

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

Funktionelle und molekulare Charakterisierung des Humanen  
Endogenen Retrovirus K113

zur Erlangung  
des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Nadine Beimforde  
aus Lohne

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Kurth
2. Prof. Dr. R. Mutzel
3. Prof. Dr. R. Wagner

**Datum der Promotion:** 03. September 2010

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
Abstrakt	4
Einleitung	5
Methodik	6
Ergebnisse	9
Diskussion	12
Literatur	14
<b>Anteilerklärung</b>	<b>19</b>
<b>Ausgewählte Publikationen</b>	<b>20</b>
Publikation 1: Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. Virology. 2008	
Publikation 2: Reconstitution of the Ancestral Glycoprotein of a Human Endogenous Retrovirus-K and Modulation of its Functional Activity by Truncation of the Cytoplasmic Domain. Journal of Virology. 2009	
Publikation 3: Lack of evidence for xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) in German prostate cancer patients. Retrovirology. 2009	
<b>Lebenslauf</b>	<b>52</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>53</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>54</b>
<b>Danksagung</b>	<b>55</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

*Titel:* Funktionelle und molekulare Charakterisierung des Humanen Endogenen Retrovirus K113      *Autor:* Nadine Beimforde

### **Abstract**

Das Humane Endogene Retrovirus K113 ist das vollständigste HERV, welches derzeit bekannt ist. Es besitzt offene Leserahmen für alle viralen Proteine und liegt in ca. 15 % der menschlichen Bevölkerung integriert auf Chromosom 19 vor. Um dieses Provirus molekular und funktionell zu charakterisieren, wurde das komplette Genom in einen eukaryontischen Plasmidvektor kloniert. Durch die substantiell vorhandene LTR-Promotoraktivität des Provirus konnte die Transkription genauer untersucht werden. Zusätzlich war es möglich in mit dem Molekularklon transfizierten Zellen einzelne virale Proteine nachzuweisen. HERV-K113 ist nicht replikationskompetent, unter anderem besitzt das Provirus inaktivierende Mutationen in dem Reverse Transkriptase (RT) Gen. Die RT kann zwar durch Reversion dieser Mutationen wieder aktiviert werden, jedoch ist dies nicht ausreichend, um die Replikationskompetenz des Virus wieder herzustellen.

Ebenfalls besitzt das Provirus ein nicht-funktionelles Oberflächenprotein. Durch Rückmutationen von postinsertionellen Aminosäure-Änderungen, identifiziert durch Sequenzvergleiche mit anderen Proviren der HERV-K(HML-2) Familie, konnte hier jedoch das ursprüngliche HERV-K113 Oberflächenprotein rekonstituiert werden. Unterstützend durch eine Kodonoptimierung konnte gezeigt werden, dass das rekonstruierte Env seine Fähigkeit wiedererlangt hat in Partikel eingebaut zu werden und den Eintritt des Virus in die Zelle initialisiert. Zusätzlich wurden die Verbesserung des Einbaus bei der Pseudotypisierung von lentiviralen Vektoren und die Erhöhung der Fusogenität durch carboxyterminale Verkürzungen des Env festgestellt.

Für Replikationsuntersuchungen eines weiteren endogenen Retrovirus, dem XMRV (Xenotropic Murine Leukemia Virus-related Virus), welches als exogenes Virus offenbar den Menschen infizieren kann, wurde zunächst eine Prävalenz-Studie in deutschen Prostatakrebspatienten durchgeführt. Jedoch konnten weder auf DNA- und RNA-Ebene XMRV-spezifische Sequenzen noch in getesteten Serum-Proben spezifische Antikörper detektiert werden.

## Einleitung

Ein essentieller Teil des Replikationszykluses von Retroviren ist die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom. Wenn Keimzellen von Retroviren infiziert werden kann es zu einer Endogenisierung des Virus kommen. Diese Endogenen Retroviren (ERVs) werden dann wie die chromosomale Wirts-DNA nach den Mendelschen Regeln vererbt (1). Im Laufe der Zeit erhielten diese integrierten Proviren immer mehr meist inaktivierende Mutationen und Deletionen, die sie in ihrer Transkriptionsfähigkeit beeinflussten. Letztendlich führten sie dazu, dass keine replikationsfähigen endogenen Retroviren im menschlichen Genom bekannt sind (2, 3). Im Gegensatz zu den Menschen gibt es einige Tierarten, die sowohl replikationskompetente exogene als auch endogene Formen desselben Retrovirus aufweisen (4). Erst kürzlich wurde ein murines endogenes Retrovirus entdeckt, welches in der Lage ist, menschliche Zellen zu infizieren und in Zusammenhang mit Prostatakerbserkrankungen gebracht wurde (5, 6). Insgesamt besteht etwa 8 % des menschlichen Genoms aus Sequenzen retroviralen Ursprungs (7, 8). Im Laufe der Generationen proliferierten viele dieser Sequenzen durch Retrotransposition, Reinfektion und Rekombinationsereignisse, was zu deutlich sichtbaren Sequenz-Homologien, den HERV Familien führte (9). Die jüngste Familie ist die der HERV-K(HML-2). Zugehörig zu ihr ist das HERV-K113, welches offene Leserahmen für alle viralen Proteine und nahezu identische LTR-Sequenzen besitzt (10). Das Provirus ist nicht im menschlichen Genom fixiert, das heißt nicht in jedem Menschen vorhanden, wobei die Prävalenz von der Ethnizität abhängt und in der afrikanischen Bevölkerung mit bis zu 30 % am höchsten liegt (10, 11, 12).

