AIM2 Inflamasom Aktivierung inhibiert wurde (Huang et al. 2017b). Außerdem kann die AIM2

Oligomerisierung bei Herpes Simplex Viren durch das Tegument Protein VP22 inhibiert werden (Maruzuru et al. 2018). Hongtao Chen und Kolleg*innen zeigten in peripheren mononuklearen Blutzellen eine Inhibierung der AIM2 Inflammasom Aktivierung über die Inhibierung der Transkription und Sekretion von IL-1 β (Chen et al. 2018).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der inhibitorische Effekt der nukleären PYHIN Proteine auf die HERV-K(HML-2) Restriktion nachgewiesen, wobei der exakte Mechanismus noch nicht geklärt werden konnte. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob die nukleären PYHIN Proteine direkt an die zellulären Transkriptionsfaktoren binden und somit die HERV-K(HML-2) Transkription inhibieren. Andererseits sollte überprüft werden, welche HERV-K(HML-2) proviralen Bereiche für die Restriktion durch nukleäre PYHIN Proteine essentiell sind. Die ersten Untersuchungen zeigten, dass die 5'LTR Region einen entscheidenden Einfluss besitzen könnte. Im humanen Genom erfolgt eine Expression von HERV-K(HML-2) virale RNA, Proteine oder virale Partikeln erst nach einer Reaktivierung von HERV-K(HML-2), wobei der inhibitorische Einfluss auf bereits integrierten Viren untersucht werden könnte. Ein weiterer interessanter Aspekt könnte sein, welches virale HERV-K(HML-2) Protein für die Inhibierung der AIM2 Inflammasom Aktivierung benötigt wird.

5.3 HERV-K(HML-2) induziert eine Stressgranula-Assemblierung

Durch verschiedene Erkrankungen können humane endogene Retroviren reaktiviert werden, sodass der Fokus auf einen möglichen zellulären Mechanismus zur Eindämmung von humanen endogenen Retroviren liegt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit lag in der Untersuchung, ob humane endogene Retroviren vom Immunsystem erkannt werden und eine Stressgranula ausbilden. Dafür wurden HeLa Zellen mit dem CMVoriST HERV-K113 Moleklarklon transfiziert. Über eine intrazelluläre Färbung wurden das HERV spezifische Gag Protein (p27) und die intrazellulären Proteine G3BP oder P-EIF2 α angefärbt. Durch den Nachweis des p27 Proteins konnten die erfolgreich transfizierten HeLa Zellen bestimmt werden. Durch die Anwesenheit des

CMV Promotors wurde die Expression der viralen RNA und Proteine verstärkt, sodass der Nachweis von HERV-K(HML-2) Gag Proteine über die intrazelluläre Färbung erst ermöglicht wurde. Das intrazelluläre zytoplasmatische Protein G3BP ist ein Bestandteil der Stressgranula und über die Lokalisation des G3BP Proteins kann geschlussfolgert werden, ob eine Zelle gestresst oder ungestresst ist. Wenn das G3BP Protein diffuse im Zytoplasma vorhanden war, dann ist die Zelle ungestresst. Jedoch wenn sich das G3BP Protein zu punktförmigen Strukturen zusammen lagerte, dann wurde eine Stressgranula ausgebildet und die Zelle war gestresst.

Frau Tourrière und Kolleg*innen analysierten die Interaktion von G3BP mit der Stressgranula Assemblierung und zeigte, dass zwei Bereiche (Domäne A & D) des Proteins für die Anwesenheit von G3BP in der Stressgranula entscheidend sind. Die Domäne A vermittelt die Protein-Protein-Interaktion insbesondere die G3BP Multimerisation. Die Domäne D ist eine RNA-bindende Domäne. G3BP enthält noch zwei weitere Domänen B und C. Die Bindung von G3BP an die SH3 Domäne von Ras-GAP erfolgt über die Domäne C und die Domäne B besitzt eine wichtige Phosphorylierungsstelle am Serin 149. Durch eine Natriumarsenitbehandlung wird diese Stelle dephosphoryliert, wodurch die G3BP Multimerisation gefördert wird. Eine Besonderheit von G3BP ist, dass durch eine Überexpression von G3BP eine Stressgranula Assemblierung ausgelöst wird (Tourrière et al. 2003).

Über die Lokalisation des zytoplasmatischen G3BP Proteins in HERV-K(HML-2) transfizierten HeLa Zellen konnte geschlussfolgert werden, dass eine Stressgranula Assemblierung induziert und nach erfolgter oxidativer Stressreaktion nicht verhindert werden konnte. In den ungestressten HeLa Zellen wurden in $29,0 \pm 0,7$ % der HERV-K(HML-2) positiven Zellen eine Stressgranula induziert. Durch den oxidativen Stressimpuls durch Natriumarsenit stieg der Anteil der Stressgranula positiven Zellen auf $81,3 \pm 2,4$ % an, sodass in den HERV-K(HML-2) transfizierten Zellen die Stressgranula Assemblierung nicht verhindert werden konnte.

Zur Validierung der Ergebnisse wurde HIV-1 als Kontrolle hinzugezogen, weil aus der Publikation von Fernando Valiente-Echeverria und Kolleg*innen bekannt ist, dass HIV-1 keine Stressgranula Assemblierung induziert und diese

auch nach einer erfolgten oxidativen Stressreaktion verhindern kann (Valiente-Echeverría et al. 2014). Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. In ungestressten Zellen lag G3BP diffuse im Zytoplasma verteilt vor und die Zellen zeigten somit keine Stressgranula. Durch einen oxidativen Stressimpuls durch Natriumarsenit wurde in den transfizierten Zellen ein geringfügiger Anstieg der Stressgranula positiven Zellen auf $30,8 \pm 3,7$ % bestimmt, wobei diese Stressgranula in Zellen gebildet worden ist, in denen nur recht schwach das p24 Gag Protein vom HIV-1 nachgewiesen werden konnte.

Herr Valiente-Echeverría und Kolleg*innen zeigten, dass der eukaryotische Elongationsfaktor 2 (eEF2) für die Inhibierung der Stressgranula Assemblierung durch HIV-1 entscheidend ist. Durch die Interaktion von Cyclophilin A mit der N-terminalen Kapsid Domäne des HIV-1 Strukturproteins pr55^{Gag} erfolgte eine Umstrukturierung der oberflächlichen Proteinstruktur, sodass jetzt eEF2 an die N-terminale Kapsid Domäne des HIV-1 Strukturproteins pr55^{Gag} binden kann. Cyclophilin A stabilisiert somit die Gag-eEF2 Assoziation. Durch eine Überexpression des G3BP Protein kann eine Stressgranula Assemblierung auch in HIV-1 infizierten Zellen erfolgen, wobei die Interaktion von Gag-eEF2 inhibiert wird. Über die Zeit werden diese Stressgranula durch die Anwesenheit des Gag Proteins jedoch aufgelöst (Valiente-Echeverría et al. 2014).

Auch das intrazelluläre Staufen-1 Protein besitzt einen Einfluss auf die virale Partikelexpression von HIV-1. Die virale HIV-1 RNA kann mit dem zellulären Staufen-1 und den viralen Gag Protein interagieren und sogenannte Staufen-1-HIV-1-Ribonukleoproteinpartikelkomplexe (SHRNPs) ausbilden. Diese SHRNPs befinden sich im Gleichgewicht mit den translationsaktiven Ribosomen. Durch eine Reduktion des Staufen-1 Gehaltes ändert sich die Größe der SHRNPs, sodass im Zytoplasma größere SHRNPs zu erkennen sind, wodurch sich die intrazelluläre Gag Protein Konzentration und die Virusproduktion reduzierte. Staufen-1 nimmt somit eine wichtige Rolle im HIV-1 Replikationszyklus in Bezug zur Gag Multimerisation, Enkapsidierung der vRNA und Virusassemblierung ein (Abrahamyan et al. 2010).

Herr Soto-Rifo und Kolleg*innen zeigten, dass HIV-2 die Stressgranula Assemblierung induzieren kann, in dem die HIV-2 gRNA mit TIAR einen so-

nannten TIAR-HIV2-Ribonukleoproteinkomplex bildeten. Diese Komplexe lagen entweder diffuse im Zytoplasma oder in der Stressgranula vor (Soto-Rifo et al. 2014). Während der Erstellung dieser Arbeit wurde versucht, ob das Gag Protein von HIV-2 über den AG3.0 Antikörper angefärbt und somit die intrazelluläre Lokalisation des G3BP Proteins nachgewiesen werden könnte. Die intrazelluläre Anfärbung des p24 Proteins von HIV-2 war nicht erfolgreich, sodass in Bezug zur Assemblierung einer Stressgranula durch HIV-2 keine Aussage getroffen werden konnte.

Nach erfolgter HIV-2 Transfektion besaßen ca. 38 % der Zellen eine Stressgranula in ungestressten Zellen, wobei sich dieser prozentuale Anteil nach erfolgter Stressreaktion mit Natriumarsenit auf 74 % erhöhte (Soto-Rifo et al. 2014). Daraufhin wurden im Vergleich zu HERV-K(HML-2) ähnliche Ergebnisse (in ungestressten Zellen ca. $29,0 \pm 0,7$ % Stressgranula positive Zellen und in gestressten Zellen ca. $81,3 \pm 2,4$ % Stressgranula positive Zellen) nachgewiesen.

