

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von L-Domänen des humanen endogenen Retrovirus K

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
doctor rerum naturalium

vorgelegt von

Claudia Chudak

aus Wriezen

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

Berlin, September 2012

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin.

Angefertigt unter der Betreuung von PD Dr. Norbert Bannert
Januar 2009 bis Dezember 2011

Erster Gutachter: PD Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut, Berlin
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 16.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Retroviren	7
1.2 Einteilung der Retroviren	8
1.3 Aufbau der retroviralen Partikel	9
1.4 Aufbau des retroviralen Genoms	10
1.5 Replikation	11
1.5.1 Assemblierung.....	13
1.5.2 Budding	15
1.5.2.1 L-Domänen	19
1.5.3 Reifung und Morphologie retroviraler Partikel	23
1.6 Endogene Retroviren.....	24
1.7 Humane endogene Retroviren.....	26
1.7.1 Biologische Bedeutung der humane endogenen Retroviren	27
1.7.2 Die endogenen Retroviren der Familie K	29
1.7.3 Genomaufbau der HERV-K(HML-2)-Elemente.....	30
1.7.4 Die Hauptstrukturproteine der HERV-K(HML-2)-Elemente.....	32
1.7.5 Rekonstruktion eines originalen HERV-K113-Elements als Modellsystem zur Untersuchung von Proteinfunktionen	33
1.8 Zielsetzung	36
2 Material und Methoden	37
2.1 Materialien	37
2.1.1 Geräte	37
2.1.2 Chemikalien	38
2.1.3 Puffer und Medien	40
2.1.4 Kits	41
2.1.5 Konstrukte/Vektoren	41
2.1.6 Antikörper	42

2.1.7 Oligonukleotide (Primer).....	43
2.1.8 Bakterienstämme	43
2.1.9 Software	43
2.2 Methoden.....	44
2.2.1 DNA-Analytik.....	44
2.2.1.1 Herstellung elektrokompetenter One Shot Top 10 E.coli	44
2.2.1.2 Transformation	45
2.2.1.3 Plasmidisolierung	46
2.2.1.4 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der DNA	46
2.2.1.5 Restriktion mit Endonukleasen	46
2.2.1.6 Ligation	47
2.2.1.7 Auftrennung von Nukleinsäuren über Agarose-Gelelektrophorese	47
2.2.1.8 Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten	48
2.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
2.2.1.9.1 Mutagenese Polymerase-Kettenreaktion	48
2.2.1.9.2 Kolonie-PCR.....	50
2.2.1.9.3 Sequenzierungs-PCR nach der Sanger Methode	51
2.2.2 Methoden der Zellkultur.....	52
2.2.2.1 Zelllinien.....	52
2.2.2.2 Kultivierung verschiedener Zelllinien.....	52
2.2.2.3 Lagerung und Auftauen von Zellen	52
2.2.2.4 Zellzahl-Bestimmung.....	53
2.2.2.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	54
2.2.3 Protein-Analytik	55
2.2.3.1 Chemische Lyse von eukaryontischen Zellen	55
2.2.3.2 Ultrazentrifugation zur Sedimentierung viraler Partikel aus Zellkulturüberständen	55
2.2.3.3 Western Blot-Analyse.....	56
2.2.3.4 RT-Aktivitäts-Messung (Cavidi-Assay).....	58
2.2.3.5 Luziferase-Assay.....	59
2.2.4 Analytische Mikroskopie.....	60
2.2.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	60
2.2.4.2 Immunfluoreszenz-Analyse/konfokale Laserscanning-Mikroskopie (cLSM).....	61