Ziel der Doktorarbeit war die Charakterisierung molekularer und funktioneller Eigenschaften des Humanen Endogenen Retrovirus K113. Um dies zu verwirklichen, sollte ein Molekularklon konstruiert werden, der es ermöglicht, das Replikationspotential des Provirus in humanen und nicht-humanen Zellen zu untersuchen. Zusätzlich sollten einzelne Proteine des Virus kloniert und ihre Funktionen untersucht sowie wenn nötig wiederhergestellt werden. Im Zuge eines weiteren Teilprojektes dieser Arbeit sollte zunächst die Prävalenz von XMRV, ein replikationskompetentes murines endogenes Retrovirus, welches in Verdacht steht Prostatakrebs im Menschen auszulösen, untersucht werden.

## **Methodik**

### *Zelllinien und Medium*

Alle hier verwendeten Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) komplettiert mit 10% fetal bovine serum (FBS), Penicillin (50 U/mL), Streptomycin (50 µg/mL) und L-Glutamin (2mM) kultiviert. Die Transfektionen erfolgten, falls nicht anders angegeben, mittels PolyFect Reagent (Qiagen).

### *Klonierungen, Kodonoptimierung, Mutagenesen*

Um einen Molekularklon zu generieren, wurden 4 überlappende Fragmente amplifiziert, welche die komplette HERV-K113 Provirus Sequenz, wie in (10) beschrieben, plus 186 Nukleotide zusätzliche genomische Sequenz vor und 102 Nukleotide genomische Sequenz hinter der Integrationsstelle des Provirus auf Chromosom 19p13.11 erfassten (siehe Fig.1, Publikation 1). Die Fragmente wurden nacheinander in den Vektor pBluescript (+) SK kloniert und danach komplett sequenziert, wobei festgestellt wurde, dass keine Unterschiede zu der in der Genbank (Accession No. AY037928) publizierten Sequenz vorlagen.

Alle weiteren hier durchgeführten Klonierungen erfolgten, falls nicht anders angegeben, durch spezifische Amplifikation mittels Pfu-Polymerase (Fermentas) und anschließender Ligation in den mit V5-Epitop versehenen Vektor pcDNA3 (Invitrogen).

Die Kodonoptimierung wurde durchgeführt von der Firma Geneart, Regensburg.

Alle hier beschriebenen Mutagenesen wurden mittels Multi Site-Directed Mutagenesis Kit bzw. QuickChange Single Site-Directed Mutagenesis Kit nach Herstellerangaben von Stratagene durchgeführt.

### *Detektion von HERV-K113 Transkripten*

Zur Detektion von HERV-K113 spezifischen Transkripten in mit dem Molekularklon transfizierten Zellen wurde total-RNA isoliert und mittels spezifischer Primer nach Rec- bzw. Env-Transkripten gesucht. Dafür wurde das One Step RT-PCR-Kit von Qiagen verwendet.

### *Untersuchung der Promotoraktivität*

Für die Untersuchung der Promotoraktivität der LTR in humanen Zellen wurden LTR-Sequenzen von HERV-K113, HERV-K10 und KoRV vor ein Luziferase Gen in einen Reportervektor (pGL3 Basic, Promega) kloniert. HEK 293T und HeLa Zellen wurden daraufhin mit den Konstrukten transient transfiziert. Zwei Tage später folgte die Zellyse durch einen speziellen Puffer (CCLR Lysis Buffer, Promega) und die anschließende Luziferase-Aktivitätsmessung nach den angegebenen Parametern des Herstellers.

### *Northern Blot Analysen*

Für Northern Blot Experimente wurde total-RNA in einem Formaldehyd-Gel aufgetrennt, auf eine positiv geladene Nylonmembran geblottet und anschließend durch UV-Bestrahlung fixiert. Zur Sondenherstellung wurde das Strip-EZ DNA Kit von Ambion verwendet, wobei 25 ng linearisierte DNA (nt 595 bis nt 1072) verwendet und nach Protokoll mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dATP radioaktiv markiert wurden. Nach der Hybridisierung folgte die Detektion mittels Phosphoimager oder kommerzieller Röntgenfilme. Zum Vergleich identischer Auftragsmengen wurde die Membran anschließend nach Herstellerangaben mit einer  $\beta$ -Aktin-Sonde rehybridisiert und erneut detektiert.