Eine Phosphorylierung von eIF2 α kann während der mitotischen Zellteilung in ungestressten HeLa Zellen nachgewiesen werden, sodass ein schwaches Phosphorylierungssignal von eIF2 α im Western-Blot detektiert werden konnte. Yoosik Kim und Kolleg*innen bestätigte, dass während der mitotischen Zellteilung eIF2 α über die Proteinkinase R (PKR) unabhängig von einer viralen Infektion phosphoryliert wurde (Kim et al. 2014). Durch die Auflösung der Zellkernmembran während der mitotischen Zellteilung werden nukleäre endogene dsRNAs ins Zytoplasma freigesetzt (Kim et al. 2014). Diese endogene dsRNA sind invertierte Alu Sequenzen (Kim et al. 2014). Die Alu Elemente sind integrierte Retroelemente, die keine LTR-Sequenz besitzen und zu den SINE-Elementen (kurze, verteilte Nukleotidelemente, „short interspersed elements“) gehören (Bannert et al. 2004). Die aktivierte PKR phosphoryliert eIF2 α , wodurch die Proteintranslation inhibiert wird, und die Kinase JNK (c-Jun N-terminale Kinase), wodurch verschiedene Faktoren, die für die mitotische Zellteilung entscheidend sind, reguliert werden können (Kim et al. 2014).

Natriumarsenit als Stressreagenz induzierte eine oxidative Stressreaktion, wodurch die HRI („heme regulated eIF2 α kinase“) aktiviert und die Phospho-

rylierung von eIF2 α induziert wurde. Daraufhin wurde ein Anstieg der Phosphorylierung von eIF2 α im Zytoplasma über die intrazelluläre Färbung wie auch im Western-Blot nachgewiesen. Die Einstellung der Laserintensität erfolgte anhand der ungestressten und gestressten HeLa Zellen, sodass eine Zunahme des Phosphorylierungssignals von eIF2 α nach erfolgter HIV-1 und HERV-K(HML-2) Transfektion im Vergleich zu ungestressten HeLa Zellen nachgewiesen wurde, wobei die Zunahme des Phosphorylierungssignals nicht mit den gestressten HeLa Zellen vergleichbar war. Dies konnte ebenfalls im Western-Blot bestätigt werden. In HERV-K(HML-2) transfizierten HeLa Zellen lag P-eIF2 α in punktförmigen Strukturen vor, sodass P-eIF2 α ein Bestandteil der Stressgranula sein könnte. Für HIV-1 ist bekannt, dass HIV-1 die Phosphorylierung von eIF2 α nicht verhindern, aber die Stressgranula Assemblierung inhibieren kann (Abrahamyan et al. 2010), sodass eine gleichmäßige Verteilung des P-eIF2 α Proteins im Zytoplasma vorhanden war. Zusammenfassend induzierte HERV-K(HML-2) eine Stressgranula Assemblierung und kann die Stressgranula Assemblierung ausgelöst durch eine Stressreaktion mittels Natriumarsenit nicht verhindern.

5.4 NRTI, NtRTI und Integraseinhibitoren inhibieren die HERV-K(HML-2) Infektion

In der Literatur sind zwei Publikationen vorhanden, die sich mit der Thematik beschäftigen, welche HIV-1 Inhibitoren einen inhibitorischen Einfluss auf HERV-K(HML-2) besitzen (Contreras-Galindo et al. 2017; Tyagi et al. 2017). In der Publikation von Contreras-Galindo und Kolleg*innen wurde der Einfluss der HIV-1 Inhibitoren auf die reverse Transkriptase von humanen endogenen Retroviren K analysiert (Contreras-Galindo et al. 2017). Dafür nutzte Herr Contreras-Galindo und Kolleg*innen eine Teratokarzinomzelllinie, weil aus der Literatur bekannt ist, dass in dieser Zelllinie eine Reaktivierung von humanen endogenen Retroviren erfolgt ist und eine reverse Transkriptase Aktivität in den viralen Partikeln im Überstand nachgewiesen werden konnte (Contreras-Galindo et al. 2017). Durch die Zugabe der Inhibitoren konnte ein inhibitorischer Effekt durch die Reduktion der reversen Transkriptase im Überstand gemessen werden. Dies erfolgte bei den nukleosidischen und nukleotidischen reverse Transkriptase Inhibitoren. Bei der Gruppe der nicht nukleosidischen reverse Transkriptase Inhibitoren wurde dieser Effekt nur bei Etravirin bestimmt. Die Proteaseinhibitoren hatten keinen Einfluss auf die HERV-K(HML-2) reverse Transkriptase (Contreras-Galindo et al. 2017).

Bei Frau Tyagi und Kolleg*innen hingegen zeigten alle HIV-1 Inhibitoren, welche von dieser Arbeitsgruppe getestet wurden, einen inhibitorischen Effekt auf HERV-K(HML-2) (Tyagi et al. 2017). Hierfür wurde eine HERV-K(HML-2) Konsensussequenz verwendet, die mit Hilfe von VSV-G pseudotypisierte infektiöse virale Partikel exprimieren. Einerseits hat Frau Tyagi und Kolleg*innen dieses Konstrukt in HeLa transfiziert und 24 Stunden nach erfolgter Transfektion bei Anwesenheit der verschiedenen Inhibitoren die reverse Transkriptase Aktivität im Überstand gemessen. Eine Reduktion der reversen Transkriptase Aktivität konnte nach Behandlung mit den reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI, NtRTI und NNRTI) und mit den Proteaseinhibitoren bestimmt werden. Andererseits hat diese Arbeitsgruppe infektiöse virale Partikel hergestellt und die HeLa Zellen bei unterschiedlichen Inhibitor Konzentrationen infiziert und die Reduktion der Gag mRNA im Zelllysat 6

Tage nach erfolgter Infektion bestimmt, wodurch die Inhibierung der HERV-K(HML-2) Infektion durch Raltegravir als Vertreter der Integraseinhibitoren bestimmt wurde. Auch die hergestellten HERV-K(HML-2) Viren nach Proteaseinhibitor Behandlung zeigten in dieser Publikation eine Inhibierung nach erfolgter Infektion (Tyagi et al. 2017).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Aussagen in den beiden Publikationen wurde diese Analyse, ob die antiretroviralen Wirkstoffe die HERV-K(HML-2) Infektion inhibiert, nochmals durchgeführt. Dafür wurden VSV-G pseudotypisierte HERV-K_{CON} bzw. HIV-1 Viren hergestellt. HERV-K_{CON} ist eine rekonstituierte Sequenz, die aus zehn verschiedenen Proviren generiert wurde, so dass mithilfe dieser Sequenz infektiöse virale Partikeln hergestellt und eine stabile Integration ins humane Genom induziert werden kann (Lee et al. 2007). In die HERV-K_{CON} Sequenz wurde eine GFP Kasette in den Env-Genbereich hineinkloniert (Lee et al. 2007), sodass GFP positive Zellen nach erfolgter Infektion über FACS bestimmt werden konnten. Bei steigenden Wirkstoffkonzentrationen wurde eine Reduktion der HERV-K(HML-2) Infektion bei den nukleosidischen und nukleotidischen reverse Transkriptaseinhibitoren und bei den Integraseinhibitoren bestimmt. Diese Reduktion der HERV-K(HML-2) Infektion konnte bei der Gruppe der nicht-nukleosidischen reverse Transkriptase Inhibitoren bei steigenden Konzentrationen nicht nachgewiesen werden. Die Proteaseinhibitoren waren während der Herstellung der Viren anwesend, weil die Proteaseinhibitoren die Reifung der viralen Partikeln verhinderten, wodurch die Viren nicht mehr infektiös sind. Die getesteten Proteaseinhibitoren zeigten keine Inhibierung der HERV-K(HML-2) Infektion. Aus den drei verschiedenen Experimenten kann geschlussfolgert werden, dass die nukleosidischen und nukleotidischen reverse Transkriptase Inhibitoren einen Einfluss auf die reverse Transkriptase besitzen. Die NRTI und NtRTI sind nach erfolgter Phosphorylierung durch zelluläre Kinasen Nukleotidanalogen, die um die Bindestelle des aktiven Zentrums der reversen Transkriptase konkurrieren. Diese Nukleotidanalogen sind strukturell den physiologischen Nukleotiden sehr ähnlich, sodass diese an das aktive Zentrum der HIV-1 und HERV-K(HML-2) reverse Transkriptase binden und in den wachsenden DNA-Strang eingebaut werden können, wodurch ein Kettenabbruch

induziert wird. Das Besondere in dieser Arbeit ist der Vergleich zwischen den Inhibierungen der HERV-K(HML-2) und HIV-1 Infektion, sodass für die Thyminanaloge reverse Transkriptase Inhibitoren (Stavudin und Zidovudin) eine höhere Sensitivität für HERV-K(HML-2) im Gegensatz zu HIV-1 bestimmt wurde. Für die Gruppe der Cytidinanaloge reverse Transkriptase Inhibitoren wurde für Zalcitabin eine gleiche Sensitivität für HERV-K(HML-2) und HIV-1 nachgewiesen. Jedoch für Lamivudin bzw. Emtricitabin eine niedrige Sensitivität für HERV-K(HML-2) im Gegensatz zu HIV-1 bestimmt. Zur Gruppe der nukleotidischen reverse Transkriptase Inhibitoren gehört Tenofovir, welcher ein Analogon von Adenosin ist. Tenofovir zeigte eine 25-fach höhere Sensitivität für HERV-K(HML-2) gegenüber HIV-1.