3 Ergebnisse.....	63
3.1 Identifizierung und Charakterisierung der L-Domänen von HERV-K	63
3.1.1 Ein PTAP-Motiv im p15-Protein fungiert als L-Domäne im HERV-K Budding.....	65
3.1.2 Die C-terminalen QP1/2-Proteine sind nicht am Budding der HERV-K(HML-2) Partikel beteiligt.....	72
3.1.3 Effekt einer YP _{x_n} L-Sequenz des Kapsidprotein auf die HERV-K Knospung	75
3.1.4 Einfluss der im p15-Protein lokalisierten YP _{x_n} L-Motive auf das Budding von HERV-K.....	78
3.1.5 L-Domänen-Aktivität der Motive in anderen Zelllinien	87
3.2 Interaktion der L-Domänen mit ESCRT-Proteinen	91
3.2.1 Kolokalisationsexperimente mit Tsg101	91
3.2.2 Tsg101 stimuliert die Freisetzung der YP _{x_n} L-Mutanten.....	95
3.2.3 Alix stimuliert die Freisetzung der PTAP-Mutanten	98
4 Diskussion.....	101
4.1 Identifizierung und Charakterisierung der HERV-K L-Domänen	102
4.1.1 Ein PTAP-Motiv fungiert als L-Domäne	102
4.1.2 Zwei weitere L-Domänen des Typs YP _{x_n} L im p15-Protein agieren als L-Domänen	103
4.1.3 Die identifizierten L-Domänen üben unterschiedlichen Einfluss auf das Budding aus.....	105
4.1.4 Die HERV-K L-Domänen begünstigen die Virusfreisetzung zelltypabhängig	107
4.1.5 Mutationen eines putativen L-Domänen-Motivs im Kapsidprotein inhibiert die Virusproduktion	110
4.1.6 QP1 und QP2 sind nicht am Budding- und Assemblierungsprozess beteiligt.....	112
4.2 Das HERV-K Budding ist von dem ESCRT-Protein-Signalweg abhängig.....	113
4.2.1 Das PTAP-Motiv rekrutiert Tsg101 zur Wirtszellmembran	113
4.2.2 Eine Überexpression des verkürzten Tsg-Proteins Tsg-3' beeinflusst die ESCRT- Maschinerie.....	115
4.2.3 Tsg101 fördert das Budding der YP _{x_n} L-Mutanten	116
4.2.4 Alix stimuliert das Budding der HERV-K PTAP-Mutanten	117
4.2.5 Alix fördert auch das Budding der HERV-K YP _{x_n} L-Mutanten	119
4.2.6 Eine Überexpression von Alix beeinflusst die Wildtyp Partikelfreisetzung negativ	120
4.2.7 Klassifizierung der HERV-K113 Alix-Binde-Motive	121
4.2.8 Modell des HERV-K Buddings.....	123

5 Zusammenfassung	127
6 Summary.....	128
7 Literaturverzeichnis	129
8 Anhang.....	149
8.1 Oligonukleotide (Primer)	149
8.1.1 Sequenzierprimer	149
8.1.2 Mutageneseprimer.....	150
8.2 oriHERV-K113 Sequenz	152
8.3 Abkürzungsverzeichnis.....	158
9 Danksagung	164
10 Erklärung	165

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Retroviren umfassen eine große Familie umhüllter Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom in Plusstrangorientierung, die in allen Vertebraten zu finden sind. Vor fast genau 100 Jahren wurden Retroviren zum ersten Mal beschrieben. Damals gelang es den dänischen Pathologen Ellermann und Bang, Mausleukämie durch Ultrafiltrate zu übertragen. Drei Jahre später entdeckte Peyton Rous, dass durch Übertragung ultrafiltrierter Extrakte aus Geflügelsarkomen, die Erkrankung auf zuvor gesunde Hühner weitergegeben werden konnte. Das hierfür verantwortliche Virus wurde anschließend nach seinem Entdecker *Rous-Sarkomvirus* (RSV) benannt und Rous erhielt 1966, 54 Jahre nach der Erstbeschreibung, den Nobelpreis für Medizin. Als weiteres Indiz zur Assoziation von Viren mit Tumorerkrankungen beschrieb John Joseph Bittner 1936 ein Virus, dass bei bestimmten Mäusestämmen Tumore der Brustdrüsen auslöst [Bittner, 1936]. Das als *Maus-Mammatumor-Virus* (MMTV) bekannte Virus kann, im Gegensatz zu den zuvor entdeckten Viren, nicht nur als exogenes Partikel andere Zellen infizieren (horizontale Übertragung), sondern auch endogen als Bestandteil des Genoms von Keimbahnzellen an Folgegeneration weitergegeben werden (vertikale Übertragung).

1970 beschrieben Howard M. Temin und S. Mizutani sowie unabhängig davon David Baltimore ein Enzym, dass RNA in doppelsträngige DNA umwandelt. Mit der Entdeckung der Reversen Transkriptase (RT) konnte das damals bestehende Dogma widerlegt werden, der Informationsfluss verlaufe immer nur in eine Richtung, von der DNA zur RNA und dann zum Protein. Von der Aktivität des Enzyms leitet sich der Name Retroviren ab.

1971 wurde erstmals ein humanes Retrovirus entdeckt, als ein Spumaretrovirus (besser bekannt als Foamyviren) aus menschlichem Gewebe isoliert wurde. Bis heute konnte jedoch noch keine Krankheit mit den Spumaretroviren assoziiert werden.