### *Western Blot Analysen*

Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert, von Zelltrümmern befreit und durch ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Blotten der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion mittels spezifischer Antikörper. Der Nachweis von im Überstand befindlichen Viruspartikel erfolgte nach Aufkonzentrierung durch zweistündige Ultrazentrifugation bei 4°C und 175.000xg durch ein 20%iges Sukrose-Kissen.

### *Immunfluoreszenz-Mikroskopie*

Zu untersuchende Zellen wurden auf Gelatine-beschichtete Deckgläschen in 12-well Platten kultiviert und transfiziert, oder in 6-well Platten kultiviert, transfiziert und dann in Chamber-Slides überführt. 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2%igem Formaldehyd fixiert. Nach mehrmaligem Waschen folgte die Permeabilisierung der Zellen durch Triton X-100 (0,5% in PBS). Nach erneutem

Waschen und der Blockierung der Proben erfolgte die Inkubation mit murinem bzw. humanem Serum. Anschließend wurden die Proben extensiv gewaschen, mit dem zweiten Fluorophor-konjugierten Antikörper inkubiert und erneut gewaschen, sowie mit Mowiol eingebettet. Für die mikroskopische Untersuchung der Proben wurde ein Konfokales Laser-Scanning Mikroskop von Zeiss (LSM510) verwendet.

#### *Replikationsuntersuchungen / Reverse Transkriptase (RT) Aktivitätsbestimmung*

Zellkulturüberstände von transfizierten Zellen wurden bis zu 48 Tage nach der Transfektion gesammelt und sterilfiltriert. Danach folgte die Bestimmung der RT-Aktivität mittels CAVIDI HS Mg<sup>2+</sup> RT Kit (Cavidi Tech AB) nach Angaben des Herstellers.

Für die Aktivitätsbestimmung der verschiedenen RT-Mutanten wurde zur Proteinexpression das T<sub>N</sub>T T7 Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega verwendet. Die Aktivitätsbestimmung der Reversen Transkriptase erfolgte anschließend wie beschrieben mittels Cavidi Kit.

#### *Produktion pseudotypisierter SHIV Reporter-Viren*

Die Vektoren pSIVec1ΔenvLuc und pSIVec1ΔenvGFP, pCMV-Rev und pSVIII-ΔKS wurden zuvor beschrieben in (13). Um infektiöse SHIV Partikel herzustellen wurden 8x10<sup>6</sup> HEK 293T Zellen mit 15μg pSIVec1ΔenvLuc, 5μg pCMV-Rev und 0,5μg eines Env-Expressionsvektors mittels Calciumchlorid-Methode transfiziert. Nach zwei Tagen wurde der Überstand geerntet und bei 6000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert um restliche Zellen zu entfernen.

#### *ELISA*

Probind-96-well Platten (Becton Dickinson Labware Europe) wurden mit rekombinant hergestellten Proteinen (XMRV-Gag bzw. XMRV-Env) beschichtet. Nach Blockierung und dreimaligem Waschen der Platten erfolgte die einstündige Inkubation des zu testenden Patientensersums bei 37°C. Nach erneutem Waschen und einstündiger Inkubation des zweiten HRP-konjugierten Antikörpers, erfolgte nach nochmaligem Waschen die Zugabe des Substrats (OPD = chromogen ortho-phenylendiamin in 0,05 M Phosphatcitratpuffer). Fünf bis zehn Minuten später wurde die Farbentwicklung mittels Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 492nm/620nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

## Ergebnisse

### *Promotoraktivitätsbestimmungen*

Die HERV-K113 LTR zeigte in HEK 293T Zellen eine circa zweifach höhere Promotoraktivität als die als aktiv beschriebene HERV-K10 LTR (Fig.2b, Publikation 1). Eine Verlängerung des LTR-Konstruktes über die Haupt-Spleißstelle des Provirus resultierte in keiner signifikanten Veränderung der Reporterogenaktivität. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass der HERV-K113 Promotor die Eigenschaft behalten hat eine signifikante Transkription in humanen Zellen zu initiieren.

### *Untersuchungen des Transkriptionsverhaltens*

Die substantielle Promotoraktivität in den Reportergenkonstrukten lässt eine aktive Transkription des Provirus vermuten. Unter Anwendung einer spezifischen RT-PCR konnten gespleißte *env*- und *rec*-Transkripte in Zellen, transfiziert mit dem Moleklarklon, nachgewiesen werden (Fig.3a, Publikation 1). Durch die Sequenzierung der amplifizierten HERV-K113 cDNA konnten die Positionen der Spleißstellen identifiziert werden. Für die weitere Charakterisierung der Transkription wurden Northern Blot Analysen mit einer HERV-K113 spezifischen, vor der Haupt-Spleißstelle liegenden Sonde durchgeführt. Es konnten Banden für Vollängen-, *env*- und *rec*-Transkripte identifiziert werden, die mit den in (14) publizierten Größen übereinstimmten (Fig.3b, Publikation 1). Ein viertes schwächeres Signal zeigte höchstwahrscheinlich das wenig dokumentierte *hel*-Transkript. HERV-K113 produziert somit alle HERV-K(HML-2) Klasse 2 Transkripte, welche zuvor in (15) beschrieben wurden.