In Bezug zur HIV-1 Therapie wurde Zalcitabin auf Grund der schwachen Wirkung und Problemen in der Pharmakokinetik vom Markt genommen. Stavudin wird ebenfalls auf Grund der höheren Langzeittoxizität im Vergleich zu anderen NRTIs nicht mehr verschrieben. Zidovudin hingegen hat in Bezug zu anderen NRTIs eine schlechtere Verträglichkeit und muss zweimal pro Tag eingenommen werden, aber in Bezug zu bestimmten Resistenzbildungen wird Zidovudin noch verabreicht. In der jetzigen Kombinationstherapie ist Lamivudin, Emtricitabin oder Tenofovir von der Gruppe der nukleosidischen bzw. nukleotidischen reversen Transkriptase Inhibitoren ein Bestandteil (Hoffmann & Rockstroh 2020).

In dieser Arbeit wurden bei steigenden Konzentrationen von nicht nukleosidischen reversen Transkriptase Inhibitoren (Etravirin und Nevirapin) keine Reduktion der HERV-K(HML-2) Infektion nachgewiesen. Frau Tyagi und Kolleg*innen konnten einen inhibitorischen Effekt auf die HERV-K(HML-2) Replikation für Etravirin wie auch für Nevirapin nachweisen (Tyagi et al 2017). In der Publikation von Herrn Contreras-Galindo und Kolleg*innen zeigten von den verwendeten NNRTIs nur Etravirin einen inhibitorischen Effekt auf die HERV-K(HML-2) reverse Transkriptase, wobei Etravirin die Reduktion der reverse Transkriptase Aktivität über einen anderen Mechanismus als nur die Inhibierung der reversen Transkriptase in den Teraokarziomzellen verursachte (Contreras-Galindo et al. 2017). In dieser Publikation wurde ein Versuch durchgeführt, in dem 293T Zellen mit HERV-K_{CON} Viren in der Anwesenheit

der verschiedenen Inhibitoren infiziert wurden (Contreras-Galindo et al. 2017). Nach erfolgter Etravirin Behandlung wurde nur eine geringfügige Reduktion der HERV-K(HML-2) Infektion nachgewiesen, sodass Etravirin den Proliferationszyklus nach Reaktivierung von humanen endogenen Retroviren unter bestimmten Bedingungen beeinflussen könnte, aber per se die HERV-K(HML-2) Infektion nur geringfügig inhibieren kann. Frau Tyagi und Kolleg*innen verglich die Sequenzen der HIV-1 und HERV-K(HML-2) reversen Transkriptase und fand nur eine ca. 21,5%ige Aminosäure-Sequenzhomologie zwischen den beiden reversen Transkriptasen (Tyagi et al. 2017). Die NNRTIs, die spezifisch auf die Sequenz der HIV-1 reversen Transkriptase zugeschnitten wurde, binden spezifisch an die reverse Transkriptase in der Nähe des aktiven Zentrums, sodass eine Konformationsänderung der reversen Transkriptase erfolgte. Die Spezifität der NNRTIs für die HIV-1 reverse Transkriptase könnte die mögliche Ursache dafür sein, dass in dieser Arbeit keiner der verwendeten NNRTIS eine Inhibierung der HERV-K(HML-2) Infektion besaß.

Auch von anderen Retroviren wie bspw. vom humanen T-Zell Leukämie Virus (HTLV) wurden die Sequenzhomologien mit der HIV-1 reversen Transkriptase verglichen, wobei in diesem Zusammenhang eine identische Sequenz von ca. 25 % und eine Ähnlichkeit ca. 45 % festgestellt wurde. Jedoch sind keine Übereinstimmungen in der NNRTI Bindestelle vorhanden, sodass die NNRTIs, die spezifisch für die HIV-1 Therapie entwickelt worden sind, keine oder nur geringfügige Aktivitäten gegenüber der HTLV-1 reversen Transkriptase nachgewiesen werden konnte (Soltani et al. 2019).

Frau Tyagi und Kolleg*innen zeigte eine Inhibierung der HERV-K(HML-2) Integration durch Raltegravir, das zur Gruppe der Integraseinhibitoren gehört (Tyagi et al. 2017). Dies konnte in dieser Arbeit für die Gruppe der Integraseinhibitoren bestätigt werden, wobei Raltegravir eine gleiche und Elvitegravir eine etwas geringere Sensitivität in der Inhibierung der HERV-K(HML-2) Infektion gegenüber HIV-1 besaß. Die Integraseinhibitoren binden an das aktive Zentrum der Integrase, wodurch die Bindung des bivalenten Kations (üblicherweise Magnesium) inhibiert wird (Cocohoba & Dong 2008). Daraufhin wird die Anheftung des Präintegrationskomplexes an die Wirts-DNA unter-

bunden, was als Strangtransferinhibierung bezeichnet wird (Cocohoba & Dong. 2008). Das aktive Zentrum der retroviralen Integrase besteht aus einer konservierten Aminosäurestruktur bestehend aus zwei Aspartat- und einer Glutamatgruppe (Kulkosky et al. 1992). Beide Substanzen Elvitegravir bzw. Raltegravir sind gut verträglich und werden in der HIV-1 Kombinationstherapie verwendet (Hoffmann & Rockstroh 2020).

In der Publikation von Herrn Contreras-Galindo und Kolleg*innen wurden gezeigt, dass die Proteaseinhibitoren Amprenavir und Indinavir keinen Einfluss auf die HERV-K(HML-2) reverse Transkriptase besaß und die Bildung von infektiösen HERV-K(HML-2) viralen Partikeln nicht beeinflusst wurde (Contreras-Galindo et al. 2017). Diese Aussage von Herrn Contreras-Galindo und Kolleg*innen wurden in dieser Arbeit bestätigt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die HIV-1 Proteaseinhibitoren (Amprenavir, Darunavir, Indinavir und Lopinavir) keinen Einfluss auf die Reifung der viralen HERV-K(HML-2) Partikeln besitzen sollten. Dies widerspricht den Ergebnissen von Frau Tyagi und Kolleg*innen, wobei hier gezeigt wurde, dass alle Proteaseinhibitoren die Partikelreifung beeinflussten (Tyagi et al. 2017). Die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Proteasen sind beide Aspartatproteasen, wobei nur Ähnlichkeiten zwischen beiden aktiven Zentren vorhanden sind: Die HIV-1 Protease besitzt im aktiven Zentrum eine Aminosäurestruktur bestehend aus Aspartat, Threonin und Glycin, wohingegen das aktive Zentrum der HERV-K(HML-2) Protease eine Aminosäurestruktur aus Aspartat, Threonin und Aspartat aufweist (Mager 2001; Tyagi et al. 2017). Darüber hinaus haben Richa Tyagi und Kolleg*innen die HIV-1 und HERV-K(HML-2) Proteasesequenzen miteinander verglichen und herausgefunden, dass nur eine ca. 20 % Sequenzhomologie zwischen der HIV-1 und HERV-K(HML-2) Protease vorhanden ist (Tyagi et al. 2017). Diese Unterschiede sind eine mögliche Erklärung dafür, dass die HIV-1 Proteaseinhibitoren spezifisch an das aktive Zentrum der HIV-1 Protease bindet und nur die Partikelreifung vom HIV-1 Virus inhibiert. Ebenfalls zeigte das humane T-Zell Leukämie Virus (HTLV) keine Beeinflussung ihres Replikationszykluses durch die HIV-1 spezifischen Proteaseinhibitoren (Pettit et al. 1998).

Tabelle 29: Zusammenfassung der Ergebnisse für die HIV-1 Inhibitoren

Einfluss der verschiedenen Inhibitoren (*N(t)RTI*, *NNRTI*, *Integraseinhibitoren* und *Proteaseinhibitoren*) auf die HERV-K(HML-2) Infektion, ✓ zeigte eine inhibitorische Wirkung, (✓) zeigte eine inhibitorische Wirkung, wobei diese eine geringere Sensitivität im Vergleich zu HIV-1 besaß, X zeigte keine inhibitorische Wirkung, - wurde in der Publikation nicht getestet.