Durch die Entdeckung des *humanen T-Zell-Leukämie-Virus* (HTLV) als Verursacher der adulten T-Zell-Leukämie konnte nun auch ein Zusammenhang zwischen Viren und menschlichen Tumorerkrankungen verifiziert werden [Poiesz *et al.*, 1980]. Zu den wohl bekanntesten Vertretern der *Retroviridae* zählen die *humanen Immundefizienzviren* (HIV-1/HIV-2). Als Erreger des erworbenen Immunschwäche Syndroms

(AIDS) wurden diese von den Arbeitsgruppen um Luc Montagnier und Robert C. Gallo isoliert [Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984].

1.2 Einteilung der Retroviren

Taxonomisch sind die *Retroviridae* in zwei Unterfamilien gegliedert. Den *Orthoretrovirinae* werden sechs Genera zugeordnet: α -, β -, δ -, ϵ -, γ -Retroviren und Lentiviren. Eine Sonderstellung nehmen die *Spumavirinae* ein. Nur einen Genus umfassend weisen sie eine Vielzahl von Besonderheiten in ihrem Replikationszyklus auf, der sie von den anderen Retroviren abgrenzt.

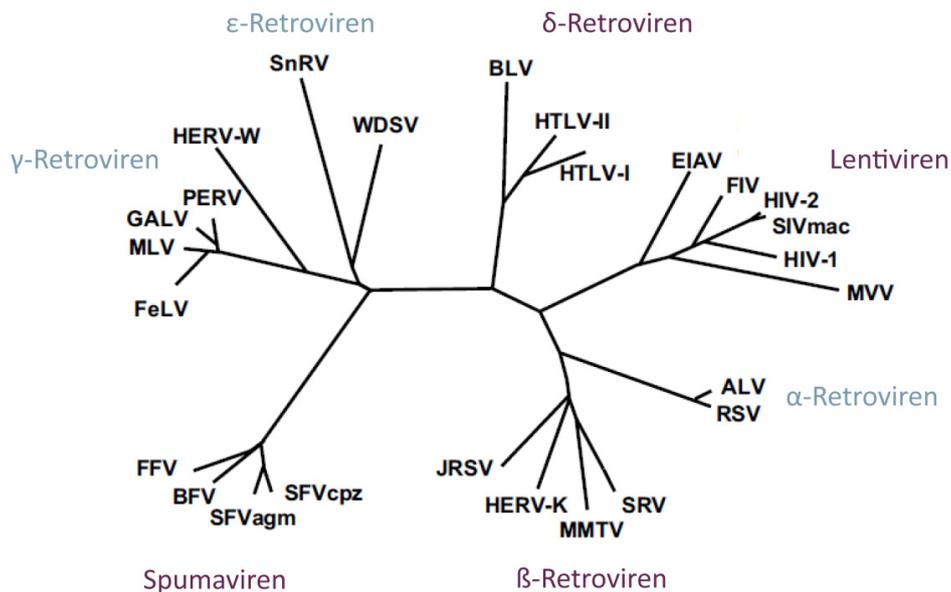


Abbildung 1: Phylogenetische Verwandtschaft der *Retroviridae*. Phylogenetischer Stammbaum basierend auf den Abgleich der Aminosäure-Sequenzen der Reversen Transkriptase. Blaue Schrift markiert die simplen Retroviren, lila Schrift die komplexen Formen. SnRV, Schlangen-Retrovirus; WDSV, Zander-Hautsarkomvirus; BLV, Bovines Leukämie-Virus; EIAV, Virus der infektiösen Anämie der Pferde; FIV, Felines Immundefizienzvirus; SIV, Simianes Immundefizienzvirus; MVV, Maedi-Visna-Virus der Schafe; ALV, Aviäres Leukosevirus; SRV, Simianes D-Typ Retrovirus; HERV, Humanes endogenes Retrovirus; JRSV, „Jaagsiekte Sheep Retrovirus“; SFV, Simianes Foamyvirus; BFV, Bovines Spumavirus; FFV, Felines Spumavirus, FeLV, Felines Leukämie-Virus; MLV, Mäuseleukämievirus; GALV, Gibbonleukämievirus; PERV, Porcines endogenes Retrovirus. Abbildung nach Fields (5.Edition) und Weiss, 2006 (modifiziert).

Diese vom „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV) erstellte, zurzeit verbindliche Taxonomie, unterteilt die Viren vor allem anhand genetischer Verwandtschaftsverhältnisse, aber auch Analysen der Virusmorphologie, ihrer Pathogenese und Wirtsspezifität wurden bei der Klassifizierung berücksichtigt. Die derzeit gängige Einteilung sowie die wichtigsten Vertreter sind in dem phylogenetischen Stammbaum in der Abbildung 1 dargestellt.