### *Expressionsstudien der einzelnen Proteine*

Durch die Klonierung der einzelnen viralen Gene in einen V5-Epitop enthaltenden Vektor war es möglich fast alle Proteine in Lysaten von transfizierten Zellen nachzuweisen (Fig.4, Publikation 1). Ebenfalls konnte die Detektion von Env und Rec mittels spezifischer Antikörper in mit dem Moleklarklon transfizierten Zellen mittels Western Blot Analysen bzw. Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt werden. Hierbei konnte Rec wie erwartet sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden.

### *Replikationsuntersuchungen und Aktivierung der Reversen Transkriptase (RT)*

Um das Replikationspotenzial von HERV-K113 zu untersuchen, wurden HOS Zellen mit dem HERV-K113 Molekularklon sowie einem zur Kontrolle dienenden replikationsfähigen HIV-1 Vollängenklon und dem Leervektor transfiziert. Im Gegensatz zu den mit HIV-1 transfizierten Zellen wiesen Zellen, transfiziert mit HERV-K113, keine RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen auf (Fig.5, Publikation 1). Gleiche Ergebnisse zeigten Transfektionen von verschiedenen anderen Zellen. Somit ist HERV-K113 nicht in der Lage infektiöse und replikationsfähige Partikel zu generieren. Um die Replikationsinkompetenz von HERV-K113 weiter zu charakterisieren, wurde die Funktionalität der RT genauer untersucht. Da keine RT-Aktivität messbar war, wurde die Aminosäuresequenz der HERV-K113 RT mit der in (16) als aktiv beschriebenen HERV-K10.1 RT verglichen und in sechs abweichenden Aminosäuren an die aktive Sequenz angepasst. Dieses Konstrukt wies im Gegensatz zu der unveränderten Sequenz eine deutliche RT-Aktivität in transfizierten Zellen auf (Fig.6, Publikation 1). Mutationen der sechs Aminosäuren im HERV-K113 Molekularklon erbrachten jedoch keine Änderung in der Replikationsfähigkeit.

### *Expressionssteigerung und Rekonstruktion des ursprünglichen HERV-K113 Env*

Das interne Spleißen, der geringe GC-Gehalt, sowie die selten verwendeten Kodons sind die Ursachen der schlechten HERV-K(HML-2) Env Proteinexpression in CMV-Promotor angetriebenen Vektoren. Um dieser Limitierung zu entgehen wurde eine Kodonoptimierung durchgeführt. Damit konnte die Expression um circa das 50-fache gesteigert und eine bessere Charakterisierung des Proteins gewährleistet werden (Fig.2, Publikation 2). Um postinsertionelle Mutationen in der Aminosäuresequenz des HERV-K113 Oberflächenproteins zu identifizieren und daraufhin in der kodonoptimierten Version zu ersetzen, wurde diese mit zehn anderen gut erhaltenen Env-Sequenzen von humanspezifischen Endogenen Elementen verglichen (Fig.3, Publikation 2). Zur Differenzierung zwischen realen Polymorphismen im ursprünglichen Virus und postinsertionellen Änderungen wurde angenommen, dass ein gemeinsamer Polymorphismus dann vorlag, wenn zwei oder mehrere Elemente dieselbe Aminosäure aufwiesen. Wenn kein oder nur ein Element denselben Aminosäureaustausch aufwies wie das HERV-K113 Env, so handelte es sich um eine postinsertionelle Mutation. Insgesamt wurden acht solcher Positionen

identifiziert, geändert und somit das ursprüngliche Oberflächenprotein von HERV-K113 hergestellt, welches zum Zeitpunkt der Integration im humanen Genom vorlag.

#### *Untersuchung der Inkorporationsfähigkeit von Env durch C-terminale Verkürzung*

Durch die Eliminierung der postinsertionellen Mutationen konnte nun das HERV-K113 Env mit dem ursprünglich vorherrschenden Oberflächenprotein im Hinblick auf den Partikeleinbau untersucht werden, wobei sich zeigte, dass nur das rekonstruierte ursprüngliche Protein in SHIV-Partikel inkorporiert wird. Da bereits für einige Retroviren beschrieben wurde, dass durch eine C-terminale Verkürzung der cytoplasmatischen Region der Partikeleinbau sowie die Fusogenität des Envs begünstigt wird (17-19), sollte dies ebenfalls untersucht werden. Dazu wurden drei verschiedene Mutanten mit C-terminalen Verkürzungen hergestellt. Hierbei zeigte sich, dass neben einer vergleichbaren Expression der einzelnen zu testenden Oberflächenproteine in den Zelllysaten der Einbau der verkürzten Proteine in die viralen Partikel drei- bis fünffach effizienter war als der Einbau der ursprünglichen Sequenz (Fig.5, Publikation 2). Die Mutante mit der größten C-terminalen Deletion zeigte den besten Einbau in die SHIV-Partikel. Insgesamt konnten diese Ergebnisse demonstrieren, dass eine progressive C-terminale Verkürzung des HERV-K Oberflächenproteins die Partikelassoziation begünstigt.