Inhibitoren	Contreras-Galindo et al. 2017	Tyagi et al. 2017	Adriana Block
Zidovudin	✓	✓	✓
Stavudin	✓	✓	✓
Lamivudin	✓	✓	(✓)
Emtracitabin	✓	-	(✓)
Zalcitabin	✓	-	✓
Tenofovir	✓	✓	✓
Etravirin	✓	✓	X
Nevirapin	X	✓	X
Elvitegravir	-	-	(✓)
Raltegravir	-	✓	✓
Amprenavir	X	✓	X
Darunavir	-	✓	X
Indinavir	X	✓	X
Lopinavir	-	✓	X

Bei ca. 20 % der Patient*innen mit amyotropher Lateralsklerose (ALS) wurden HERV-K(HML-2) Viren (>1.000 Kopien/ml) im Blut nachgewiesen. In einer klinischen Phase 1 Studie werden einige dieser Patient*innen, die HERV-K Viren im Blut und HIV und HTLV negativ sind, über 24 Wochen mit einer Kombinationstherapie aus Tenofovir, Dolutegravir, Ritonavir und Darunavir behandelt. Anschließend wird die prozentuale Reduktion der HERV-K Viren im Blut mittels qPCR bestimmt und vor allem wird darauf geachtet, ob diese

Kombinationstherapie einen positiven Einfluss auf die ALS Symptome, die Lebensqualität bzw. die Lungenfunktion besitzt (ClinicalTrials.gov [5]).

Die Kombinationstherapie besteht aus einem NtRTI (Tenofovir), einem Integraseinhibitor (Dolutegravir) und zwei Proteaseinhibitoren (Ritonavir und Darunavir). Als Fazit dieser Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass vor allem Tenofovir einerseits die reverse Transkriptase Aktivität in den neu entstehenden viralen HERV-K Partikeln reduziert und andererseits auch sehr effektiv die Reinfektion von HERV-K Viren inhibieren kann. Nach erfolgter Reaktivierung von humanen endogenen Retroviren können die neu entstanden Viren andere Zellen infizieren. Dies wurde durch Herrn Contreras-Galindo und Kolleg*innen beobachtet, wobei *in vitro* in dieser Publikation keine Reintegration erfolgt ist (Contreras-Galindo et al. 2015). Dies sollte *in vivo* nicht ausgeschlossen werden und ein Integraseinhibitor ist auch Bestandteil dieser Kombinationstherapie. Die Wirksamkeit von Dolutegravir als Integraseinhibitor zur Inhibierung der HERV-K Reintegration wurde in den Publikationen von Tyagi et al. 2017 bzw. in dieser Arbeit nicht untersucht. Da die beiden untersuchten Integraseinhibitoren (Elvitegravir bzw. Raltegravir) die HERV-K(HML-2) Reintegration inhibierten, kann geschlussfolgert werden, dass auch Dolutegravir die Integration von humanen endogenen Retroviren inhibieren könnte. Darunavir als Proteaseinhibitor zeigte in dieser Arbeit keine Reduktion der HERV-K(HML-2) Infektion und Herr Towler und Kolleg*innen zeigten eine Resistenz der HERV-K Protease gegenüber Ritonavir (Towler et al. 1998), sodass schlussfolgernd die Proteaseinhibitoren wahrscheinlich keinen Effekt auf HERV-K(HML-2) Protease besitzen.

Eine HERV-K(HML-2) Reaktivierung erfolgt bei einer Vielzahl von verschiedensten anderen Erkrankungen, sodass ein möglicher Effekt einer anti-retroviralen Therapie in Betracht gezogen werden sollte, sodass mögliche weitere klinische Studien folgen könnten.

Schlussfolgernd inhibieren die nukleosidischen wie auch nukleotischen reversen Transkriptase Wirkstoffe die HERV-K(HML-2) Replikation, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit wie auch die publizierten Ergebnisse eindeutig bestätigt wurden (siehe Tabelle 29). Für die nichtnukleosidischen reverse Transkriptase Inhibitoren widersprechen sich die Ergebnisse, wobei die

NNRTIs spezifisch auf die hydrophobe Tasche der HIV-1 reversen Transkriptase angepasst wurde und sollte somit nur spezifisch die HIV-1 reversen Transkriptase inhibieren. Ebenfalls wurden die Proteaseinhibitoren spezifisch auf die HIV-1 Protease angepasst, sodass kein inhibitorischer Effekt auf die HERV-K(HML-2) Replikation in dieser Arbeit wie auch in der Publikation von Contreas-Galindo et al. 2017 nachgewiesen werden konnte. Durch die konservierte Aminosäurestruktur der retroviralen Integrase hemmen auch die gegen HIV-1 entwickelten Integraseinhibitoren die HERV-K(HML-2) Integrase, wodurch die HERV-K(HML-2) Replikation beeinträchtigt wird. Daraufhin können die nukleosidischen wie auch nukleotidischen reversen Transkriptase Inhibitoren und die Integraseinhibitoren in einer möglichen Kombinationstherapie eingesetzt werden.

6. Zusammenfassung

HERVs sind Sequenzen von exogenen Retroviren, die vertikal über die Keimbahnzellen vererbt werden. In gesunden Zellen wird die Expression epigenetisch kontrolliert. Unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen (Tumore und Autoimmunerkrankungen) kann jedoch eine Reaktivierung erfolgen. In diesem Fall werden virale Partikel gebildet, sodass eine *de novo* Infektion oder eine Retrotransposition möglich sind.

Im Zuge der Arbeit wurden deshalb diverse Restriktionsverfahren analysiert. Zunächst wurde der inhibitorische Effekt der verschiedenen zellulären Restriktionsfaktoren (APOBEC 3G und PYHIN-Proteine) auf die HERV-K(HML-2)-Partikelproduktion untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse belegen, dass die nukleären PYHIN Proteine MND4 und IFIX, ebenso wie IFI16, die HERV-K(HML-2)-Partikelproduktion signifikant reduzieren.

Darüber hinaus wurde im Rahmen der Arbeit nachgewiesen, dass durch die Expression von HERV-K(HML-2) eine Stressreaktion mit einhergehender Ausbildung einer Stressgranula erfolgt. Durch die Ausbildung der Stressgranula wird die zelluläre Proteinexpression herunter reguliert und somit auch die virale Proteinsynthese beeinflusst. Die gewonnenen Daten belegen, dass im Gegensatz zu HIV-1, HERV-K(HML-2) dies nicht unterbinden kann.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde untersucht, welche antiretroviralen HIV-1-Medikamente die HERV-K(HML-2)-Infektion und die Bildung von reifen viralen Partikeln inhibieren können. Dafür wurden VSV-G-pseudotypisierte infektiöse HIV-1- und HERV-K(HML-2)-Viren mit einem GFP-Reporter hergestellt und humane Zelllinien in der Anwesenheit von verschiedenen Inhibitor-konzentrationen (NRTI, NtRTI, NNRTI & Integraseinhibitoren) infiziert. Die Proteaseinhibitoren wurden während der Herstellung der Viren hinzugegeben. Es konnten nukleosidische und nukleotidische reverse Transkriptaseinhibitoren sowie Integraseinhibitoren mit hoher Aktivität gegenüber HERV-K(HML-2) identifiziert werden. Alle getesteten NNRTIs und Proteaseinhibitoren zeigten keine Aktivität gegen HERV-K(HML-2).

7. Abstract

HERVs are sequences of originally exogenous retroviruses that are vertically transmitted upon integration in a germ line cell. In healthy tissues the expression of HERVs is epigenetically controlled. However, under some pathophysiological condition (cancer and autoimmune diseases) a reactivation of human endogenous retrovirus can occur. In this context a production of viral particles can happen, so that *de novo* infection or retrotransposition events are possible.

Due to this fact several restriction-modes were analysed. First of all, the inhibitory effect of different cellular antiviral factors including APOBEC 3G and PYHIN proteins (AIM2, MND4, IFIX) on the HERV-K(HML-2) particle production were tested. The results obtained demonstrate that the nuclear PYHIN proteins MND4 and IFIX as well as IFI16 reduced significantly the HERV-K(HML-2) particle production.

Furthermore, it is proven in this thesis, that the intracellular expression of HERV-K(HML-2) induced a stress reaction with a progression to stress granule formation. The stress granules reduced the intracellular protein expression and this has also an effect on the viral protein synthesis. In contrast to HIV-1, HERV-K(HML-2) not only induces stress granules, but it is also not able to prevent stress granule formation induced by other means.

In a next part of this thesis, it has been analyzed which of the antiretroviral HIV-1-drugs can inhibit the HERV-K(HML-2)-infection and formation of mature particles. Therefore VSV-G pseudotyped infectious HERV-K(HML-2)- and HIV-1-viral particle with a GFP-reporter were produced and human cell lines were infected in the presence of varying inhibitor concentrations (NRTIs, NtRTI, NNRTIs or integrase inhibitors). The protease inhibitors were already added at the viral particle production step. NRTIs, NtRTIs and integrase inhibitors with a high activity against HERV-K(HML-2) were identified. All tested NNRTIs and protease inhibitors are non-functional against HERV-K(HML-2).