Weiterhin wird zwischen simplen und komplexen Retroviren unterschieden. Während die einfachen Formen nur die vier Haupt-Gene für die Strukturproteine und Enzyme tragen, besitzen die komplexeren Viren zusätzliche kleine regulatorische Proteine mit einer großen Bandbreite an Funktionen.

1.3 Aufbau der retroviralen Partikel

Retrovirale Partikel zeichnen sich durch sphärische Formen mit einem Durchmesser zwischen 100 bis 150 nm aus. Der Aufbau eines typischen Retrovirus ist in Abbildung 2 dargestellt.

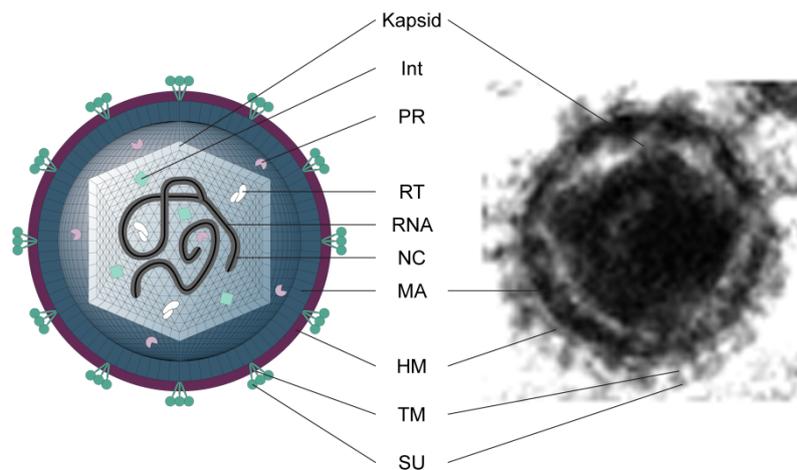


Abbildung 2: Morphologie eines typischen Retrovirus Im Innern eines Retrovirus wird das virale RNA-Genom von einem Kapsid umschlossen. Neben diesem sind die Enzyme Integrase (Int), Protease (PR) und die Reverse Transkriptase (RT) im Virus lokalisiert. Abgegrenzt werden sie von einer Hüllmembran (HM), die an der Innenseite mit Untereinheiten des Gags, den Matrixproteinen, assoziiert ist. An der Außenseite der Membran befinden sich die transmembranen Hüllproteine (TM) sowie die externen Glykoproteine (SU). Rechte Abbildung: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines reifen HERV-K113 Partikels.

Mit Hilfe biochemischer und elektronenmikroskopischer Methoden konnte die Trockenmasse eines retroviralen Partikels bestimmt werden. Ungefähr 65% eines Partikels bestehen demnach aus Proteinen, wobei der größte Anteil dem Hauptstrukturprotein (Gag) zugeordnet wird. Daneben beinhalten die Partikel 30% Lipide, 3% Kohlenhydrate sowie 2-3% Nukleinsäuren, darunter auch das diploide RNA-Genom und die als Primer für die Reverse Transkriptase fungierende tRNA [Vogt und Simon, 1999]. Als weitere virale Komponenten befinden sich im Inneren des Viruspartikels neben der RT die Enzyme Integrase (Int), RibonukleaseH (RNaseH) sowie die Protease (Pro). Abgeschirmt werden die viralen Proteine von einer Hüllmembran, die von der Wirtsmembran abgeleitet ist. Die Hüllmembran der Viren ist mit in Trimeren vorliegenden Glykoproteinen (Env), sowie diversen Wirtsmembran-Proteinen verbunden [Chervota *et al.*, 2002; Ott *et al.*, 2008]. Als Verankerung dient eine Region von etwa 20 hydrophoben Aminosäuren, die zu dem transmembranen Hüllprotein (TM) gehören. Eine weitere Untereinheit des Env ist das externe Glykoprotein (SU, „surface unit“), welches nichtkovalent an den extraviralen Bereich des TM-Proteins gebunden ist.

1.4 Aufbau des retroviralen Genoms

Das Genom der Retroviren besteht aus einzelsträngiger RNA in Plusstrangorientierung, deren Größe je nach Virustyp zwischen 7-12 Kilobasen (kb) variiert. Die RNA weist am 5`-Ende eine Cap-Struktur und am 3`-Ende einen Poly(A)-Schwanz auf und besitzt generell alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA.