#### *Detektion von XMRV-Antikörper in Serumproben von Prostatakrebspatienten*

Um die Prävalenz des in humanen Zellen replikationsfähigen endogenen murinen Retrovirus XMRV in deutschen Prostatakrebspatienten zu untersuchen wurden insgesamt 146 Seren sowie fünf Seren von gesunden Spendern in einem speziell für die Detektion von XMRV Gag- und Env-spezifischen Antikörpern entwickelten ELISA getestet. Keines der Seren zeigte eine positive Antikörperreaktion auf das im ELISA verwendete rekombinant hergestellte XMRV Env, wobei ein Patientenserum sehr stark auf das eingesetzte rekombinante XMRV Gag reagierte. Dies konnte jedoch durch den Einsatz des Serums in der Immunfluoreszenz von HEK 293T Zellen, die entweder mit dem Vollängenkonstrukt von XMRV, oder mit den einzelnen rekombinanten Proteinen Gag und Env transfiziert wurden, als falsch positiv erkannt werden. Alle anderen Seren wurden ebenfalls negativ für eine Antikörperreaktion gegen XMRV Gag getestet.

## Diskussion

Von allen humanen Endogenen Retrovirus Familien besitzt HERV-K(HML-2) die jüngsten und am besten erhaltenen Mitglieder (20, 21). Bisher konnte jedoch noch keine provirale Sequenz im humanen Genom gefunden werden, die in der Lage ist replikationskompetente Partikel zu bilden. Die Herstellung zweier *in silico* konstruierter Konsensussequenzen basierend auf HERV-K(HML-2) Elementen zeigt aber, dass diese Familie prinzipiell die Fähigkeit besitzt retrovirale Partikel zu bilden, die in der Lage sind heutige humane und nicht-humane Zellen zu infizieren (22, 23). Durch den Nachweis und die Amplifikation gespleißter *env*- und *rec*-mRNA in mit HERV-K113 transfizierten Zellen konnten die in (24) vermuteten Spleißstellen bestätigt werden. Anhand der Untersuchung des Transkriptionsverhaltens, angetrieben durch den in der 5'LTR vorhandenen aktiven viralen Promotor, zeigte sich, dass das HERV-K113 Vollängentranskript aufgrund seiner Zugehörigkeit zum HERV-K(HML-2) Subtyp 2 dementsprechend größer ist als Vollängentranskripte des Subtyps 1, welche eine charakteristische Deletion von 292 Basenpaaren besitzen (25, 26). Des Weiteren konnten nahezu alle viralen Proteine nachgewiesen werden. Die Reverse Transkriptase von HERV-K113 ist enzymatisch inaktiv und auf Proteinebene in transfizierten Zellen nicht nachweisbar. Dementsprechend konnte ebenfalls keine Replikationsaktivität detektiert werden. Jedoch konnte die RT-Aktivität durch das Angleichen der HERV-K113 Sequenz von sechs Aminosäuren an eine als aktiv beschriebene RT wiederhergestellt werden. Durch Mutationen der ersten drei bzw. der letzten drei Aminosäuren wurde deutlich, dass nicht nur eine einzige Aminosäureänderung für die Aktivierung verantwortlich ist, sondern mindestens zwei Änderungen dabei eine Rolle spielen. Die Korrektur dieser sechs Mutationen im Moleklarklon reichte nicht für eine Wiederherstellung der Replikationsfähigkeit. Ebenfalls konnten in ultrazentrifugiertem Überstand von mit diesem HERV-K113 Klon transfizierten Zellen weder RT-Aktivität noch Env-Protein nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass der fehlende Env-Einbau ebenfalls zu den Hauptfaktoren für die ineffektive Partikelbildung und den Verlust der Replikationsfähigkeit zählt.