8. Abkürzungsverzeichnis

3TC	Lamivudin
APOBEC 3G (A3G)	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3 G
Abb.	Abbildung
AIM2	absent in melanoma 2
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	Zidovudin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
d. h.	das heißt
d4T	Stavudin
ddC	Zalcitabin
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
eIF2B	eukaryotischer Initiatorfaktor 2 B
eIF2 α	eukarotischer Initiatorfaktor 2 α
Env	Hüllprotein („envelope protein“)
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAM	Fluorescein
FKS	fetales Kälberserum
FTC	Emtricitabin
G3BP	Ras-GTPase-activating protein SH3- domain-binding protein
Gag	gruppenspezifische Antigen
GAP	GTPase-aktivierendes Protein

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCN2	general control nonderepressible 2
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HCM	human Cytomegalovirus
HERV	humane endogene Retroviren
HEX	Hexachlorofluorescein
HIV	human Immundefizienz Virus
HML	human MMTV-like
HMM	high molecular mass
HRI	heme regulated eIF2 α kinase
HSV	Herpes simplex Virus
HTLV	human T-Zell-Leukämie-Virus
IFI16	interferon gamma inducible protein 16
IFIX (PYHIN 1)	pyrin and HIN domain family member 1
IPS-1	interferone- β promotor stimulator 1
IRF	interferon regulatory transcription factor
Kb	Kilobasen
Ktrl.	Kontrollplasmid
LGP2	laboratory of genetics and physiology 2
LINE	long interspersed elements
LMM	low molecular mass
LTR	long terminal repeat
MAM	Mitochondrien-assoziierte Membran
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5
MMTV	mouse mamary tumor virus
MNDA	myeloid cell nuclear differentiation antigen
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells

NNRTI	nichtnukleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren
NRTI	nukleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren
NTAP	N-terminal tandem affinity purification with a calmodulin-binding protein (CBP) and a streptavidin-binding protein (SBP)
NTP	Nukleosidtriphosphate
NtRTI	nukleotidische reverse Transkriptase Inhibitoren
NVP	Nevirapin
OAS	Oligoadenylatsynthetase
p24	HIV-1 Kapsidprotein mit einer Größe von 24 kDa
p27	HERV-K(HML-2) Kapsidprotein mit einer Größe von 27 kDa
PABP	Poly(A)-binding protein
PBS	phosphate-buffered saline
PERK/PEK	PKR-like ER kinase
PERT	qPCR-based product-enhanced reverse transcriptase
PFA	Paraformaldehyd
PYHIN	pyrin and HIN 200 domain family
PKR	Proteinkinase R
Pol	Polymerase
Pro	Protease
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RcRE	Rec responsive element
Rec	regulation of expression encoded by cORF
RIG-I	retinoic acid inducible gene I receptors
RLR	retinoic acid inducible gene I-like receptors

RNA	Ribomukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	Rhodamin X
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
SHRNPs	Staufen-1-HIV-Ribonukleoproteinkomplexe
SINE	short interspersed elements
ss	einzelsträngig
Tab.	Tabelle
TDF	Tenofovirdisproxilfumarat
TRAF	tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor
vRNA/vDNA	virale RNA oder virale DNA

9. Selbständigkeitserklärung

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Robert Koch-Institut in Berlin in der Zeit vom 15. Januar 2017 bis zum 31. Juli 2021 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den

Adriana Block

10. Literaturverzeichnis

- Abrahamyan LG**, Chatel-Chaix L, Ajamian L, Milev MP, Monette A, Clément JF, Song R, Lehmann M, DesGroseillers L, Laughrea M, Boccaccio G, Mouland AJ. Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *J Cell Sci.* **2010**. 123(Pt 3):369–83.
- Anderson P, Kedersha N**. Stressful initiations. *J Cell Sci.* **2002**. 115(Pt 16):3227–34.
- Anderson P, Kedersha N**. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2009**. 10(6):430–6.
- Andries K**, Azijn H, Thielemans T, Ludovici D, Kukla M, Heeres J, Janssen P, De Corte B, Vingerhoets J, Pauwels R, de Béthune MP. TMC125, a novel next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor active against nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**. 48(12):4680–6.
- Anwar F**, Davenport MP, Ebrahimi D. Footprint of APOBEC3 on the genome of human retroelements. *J Virol.* **2013**. 87:8195–204.
- Armbruester V**, Sauter M, Krautkraemer E, Meese E, Kleiman A, Best B, Roemer K, Mueller-Lantsch N. A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res.* **2002**. 8(6):1800–7.
- Balzarini J**, Wedgwood O, Kruining J, Pelemans H, Heijntink R, De Clercq E, McGuigan C. Anti-HIV and anti-HBV activity and resistance profile of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC) and its arylphosphoramidate derivative CF 1109. *Biochem Biophys Res Commun.* **1996**. 225(2):363–9.

- Bannert N, Kurth R.** Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004.** 101 Suppl 2:14572–9.
- Bannert N, Kurth R.** The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **2006.** 7:149–73.
- Bannert N, Hofmann H, Block A, Hohn O.** HERVs new role in cancer: from accused perpetrators to cheerful protectors. *Front Microbiol.* **2018.** 9:178
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* **1983.** 220(4599):868–71.
- Behrendt R, Fiebig U, Norley S, Gürtler L, Kurth R, Denner J.** A neutralization assay for HIV-2 based on measurement of provirus integration by duplex real-time PCR. *Journal of virological methods.* **2009.** 159:40-6.
- Beimforde N, Hanke K, Ammar I, Kurth R, Bannert N.** Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. *Virology.* **2008.** 371(1):216–25.
- Belgnaoui SM, Paz S, Hiscott J.** Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr Opin Immunol.* **2011.** 23(5):564–72.
- Berkhout B, Jebbink M, Zsiros J.** Identification of an active reverse transcriptase enzyme encoded by a human endogenous HERV-K retrovirus. *J Virol.* **1999.** 73(3):2365–2375.
- Bieda K, Hoffmann A, Boller K.** Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. *J Gen Virol.* **2001.** 82(Pt 3):591–596.

- Bittner JJ.** Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science*. **1936**. 84(2172):162.
- Block A.** Nachweis von HERV-(HML-2) Proteinen und RNAs in der HMM APOBEC3G Granula. Masterarbeit. **2016**.
- Blond JL,** Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol*. **2000**. 74(7):3321–3329.
- Bogerd HP,** Wiegand HL, Doehle BP, Lueders KK, Cullen BR. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res*. **2006a**. 34(1):89–95.
- Bogerd HP,** Wiegand HL, Hulme AE, Garcia-Perez JL, O'Shea KS, Moran JV, Cullen BR. Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2006b**. 103(23):8780–5.
- Boller K,** Janssen O, Schuldes H, Tönjes RR, Kurth R. Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J Virol*. **1997**. 71(6):4581–8.
- Boller K,** Schönfeld K, Lischer S, Fischer N, Hoffmann A, Kurth R, Tönjes RR. Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *J Gen Virol*. **2008**. 89(Pt 2):567–72.
- Bosso M,** Prelli Bozzo C, Hotter D, Volcic M, Stürzel CM, Rammelt A, Ni Y, Urban S, Becker M, Schelhaas M, Wittmann S, Christensen MH, Schmidt FI, Gramberg T, Sparrer KMJ, Sauter D, Kirchhoff F. Nuclear PYHIN proteins target the host transcription factor Sp1 thereby restricting HIV-1 in human macrophages and CD4+ T cells. *PLoS Pathog*. **2020**. 16(8):e1008752.
- Burmeister T,** Ebert AD, Pritze W, Loddenkemper C, Schwartz S, Thiel E. Insertional polymorphisms of endogenous HERV-K113 and HERV-

K115 retroviruses in breast cancer patients and age-matched controls. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **2004**. 20(11):1223–9.

Büscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res*. **2005**. 65(10):4172–80.

Buzdin A, Kovalskaya-Alexandrova E, Gogvadze E, Sverdlov E. At least 50% of human-specific HERV-K (HML-2) long terminal repeats serve in vivo as active promoters for host nonrepetitive DNA transcription. *Journal of virology*. **2006**. 80:10752–62.

Callahan R, Drohan W, Tronick S, Schlom J. Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1982**. 79(18):5503–7.

Carmi S, Church GM, Levanon EY. Large-scale DNA editing of retrotransposons accelerates mammalian genome evolution. *Nat Commun*. **2011**. 2:519.

Chen H, He G, Chen Y, Zhang X, Wu S. Differential activation of NLRP3, AIM2, and IFI16 inflammasomes in humans with acute and chronic hepatitis B. *Viral Immunol*. **2018**. 31:639–45.

Chiu YL, Witkowska HE, Hall SC, Santiago M, Soros VB, Esnault C, Heidmann T, Greene WC. High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2006**. 103(42):15588–93.

Chiu YL, **Greene WC**. The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Rev. Immunol*. **2008**. 26:317–53.