Die schlechte Proteinexpression in Säugerzellen und der Einfluss der postinsertionellen Mutationen waren die zwei Hauptgründe, die eine wesentliche Charakterisierung des HERV-K(HML-2) Oberflächenproteins bisher erschwerten (27). Die Verwendung einer synthetischen DNA Sequenz, optimiert für Säugerzellen,

erhöhte die Expression des HERV-K113 Env um circa das 50-fache. Kodonoptimierung wurde schon vorher erfolgreich für Expressionssteigerungen von anderen retroviralen Proteinen verwendet (28, 29). Nach unseren Erkenntnissen und vorher publizierten Daten lässt sich trotz Zelloberflächenexpression das HERV-K113 Env nicht in pseudotypisierte lentivirale Partikel einbauen (30), was wahrscheinlich in einer inkorrekten Faltung durch postinsertionale Mutationen begründet liegt. Durch die Anwendung eines speziellen Algorithmus konnten postinsertionelle Mutationen erkannt und ausgetauscht werden. Durch die Herstellung der ursprünglichen Proteinsequenz war die Inkorporation in pseudotypisierte Partikel möglich, was die funktionelle Wiederherstellung verdeutlicht. Eine Verkürzung der cytoplasmatischen Region, wie es bei anderen Retroviren ebenfalls schon gezeigt wurde (17, 19, 31), hatte einen besseren Einbau in die lentiviralen Partikel zur Folge und erhöhte die Infektiosität um mehr als ein 100-faches. Der hier zugrundeliegende Mechanismus ist bisher weitgehend ungeklärt. Es könnte jedoch auch an einer besseren Transportkinetik oder einer schwächeren Endozytoserate der Mutante liegen.

Obwohl HERV-K113 durch mehrere Defekte replikationsinkompetent ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine natürliche Variante existiert, die in allen Proteinen funktionell ist. Zudem ist es möglich, dass infektiöse Retroviren *in vivo* durch Rekombinationen zwischen partiell inkompetenten Proviren entstehen können (22). Die Infektionen humaner Zellen durch HERV-K(HML-2) Konsensussequenzen (22, 23) und der Zusammenhang dieser Elemente in der Entwicklung von einigen Krebs- und Autoimmunerkrankungen (32-34) zeigen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen.

Um Untersuchungen im Hinblick auf die Replikation eines anderen endogenen Retrovirus durchzuführen welches in der Lage ist in humanen Zellen zu replizieren, wurde zunächst die Prävalenz von XMRV in Prostatakrebpatienten untersucht. In dieser Studie konnte jedoch keines der getesteten Seren positiv für eine XMRV-Infektion befunden werden. Ebenfalls konnten weder auf DNA- noch auf RNA-Ebene XMRV-spezifische Sequenzen gefunden werden. Eventuell könnte es hierfür geographische Hintergründe geben, da zwei voneinander unabhängige XMRV-Studien in amerikanischen Prostatakrebpatienten eine Prävalenz von bis zu 23% zeigten (5, 6). Weiterhin ungeklärt und von Interesse ist die Frage, ob ein mit den murinen endogenen Retroviren verwandtes Virus wie XMRV im Menschen Tumore induziert kann.

## Literatur

1. Weiss, R. A., 2006. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* 3(3), 67.
2. Bourc'his, D., Bestor, T.H., 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431 (7004), 96-99.
3. Walsh, C.P., Chaillet, J.R., Bestor, T.H., 1998. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet.* 20 (2), 116-117.
4. Boeke, M., Stoye, J.P., 1997. Retrotransposons, endogenous retroviruses and the evolution of retroelements., p. 343-436. In S. H. H. Coffin, J.M. and Varmus, H.E. (Ed.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
5. Urisman, A., Molinaro, R.J., Fischer, N., Plummer, S.J., Casey, G., Klein, E.A., Malathi, K., Magi-Galluzzi, C., Tubbs, R.R., Ganem, D., 2006. Identification of a novel gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog.* 2,e25.
6. Schlaberg, R., Choe, D.J., Brown, K.R., Thaker H.M., Singh, I.R., 2009. XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (38), 16351-16356.
7. Bannert, N., Kurth R., 2004. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc. Natl. Acad. U. S. A.* 101(Suppl 2), 14572-14579.
8. de Parseval, N., Heidmann, T., 2005. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet. Genome Res.* 110 (1-4), 318-332.
9. Gifford, R., Tristem, M., 2003. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* 26 (3), 291-315.

10. Turner, G., Barbulescu, M., Su, M., Jensen-Seaman, M.I., Kidd, K.K., Lenz, J., 2001. Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr. Biol.* 11 (19), 1531-1535.
11. Burmeister, T., Ebert, A.D., Pritze, W., Loddenkemper, C., Schwartz, S., Thiel, E., 2004. Insertional polymorphisms of endogenous HERV-K113 and HERV-K115 retroviruses in breast cancer patients and age-matched controls. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 20 (11), 1223-1229.
12. Moyes, D.L., Martin, A., Sawcer, S., Temperton, N., Worthington, J., Griffiths, D.J., Venables, P.J., 2005. The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. *Genomics* 86 (3), 337-341.
13. Bannert, N., Schenten, D., Craig, S., Sodroski, J., 2000. The level of CD4 expression limits infection of primary rhesus monkey macrophages by a T-tropic simian immunodeficiency virus and macrophagetropic human immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 74, 10984-10993.
14. Lower, R., Boller, K., Hasenmaier, B., Korbmacher, C., Muller-Lantzsch, N., Lower, J., Kurth, R., 1993a. Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (10), 4480-4484.
15. Lower, R., Lower, J., Frank, H., Harzmann, R., Kurth, R., 1984. Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J. Gen. Virol.*, 65 (Pt 5), 887-898.
16. Berkhout, B., Jebbink, M., Zsiros, J., 1999. Identification of an active reverse transcriptase enzyme encoded by a human endogenous HERV-K retrovirus. *J. Virol.* 73 (3), 2365-2375.
17. Celma, C.C., Paladino, M.G., Gonzalez, S.A., Affranchino, J.L., 2007. Importance of the short cytoplasmic domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein for fusion activity and envelope glycoprotein incorporation into virions. *Virology* 336, 405-414.

18. Cheynet, V., Ruggieri, A., Oriol, G., Blond, J.L., Boson, B., Vachot, L., Verrier, B., Cosset, F.L., Mallet, F., 2005. Synthesis, assembly, and processing of the Env ERVWE1/syncytin human endogenous retroviral envelope. *J. Virol.* 79, 5585-5593.
19. Cote, M., Zheng, Y.M., Albritton, L.M., Liu, S.L., 2008. Fusogenicity of jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is dependent on low pH and is enhanced by cytoplasmic tail truncations. *J. Virol.* 82, 2543-2554.
20. Mager, D.L., Patrik, M., 2003. Retroviral repeat sequences. In Cooper, D.N (Ed.), *Nature Encyclopedia of the Human Genome*. Nature Pub. Group, London; New York. 5 vols.
21. Mayer, J., Meese, E., 2005. Human endogenous retroviruses in the primate lineage and their influence on host genomes. *Cytogenet. Genome Res.* 110 (1-4), 448-456.
22. Dewannieux, M., Harper, F., Richaud, A., Letzelter, C., Ribet, D., Pierron, G., Heidmann, T., 2006. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res.* 16 (12), 1548-1556.
23. Lee, Y.N., Bieniasz, P.D., 2007. Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog.* 3 (1), e10.
24. Mayer, J., Ehlhardt, S., Seifert, M., Sauter, M., Muller-Lantzsch, N., Mehraein, Y., Zang, K.D., Meese, E., 2004. Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity. *Virology* 322 (1), 190-198.
25. Armbruster, V., Sauter, M., Krautkraemer, E., Meese, E., Kleiman, A., Best, B., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N., 2002. A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin. Cancer Res.* 8 (6), 1800-1807.

26. Lower, R., Lower, J., Tondera-Koch, C., Kurth, R., 1993b. A general method for the identification of transcribed retrovirus sequences (R-U5 PCR) reveals the expression of the human endogenous retrovirus loci HERV-H and HERV-K in teratocarcinoma cells. *Virology* 192 (2), 501-511.
27. Tonjes, R.R., Limbach, C., Lower, R., Kurth, R., 1997. Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in insect and mammalian cells. *J. Virol.* 71 (4). 2747-2756.
28. Deml, L., Bojak, A., Steck, S., Graf, M., Wild, R., Schirmbeck, R., Wolf, H., Wagner, R., 2001. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J. Virol.* 75, 10991-11001.
29. Megati, S., Garcia-Hand, D., Cappello, S., Roopchand, V., Masood, A., Xu, R., Luckay, A., Chong, S.Y., Rosati, M., Sackitey, S., Weiner, D.B., Felber, B.K., Pavlakis, G.N., Israel, Z.R., Smith, L.R., Eldridge, J.H., Sidhu, M.K., Egan, M.A., 2008. Modifying the HIV-1 env gp160 gene to improve pDNA vaccine-elicited cell-mediated immune responses. *Vaccine* 26, 5083-5094.
30. Dewannieux, M., Blaise, S., Heidmann, T., 2005. Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. *J. Virol.* 79 (24), 15573-15577.
31. Kim, F.J., Manel, N., Boublik, Y., Battini, J.L., Sitbon, M., 2003. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope-mediated syncytium formation can be activated in resistant mammalian cell lines by a carboxy-terminal truncation of the envelope cytoplasmic domain. *J. Virol.* 77, 963-969.
32. Contreras-Galindo, R., Kaplan, M.H., Leissner, P., Verjat, T., Ferlenghi, I., Bagnoli, F., Giusti, F., Dosik, M.H., Hayes, D.F., Gitlin, S.D., Markovitz, D.M., 2008. Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. *J. Virol.* 82 (19), 9329-9336.

33. Reynier, F., Verjat, T., Turrel, F., Imbert, P.E., Marotte, H., Mougin, B., Miossec, P., 2009. Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 70 (3), 295-299.
34. Serafino, A., Balestrieri, E., Pierimarchi, P., Matteucci, C., Moroni, G., Oricchio, E., Rasi, G., Mastino, A., Spadafora, C., Garaci, E., Vallebona, P.S., 2009. The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Exp. Cell Res.* 315 (5), 849-862.