Chow JH, Jeffries CM, Kwan AH, Guss JM, Trewhella J. Calmodulin disrupts the structure of the HIV-1 MA protein. *Journal of molecular biology*. **2010**. 400(4):702-14

- Chudak C**, Beimforde N, George M, Zimmermann A, Lausch V, Hanke K, Bannert N. Identification of late assembly domains of the human endogenous retrovirus-K(HML-2). *Retrovirology*. **2013**. 10:140.
- Cocohoba J, Dong BJ**. Raltegravir: the first HIV integrase inhibitor. *Clinical therapeutics*. **2008**. 30(10):1747–65.
- Coffin JM**, Hughes SH, Varmus HE. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1997**.
- Conrady CD**, Zheng M, Fitzgerald KA, Liu C, Carr DJJ. Resistance to HSV-1 infection in the epithelium resides with the novel innate sensor, IFI-16. *Mucosal immunology*. **2012**. 5:173–183.
- Contreras-Galindo R**, Kaplan MH, Markovitz DM, Lorenzo E, Yamamura Y. Detection of HERV-K(HML-2) viral RNA in plasma of HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retrovir*. **2006**. 22:979–84.
- Contreras-Galindo R**, Kaplan MH, Leissner P, Verjat T, Ferlenghi I, Bagnoli F, Giusti F, Dosik MH, Hayes DF, Gitlin SD, Markovitz DM. Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. *J Virol*. **2008**. 82:9329–36.
- Contreras-Galindo R**, Kaplan MH, Dube D, Gonzalez-Hernandez MJ, Chan S, Meng F, Dai M, Omenn GS, Gitlin SD, Markovitz DM. Human Endogenous Retrovirus Type K (HERV-K) Particles Package and Transmit HERV-K-Related Sequences. *J Virol*. **2015**. 89(14):7187–201.
- Contreras-Galindo R**, López P, Vélez R, Yamamura Y. HIV-1 infection increases the expression of human endogenous retroviruses type K (HERV-K) in vitro. *AIDS Res Hum Retrovir*. **2017**. 23:116–22.
- Costas J**. evolutionary dynamics of human endogenous retrovirus family HERV-K inferred from full-length proviral genomes. *Journal of molecular evolution*. **2001**. 53:237–43.
- Crow MS, Cristea IM**. Human Antiviral Protein IFIX Suppresses Viral Gene Expression during Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) Infection and Is

Counteracted by Virus-induced Proteasomal Degradation. *Mol Cell Proteomics*. **2017**. 16(4 Suppl 1):S200–14.

Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophysical Chemistry*. **2002**. 97(2-3):159–72.

Deininger PL, Batzer MA. Mammalian retroelements. *Genome Res*. **2002**. 12(10):1455–65.

Dell'Oste V, Gatti D, Giorgio AG, Gariglio M, Landolfo S, Andrea M de. The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: a key player in the antiviral response. *The new microbiologica*. **2015**. 38:5–20.

Dewannieux M, Blaise S, Heidmann T. Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. *J Virol*. **2005**. 79(24):15573–7.

Dewannieux M, Harper F, Richaud A, Letzelter C, Ribet D, Pierron G, Heidmann T. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res*. **2006**. 16(12):1548–56.

Dey M, Cao C, Dar AC, Tamura T, Ozato K, Sicheri F, Dever TE. Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell*. **2005**. 122(6):901–13.

Eckwahl M, Telesnitsky A, Wolin SL. Host RNA packaging by retroviruses: a newly synthesized story. *mBio*. **2016**. 7(1):e02025-15.

Engelmann A & Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature review microbiologie*. **2012**. 10:279–90.

Esnault C, Priet S, Ribet D, Heidmann O, Heidmann T. Restriction by APO-BEC3 proteins of endogenous retroviruses with an extracellular life cy-

cle: *ex vivo* effects and *in vivo*"traces" on the murine IAPE and human HERV-K elements. *Retrovirology*. **2008**. 5:75

Flexner C. Flexner and HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med*. **1998**. 338:1281–93.

Frank O, Jones-Brando L, Leib-Mösch C, Yolken R, Seifarth W. Altered Transcriptional Activity of Human Endogenous Retroviruses in Neuroepithelial Cells after Infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Infectious Diseases*. **2006**. 194(10):1447–49.

Friedrich J. Analyse der Restriktion des Humanen Endogenen Retrovirus-K (HML-2) durch das Protein IFI-16. Masterarbeit. **2021**.

Fuchs NV, Kraft M, Tondera C, Hanschmann K-M, Löwer J, Löwer R. Expression of the Human Endogenous Retrovirus (HERV) Group HML-2/HERV-K Does Not Depend on Canonical Promoter Elements but Is Regulated by Transcription Factors Sp1 and Sp3. *Journal of virology*. **2011**. 85:3436–3448.

Fuchs NV, Loewer S, Daley GQ, Izsvak Z, Lower J, Lower R. Human endogenous retrovirus K (HML-2) RNA and protein expression is a marker for human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Retrovirology*. **2013**. 10:115.

Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH, Weinhold K, Rideout JL, Freeman GA, Lehrman SN, Bolognesi DP, Broder S, Mitsuya H, Barry W. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1986**. 83(21):8333–7.

Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*. **2007**. 446(7138):916–20.

- Garcia-Montojo M**, Doucet-O'Hare T, Henderson L, Nath A. Human Endogenous Retrovirus-K (HML-2): A comprehensive review. *Crit Rev Microbiol.* **2018.** 44(6): 715–38.
- Gariano GR**, Dell'Oste V, Bronzini M, Gatti D, Luganini A, de Andrea M, Gribaudo G, Gariglio M, Landolfo S. The intracellular DNA sensor IFI16 gene acts as restriction factor for human cytomegalovirus replication. *PLoS pathogens.* **2012.** 8:e1002498.
- Gariglio M**, Mondini M, de Andrea M, Landolfo S. The Multifaceted Interferon-Inducible p200 Family Proteins: From Cell Biology to Human Pathology. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* **2011.** 31(1):159–72.
- Gelderblom HR**, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology.* **1987.** 156(1):171–6.
- George M**, Schwecke T, Beimforde N, Hohn O, Chudak C, Zimmermann A, et al. Identification of the protease cleavage sites in a reconstituted Gag polyprotein of an HERV-K(HML-2) element. *Retrovirology.* **2011.** 8:30.
- Goody RS**, Müller B, Restle T. Factors contributing to the inhibition of HIV reverse transcriptase by chain-terminating nucleotides in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* **1991.** 291(1):1–5.
- Gramberg T**, Sunseri N, Landau NR. Accessories to the crime: recent advances in HIV accessory protein biology. *Curr HIV/AIDS Rep.* **2009.** 6(1):36–42.
- Grob PM**, Wu JC, Cohen KA, Ingraham RH, Shih CK, Hargrave KD, McTague TL, Merluzzi VJ. Nonnucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase: nevirapine as a prototype drug. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **1992.** 8(2):145–52.
- Grow EJ**, Flynn RA, Chavez SL, Bayless NL, Wossidlo M, Wesche DJ, Martin L, Ware CB, Blish CA, Chang HY. Intrinsic retroviral reactivation in

human preimplantation embryos and pluripotent cells. *Nature*. **2015**. 522(7555):221–25.

Hahn S, Ugurel S, Hanschmann KM, Strobel H, Tondera C, Schadendorf D, Löwer J, Löwer R. Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **2008**. 24(5):717–23.

Hanke K, Kramer P, Seeher S, Beimforde N, Kurth R, Bannert N. Reconstitution of the ancestral glycoprotein of human endogenous retrovirus k and modulation of its functional activity by truncation of the cytoplasmic domain. *J Virol*. **2009**. 83:12790–800.

Hanke K. Funktionelle Charakterisierung der HERV-K Proteine Env und Rec. Dissertation. **2010**.

Hanke K, Chudak C, Kurth R, Bannert N. The Rec protein of HERV-K(HML-2) upregulates androgen receptor activity by binding to the human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein (hSGT). *Int J Cancer*. **2013a**. 132:556–67.

Hanke K, Hohn O, Liedgens L, Fiddeke K, Wamara J, Kurth R, Bannert N. Staufen-1 interacts with the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) rec and gag proteins and increases virion production. *J. Virol*. **2013b**. 87(20):11019–30.

Hanke K, Hohn O, Bannert N. HERV-K(HML-2), a seemingly silent subtenant - but still waters run deep. *APMIS*. **2016**. 124(1-2):67–87.

Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, Grobler JA, Espeseth A, Gabryelski L, Schleif W, Blau C, Miller MD. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science*. **2000**. 287(5453):646–50.

Henriet S, Mercenne G, Bernacchi S, Paillart JC, Marquet R. Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. **2009**. 73(2):211–32.

- Hoffmann C, Rockstroh JK.** HIV 2020/2021. Medizin Fokus Verlag. **2020.**
ISBN-13: 978-3-941727-26-7.
- Hohn O,** Hanke K, Lausch V, Zimmermann A, Mostafa S, Bannert N. CMV-promoter driven codon-optimized expression alters the assembly type and morphology of a reconstituted HERV-K(HML-2). *Viruses.* **2014.** 6(11):4332–45.
- Honda K,** Takaoka A and Taniguchi T. Type I Inteferon Gene Inductionby the Interferon Regulatory FactorFamily of Transcription Factors. *Immunity.* **2006.** 25:349–60.
- Horie M,** Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin J, Tomonaga K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian gnomes. *Nature.* **2010.** 463:84–7.
- Horner SM,** Liu HM, Park HS, Briley J, Gale M Jr. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2011.** 108(35):14590–5.
- Hornung V,** Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science.* **2006.** 314(5801):994–7.
- Horwitz JP,** Chua J, Noel M. Nucleosides. V. The monomesylates of 1-(2'-deoxy-beta-D-lyxofuranosyl)thymine. *The Journal of Organic Chemistry.* 29. **1964.** 2076–8.
- Horwitz JP,** Chua J, Da Rooge MA, Noel M, Klundt IL. Nucleosides. IX. The formation of 2',2'-unsaturated pyrimidine nucleosides via a novel beta-elimination reaction. *J Org Chem.* **1966.** Jan;31(1):205–11.
- Hotter D,** Bosso M, Jønsson KL, Krapp C, Stürzel CM, Das A, Littwitz-Salomon E, Berkhout B, Russ A, Wittmann S, Gramberg T, Zheng Y, Martins LJ, Planelles V, Jakobsen MR, Hahn BH, Dittmer U, Sauter D & Kirchhoff F. IFI16 Targets the Transcription Factor Sp1 to Suppress

- HIV-1 Transcription and Latency Reactivation. *Cell Host Microbe*. **2019**. 25(6):858–72.e13.
- Huang Y**, Liu L, Ma D, Liao Y, Lu Y, Huang H, Qin W. Human cytomegalovirus triggers the assembly of AIM2 inflammasome in THP-1-derived macrophages. *J Med Virol*. **2017a**. 89:2188–95.
- Huang Y**, Ma D, Huang H, Lu Y, Liao Y, Liu L, Liu X, Fang F. Interaction between HCMV pUL83 and human AIM2 disrupts the activation of the AIM2 inflammasome. *Virol J*. **2017b**. 14:34.
- Hughes JF**, **Coffin JM**. Human endogenous retrovirus K solo-LTR formation and insertional polymorphisms: implications for human and viral evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2004**. 101(6):1668–72.
- Iversen AK**, Shafer RW, Wehrly K, Winters MA, Mullins JI, Chesebro B, Merigan TC. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J Virol*. **1996**. 70(2):1086–90.
- Jakobsen MR**, Bak RO, Andersen A, Berg RK, Jensen SB, Tengchuan J, Jin T, Laustsen A, Hansen K, Ostergaard L, Fitzgerald KA, Xiao TS, Mikkelsen JG, Mogensen TH, Paludan SR. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2013**. 110:e4571–80.
- Jern P**, Sperber GO, Blomberg J. Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy. *Retrovirology*. **2005**. 2:50.
- Jiang X**, Kinch LN, Brautigam CA, Chen X, Du F, Grishin NV, Chen ZJ. Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity*. **2012**. 36(6):959–73.

- Johnson WE, Coffin JM.** Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999.** 96(18):10254–60.
- Johnstone RW, Trapani JA.** Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins. *Molecular and cellular biology.* **1999.** 19:5833–8.
- Kammerer U,** Germeyer A, Stengel S, Kapp M, Denner J. Human endogenous retrovirus K (HERV-K) is expressed in villous and extravillous cytotrophoblast cells of the human placenta. *J Reprod Immunol.* **2011.** 91(1–2):1–8.
- Kedersha NL,** Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol.* **1999.** 147(7):1431–42.
- Kedersha N,** Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, Gilks N, Golan DE, Anderson P. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol.* **2000.** 151(6):1257–68.
- Kedersha N, Anderson P.** Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans.* **2002.** 30(Pt 6):963–9.
- Kedersha N,** Chen S, Gilks N, Li W, Miller IJ, Stahl J, Anderson P. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell.* **2002.** 13(1):195–210.
- Kedersha N,** Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol.* **2005.** 169(6):871–84.

- Kim Y**, Lee JH, Park JE, Cho J, Yi H, Kim VN. PKR is activated by cellular dsRNAs during mitosis and acts as a mitotic regulator. *Genes Dev.* **2014.** 28(12):1310–22.
- Konstantoulas CJ**, Hagen B, Indik S. Moderate sensitivity of mouse mammary tumour virus to inhibition by human APOBEC3G. *J Gen Virol.* **2017.** 98(9):2362-2367.
- Kovalskaya E**, Buzdin A, Gogvadze E, Vinogradova T, Sverdlov E. Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions. *Virology.* **2006.** 346(2):373–378.
- Kramer P.** Untersuchung zum Hüllprotein und dem Tropismus des humanen endogenen Retrovirus K. Dissertation. **2011.**
- Krishnamoorthy T**, Pavitt GD, Zhang F, Dever TE, Hinnebusch AG. Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol Cell Biol.* **2001.** 21(15):5018–30.
- Kulkosky J**, Jones KS, Katz RA, Mack JP, Skalka AM. Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol Cell Biol.* **1992.** 12(5):2331–8.
- Kwun HJ**, Han HJ, Lee WJ, Kim HS, Jang KL. Transactivation of the human endogenous retrovirus K long terminal repeat by herpes simplex type 1 immediate early protein O. *Elsevier.* **2002.** 86(1-2):93-100
- Lataillade M, Kozal MJ.** The hunt for HIV-1 integrase inhibitors. *AIDS Patient Care STDS.* **2006.** 20(7):489–501.
- Lausch V.** Etablierung eines Verfahrens zur Kombination der Elektronenmikroskopie (EM) mit der Spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (TERS) sowie Untersuchungen zum Infektionsprozess und der Ult-

rastruktur dem Humanen Endogenen Retrovirus K (HERV-K). Dissertation. **2013**.

Lee YN, Bieniasz PD. Reconstitution of an infectious human endogenous retro-virus. *PLoS Pathog.* **2007**. 3(1):e10.

Lo Cigno I, Andrea M de, Borgogna C, Albertini S, Landini MM, Peretti A, Johnson KE, Chandran B, Landolfo S, Gariglio M. The Nuclear DNA Sensor IFI16 Acts as a Restriction Factor for Human Papillomavirus Replication through Epigenetic Modifications of the Viral Promoters. *Journal of virology.* **2015**. 89:7506–20.

Löwer R, Boller K, Hasenmaier B, Korbmacher C, Müller-Lantzsch N, Löwer J, Kurth R. Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**. 90:4480–4.

Löwer R. The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *Trends Microbiol.* **1999**. 7(9):350–6.

Lu M, Blacklow SC, Kim PS. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol.* **1995**. 2(12):1075–82.

Lugrin J, Martinon F. The AIM2 inflammasome: sensor of pathogens and cellular perturbations. *Immunological reviews.* **2018**. 281(1):99–114.

Lv Z, Chu Y, Wang Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV AIDS (Auckl).* **2015**. 7:95–104.

Machado J, Salomon H, Oliveira M, Tsoukas C, Krayevsky AA, Wainberg MA. Antiviral activity and resistance profile of phosphazid--a novel prodrug of AZT. *Nucleosides Nucleotides.* **1999**. 18(4-5):901–6.

Maeda K, Desai D, Aoki M, Nakata H, Kodama WN, Mitsuya H. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. *Antiviral Therapy.* **2014**. 19:179-89

- Mager PP.** The active site of HIV-1 protease. *Medicinal research reviews*. **2001**. 21(4):348–53.
- Magin C,** Lower R, Lower J. cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. *J Virol*. **1999**. 73(11):9496–507.
- Mangeney M,** Renard M, Schlecht-Louf G, Bouallaga I, Heidmann O, Letzelter C, Richaud A, Ducos B, Heidmann T. Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2007**. 104(51):20534–9.
- Manghera M,** Douville RN. 2013 Endogenous retrovirus-K promoter: a landing strip for inflammatory transcription factors?. *Retrovirology*. **2013**. 10:16.
- Mariani R,** Chen D, Schröfelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, Münk C, Nymark-McMahin H, Landau NR. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*. **2003**. 114(1):21-31
- Maruzuru Y,** Ichinohe T, Sato R, Miyake K, Okano T, Suzuki T, Koshiba T. Herpes Simplex Virus 1 VP22 inhibits AIM2-dependent Inflammasome activation to enable efficient viral replication. *Cell Host Microbe*. **2018**. 23:254–65.
- McEwen E,** Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A, Chen JJ, Anderson P, Kaufman RJ. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J Biol Chem*. **2005**. 280(17):16925–33.
- Mi S,** Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC Jr, McCoy JM. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*. **2000**. 403(6771):785–9.

- Mitsuya H**, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, Broder S. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1985**. 82(20):7096–100.
- Mondini M**, Vidali M, Airò P, De Andrea M, Riboldi P, Luigi P, Marisa M, Gariglio M, Landolfo S. Role of the interferon-inducible gene IFI16 in the etiopathogenesis of systemic autoimmune disorders. *Autoimmunity, novel applications of basic research*. **2007**. 1110(1):47-56
- Moyes DL**, Martin A, Sawcer S, Temperton N, Worthington J, Griffiths DJ, Venables PJ. The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. *Genomics*. **2005**. 86(3):337–41.
- Nisole S**, Stoye JP, Saïb A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol*. **2005**. 3(10):799–808.
- Okimoto T**, Friedmann T, Miyanochara A. VSV-G envelope glycoprotein forms complexes with plasmid DNA and MLV retrovirus-like particles in cell-free conditions and enhances DNA transfection. *Mol Ther*. **2001**. 4(3):232–8.
- Olson MF, Marais R**. Ras protein signaling. *Immunology*. **2000**. 12(1):63–73.
- Onomoto K**, Yoneyama M, Fung G, Kato H, Fujita T. Antiviral innate immunity and stress granule responses. *Trends Immunol*. **2014**. 35(9):420–8.
- Parker F**, Maurier F, Delumeau I, Duchesne M, Faucher D, Debussche L, Dugue A, Schweighoffer F, Tocque B. A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein. *Molecular and Cellular Biology*. **1996**. 2561–9.
- Pettit SC**, Sanchez R, Smith T, Wehbie R, Derse D, Swanstrom R. HIV type 1 protease inhibitors fail to inhibit HTLV-I gag processing in infected cells. *AIDS research and human retrovirus*. **1998**. 14:1007-14.