## **Anteilserklärung**

**Publikation 1:** Beimforde N, Hanke K, Ammar I, Kurth R and Bannert N. Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. *Virology*. 2008

90 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Detektion der viralen Transkripte, Promotoraktivitätsstudien, Northern Blot Analysen von verschiedenen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen, Detektion viraler Proteine, Immunfluoreszenz-Färbungen und -Mikroskopie, Aktivitätsbestimmungen der verschiedenen Reversen Transkriptase-Mutanten, Untersuchung der Replikationsfähigkeit des Molekularklons und der RT-aktiven Variante.

**Publikation 2:** Hanke K, Kramer P, Seeher S, Beimforde N, Kurth R and Bannert N. Reconstitution of the Ancestral Glycoprotein of a Human Endogenous Retrovirus-K and Modulation of its Functional Activity by Truncation of the Cytoplasmic Domain. *Journal of Virology*. 2009

25 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Klonierung der kodonoptimierten Sequenz und die Herstellung der ursprünglichen Provirussequenz durch die Durchführung von Mutagenesen, Expressionsanalysen des Envelope-Proteins zur Untersuchung des Einbaus in virale Partikel sowie die Herstellung der C-terminal verkürzten Konstrukte.

**Publikation 3:** Hohn O, Krause H, Barbarotto P, Niederstadt L, Beimforde N, Denner J, Miller K, Kurth R and Bannert N. Lack of evidence for xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) in German prostate cancer patients. *Retrovirology*. 2009

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Untersuchung der Antikörperantworten von Prostatakrebspatienten mittels eines speziell etablierten ELISA, sowie mittels Immunfluoreszenz-Färbungen und -Mikroskopie.

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

## Publikationsliste

### Posterpräsentationen

Retroviruses, Cold Spring Harbor Meeting, New York, USA, 2009:

„Reconstitution and Expression of the ancestral Human Endogenous Retrovirus K113 Sequence and its Use to Estimate the Time Point of Integration”

Europäische Tagung der Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, 2008:

„Reconstitution of a Human Endogenous Retrovirus with the Original Sequence Present at the Time of Integration”

Tagung der Gesellschaft für Virologie, Nürnberg, 2007:

„Molecular and Functional Characterization of HERV-K113 (II)”

Tagung der Gesellschaft für Virologie, München, 2006:

„Molecular and Functional Characterization of HERV-K113 (I)”

Tagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover, 2005:

„Optimization of HIV-1 *env* DNA-based Immunogens”

### Publikationen

Beimforde N, Reudelsterz M, Hanke K, Kramer P, Hohn O., Kurth R and Bannert N. Use of the reconstituted ancestral HERV-K113 sequence to estimate the time point of provirus integration and to reveal its evolutionary history in the human genome. In preparation.

Chudak C, Beimforde N, Hohn O, Kurth R and Bannert N. HERV-K contains a functional PTAP motif as late-domain required for budding and egress. In preparation.

Hanke K, Kramer P, Seeher S, Beimforde N, Kurth R and Bannert N. Reconstitution of the Ancestral Glycoprotein of a Human Endogenous Retrovirus-K and Modulation of its Functional Activity by Truncation of the Cytoplasmic Domain. *Journal of Virology*. 2009 Dec;83(24):12790-800.

Hohn O, Krause H, Barbarotto P, Niederstadt L, Beimforde N, Denner J, Miller K, Kurth R and Bannert N. Lack of evidence for xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) in German prostate cancer patients. *Retrovirology*. 2009 Oct 16;6(1):92.

Beimforde N, Hanke K, Ammar I, Kurth R and Bannert N. Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. *Virology*. 2008 Feb 5;371(1):216-25.

## Erklärung

„Ich, Nadine Beimforde, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Funktionelle und molekulare Charakterisierung des Humanen Endogenen Retrovirus K113‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Münster, den 03.03.2010

---

Nadine Beimforde

## **Danksagung**

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Kurth für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Robert Koch-Institut in Berlin und vor allem für die stets wohlwollende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Ebenso danke ich Herrn PD. Dr. Norbert Bannert, in dessen Arbeitsgruppe ich diese Arbeit anfertigen durfte.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Arbeitskollegen Anja, Claudia, Fox, Jörg, Kirsten, Lars, Maja, Philipp, Sandra und Veronika, die im Laufe der Zeit ausnahmslos zu Freunden geworden sind. Danke für die netten Kaffeerunden im Großraumbüro, die lustigen Partys und die seelische Unterstützung während der gesamten Zeit.

Meinen Eltern, Gisela und Aloys Beimforde, gilt ebenfalls besonderer Dank, da sie mich über die gesamte Zeit meines Studiums und der Doktorarbeit unterstützt haben und immer für mich da waren. Meinem Freund Matthias danke ich gleichermaßen für die grenzenlose Unterstützung und die aufgebrachte Geduld während dieser Zeit.