- Pizzato M**, Erlwein O, Bonsall D, Kaye S, Muir D, McClure MO. A one-step SYBR Green I-based product-enhanced reverse transcriptase assay for the quantitation of retroviruses in cell culture supernatants. *Journal of virological methods*. **2009**. 156:1-7
- Poiesz BJ**, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1980**. 77(12):7415–9.
- Rao S**, Cinti A, Temzi A, Amorim R, You JC, Mouland AJ. HIV-1 NC-induced stress granule assembly and translation arrest are inhibited by the dsRNA binding protein Staufen1. *RNA*. **2018**. 24(2):219–36.
- Rao S**, Hassine S, Monette A, Amorim R, DesGroseillers L, Mouland AJ. HIV-1 requires Staufen1 to dissociate stress granules and to produce infectious viral particles. *RNA*. **2019**. 25(6):727–36.
- Reinholz M**, Kawakami Y, Salzer S, Kreuter A, Dombrowski Y, Koglin S, Kresse S. HPV16 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. **2013**. 305:723–732.
- Reynier F**, Verjat T, Turrel F, Imbert PE, Marotte H, Mouglin B, Miossec P. Increase in Human Endogenous Retrovirus HERV-K (HML-2) Viral Load in Active Rheumatoid Arthritis. *clinical immunology*. **2009**. 70(3):295–9.
- Riddler SA**, Anderson RE, Mellors JW. Antiretroviral activity of stavudine (2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine, D4T). *Antiviral Res*. **1995**. 27(3):189–203.
- Roquebert B**, Damond F, Collin G, Matheron S, Peytavin G, Bénard A, Campa P, Chêne G, Brun-Vézinet F, Descamps D. HIV-2 integrase gene polymorphism and phenotypic susceptibility of HIV-2 clinical isolates to the integrase inhibitors raltegravir and elvitegravir in vitro. *J Antimicrob Chemother*. **2008**. 62(5):914–20.

- Rote NS**, Chakrabarti S, Stetzer BP. The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Placenta*. **2004**. 25(8-9):673–83.
- Ruprecht K**, Ferreira H, Flockerzi A, Wahl S, Sauter M, Mayer J, Mueller-Lantsch N. Human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) RNA transcripts are selectively packaged into retroviral particles produced by the human germ cell tumor line Tera-1 and originate mainly from a provirus on chromosome 22q11.21. *J Virol*. **2008**. 82(20):10008–16.
- Sadler AJ**, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol*. **2008**. 8(7):559–68.
- Sauter M**, Roemer K, Best B, Afting M, Schommer S, Seitz G, Hartmann M, Mueller-Lantsch N. Specificity of antibodies directed against Env protein of human endogenous retroviruses in patients with germ cell tumors. *Cancer Res*. **1996**. 56(19):4362–5.
- Savas A**. Inhibition von Betaretroviren durch das interferoninduzierte Protein IFI16. Masterarbeit. **2020**.
- Schlee M**, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity*. **2009**. 31(1):25–34.
- Sharma BR**, Karki R, Kanneganti TD. Role of AIM2 inflammasome in inflammatory diseases, cancer and infection. *Eur. J. Immunol*. **2019**. 49:1998–2011.
- Sluis-Cremer N**, Temiz NA, Bahar I. Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding. *Curr HIV Res*. **2004**. 2(4):323–32.

- Stopak K**, De Noronha C, Yonemoto W, Greene WC. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Molecular Cell*. **2003**. 12(3):591-601
- Soltani A**, Hashemy SI, Zahedi Avval F, Soleimani A, Rafatpanah H, Rezaee SA, Griffith R, Mashkani B. Molecular targeting for treatment of human T-lymphotropic virus type 1 infection. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2019**. 109:770-8
- Soto-Rifo R**, Valiente-Echeverria F, Rubilar PS, Garcia-de-Gracia F, Ricci EP, Limousin T, Décimo D, Mouland AJ, Ohlmann T. HIV-2 genomic RNA accumulates in stress granules in the absence of active translation. *Nucleic Acids Res*. **2014**. 42(20):12861–75.
- Subramanian RP**, Wildschutte JH, Russo C, Coffin JM. Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology*. **2011**. 8:90.
- Thielen BK**, Klein KC, Walker LW, Rieck M, Buckner JH, Tomblinson GW, Lingappa JR. T cells contain an RNase-insensitive inhibitor of APOBEC3G deaminase activity. *PLoS Pathog*. **2007**. 3(9):1320–34.
- Torii Y**, Kawada JI, Murata T, Yoshiyama H, Kimura H, Ito Y. Epstein-Barr virus infection-induced inflammasome activation in human monocytes. *PLoS ONE*. **2017**. 12:e0175053.
- Toufaily C**, Landry S, Leib-Mosch C, Rassart E, Barbeau B. Activation of LTRs from Different Human Endogenous Retrovirus (HERV) Families by the HTLV-1 Tax Protein and T-Cell Activators. *Viruses*. **2011**. 3:2146–59.
- Tourrière H**, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol*. **2003**. 160 (6): 823–31.
- Towler EM**, Gulnik SV, Bhat TN, Xie D, Gustschina E, Sumpter TR. Functional characterization of the protease of human endogenous retrovi-

- rus, K10: can it complement HIV-1 protease?. *Biochemistry*. **1998**. 37(49):17137–44.
- Turcanova VL**, Bundgaard B, Höllsberg P. Human herpesvirus-6B induces expression of the human endogenous retrovirus K18-encoded superantigen. *Journal of Clinical Virology*. **2009**. 46(1):15–19.
- Turner G**, Barbulescu M, Su M, Jensen-Seaman MI, Kidd KK, Lenz J. Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol*. **2001**. 11(19):1531–5.
- Tyagi R**, Li W, Parades D, Bianchet MA, Nath A. Inhibition of human endogenous retrovirus-K by antiretroviral drugs. *Retrovirology*. **2017**. 14(1):21
- Urisman A**, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, Malathi K, Magi-Galluzzi C, Tubbes RR, Ganem D, Silverman RH, DeRisi JL. Identification of a novel gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q *RNASEL* Variant. *PLoS Pathog*. **2006**. 2(3):e25.
- Valiente-Echeverría F**, Melnychuk L, Mouland AJ. Viral modulation of stress granules. *Virus Res*. **2012**. 169(2):430–7.
- Valiente-Echeverría F**, Melnychuk L, Vyboh K, Ajamian L, Gallouzi IE, Bernard N, Mouland AJ. eEF2 and Ras-GAP SH3 domain-binding protein (G3BP1) modulate stress granule assembly during HIV-1 infection. *Nat Commun*. **2014**. 5:4819.
- Veeranki S**, Choubey D. Interferon-inducible p200-family protein IFI16, an innate immune sensor for cytosolic and nuclear double-stranded DNA: regulation of subcellular localization. *Molecular immunology*. **2012**. 49:567–71.
- Vermeire J**, Naessens E, Vanderstraeten H, Landi A, Iannucci V, van Nuffel A, Taghon T, Pizzato M, Verhasselt B. Quantification of reverse transcriptase activity by real-time PCR as a fast and accurate method for titration of HIV, lenti- and retroviral vectors. *PloS one*. **2012**. 7:e50859.

- Vertessy BG, Toth J.** Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res.* **2009.** 42(1):97–106.
- Wang Y,** Kinlock BL, Shao Q, Turner TM, Liu B. HIV-1 Vif inhibits G to A hypermutations catalyzed by virus-encapsidated APOBEC3G to maintain HIV-1 infectivity. *Retrovirology.* **2014.** 11:89.
- Weiss RA.** The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology.* **2006.** 3:67.
- Williams BR.** PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene.* **1999.** 18(45):6112–20.
- Wodrich H, Krausslich HG.** Nucleocytoplasmic RNA transport in retroviral replication. *Results Probl Cell Differ.* **2001.** 34:197–217.
- Xu H,** Chertova E, Chen J, Ott DE, Rosser JD, Hu WS, Pathak VK. Stoichiometry of the antiviral protein APOBEC3G in HIV-1 virions. *Elsevir.* **2007.** 360(2):247-56
- Youle M.** Overview of boosted protease inhibitors in treatment-experienced HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother.* **2007.** 60(6):1195–205.
- Zennou V,** Perez-Caballero D, Göttlinger H, Bieniasz PD. APOBEC3G Incorporation into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles. *J Virol.* **2004.** 78(21):12058–61.
- Zheng YH,** Jeang KT, Tokunaga K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology.* **2012.** 9:112.
- Zumblick A.** Restriktion von HERV-K(HML-2) durch IFI-16. Masterarbeit. **2019.**

Internetquellen

[1] https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt_viruses/161/retroviridae (08.01.2020: 10:52).

[2] <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PYHIN1>
(19.04.2021: 09:26).

[3] <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MNDA&keywords=MNDA> (19.04.2021: 09:29).

[4] <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AIM2&keywords=AIM2> (19.04.2021: 09:30).

[5] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02437110> (04.05.2021: 12:23).