Alle replikationskompetenten Mitglieder der *Retroviridae* verfügen über vier Genprodukte: Gag, Pro, Pol (Reverse Transkriptase, Integrase, RNaseH) und Env (Abbildung 3). Die kodierenden Regionen des in das Wirtsgenom integrierten Provirus werden am 5`-Ende und am 3`-Ende von zwei nichtkodierenden, regulatorischen Kontrollsequenzen flankiert. Die als „Long terminal repeats“ (LTR`s) bezeichneten Wiederholungssequenzen steuern den Start und das Ende der Transkription und enthalten U3- („unique“), R- (redundant) und U5-Regionen, die in gleicher Orientierung vorliegen. So beinhaltet der U3-Bereich Promotoren und *cis*-aktive Sequenzen, an die sich transaktive zelluläre Proteine binden und so zur Regulation der Transkription und Genexpression führen. Die U5-Region enthält wichtige Sequenzen, die für die Integration des Provirus in das Zellgenom essentiell sind. Auf den LTR-Bereich folgt die Primer-Bindestelle (PB), an der die Hybridisierung der für die Reverse Transkriptase als Primer verwendete tRNA an die virale RNA erfolgt. Der Genomabschnitt zwischen *gag* und PB wird als Leader-Sequenz bezeichnet. Diese enthält eine Spleißdonorstelle (SD) zur Herstellung von gespleißter *env*-

mRNA. Benachbart liegt eine ψ -Stelle, welche die Anlagerung des RNA-Genoms an die Nucleocapsid (NC)-Proteinbereiche des naszierenden Virus bei der Morphogenese vermittelt. Am 3'-Ende folgt im Anschluss an den kodierenden Bereich ein Polypurintrakt (PP), der ebenfalls eine Rolle als Kontrollelement bei der Initiation der Synthese des DNA-Doppelstranges spielt.

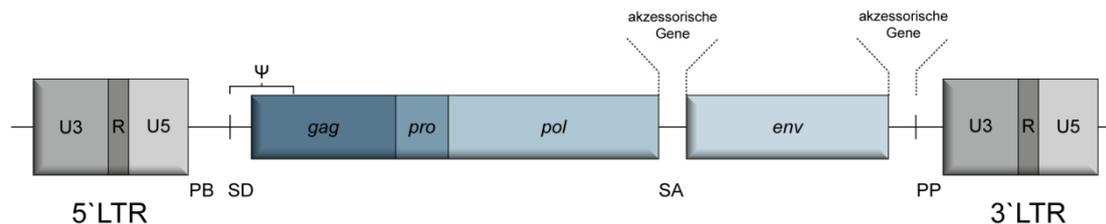


Abbildung 3: Genomorganisation der Retroviren. Schematische Darstellung der retroviralen Sequenzelemente und Gene. Die vier in allen Retroviren enthaltenen Leserahmen *gag*, *pro*, *pol* und *env* werden von zwei LTR's flankiert. Weitere mögliche akzessorische Proteine sind vermerkt. Für die Replikation wichtige Sequenzen sind eingezeichnet: Primer-Bindestelle (PB), Spleißdonorstelle (SD), ψ -Region, Spleißakzeptorstelle (SA) und Polypurintrakt (PP).

1.5 Replikation

Retroviren replizieren in einem komplexen Lebenszyklus, welcher in Abbildung 4 dargestellt ist. Zuerst erfolgt die Adsorption der Glykoproteine an spezifische Membran-Rezeptoren der Wirtszelle. Als Initiator gilt dabei die SU-Untereinheit des Env-Proteins, die den Erstkontakt mit dem Rezeptor vermittelt. Unter dem Einfluss der TM-Untereinheit verschmilzt die Virusmembran mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle [McCune *et al.*, 1988]. Diesem Prozess sind drastische Konformationsveränderungen der Glykoproteine vorausgegangen. Überdies wird Energie freigesetzt, was zur Entstehung einer Zellmembranpore beiträgt. Nachdem die noch im Kapsid-verpackte RNA ins Zellinnere gelangt, folgt die „Auflösung“ des Kapsids [Doms und Moore, 2000; Melikyan *et al.*, 2000].

Die so freigelegte virale RNA wird anschließend in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben. Als Primer fungiert bei diesem Vorgang die an das virale Genom gebundene tRNA. Während der Reversen Transkription hydrolysiert die RNaseH den RNA-Anteil der Heteroduplex, so dass schließlich ein doppelsträngiges DNA-Molekül, flankiert von zwei LTR-Bereichen, vorliegt [Omer *et al.*, 1982; Resnick *et al.*, 1984]. Aufgrund einer fehlenden Lesegenauigkeit und Korrekturfunktion der Mg^{2+} - oder Mn -abhängigen RT, werden bei der Synthese beider Stränge mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-4} falsch

gepaarte Basen eingebaut [Battula *et al.*, 1976]. So kann die hohe genetische Variabilität der Retroviren erklärt werden.

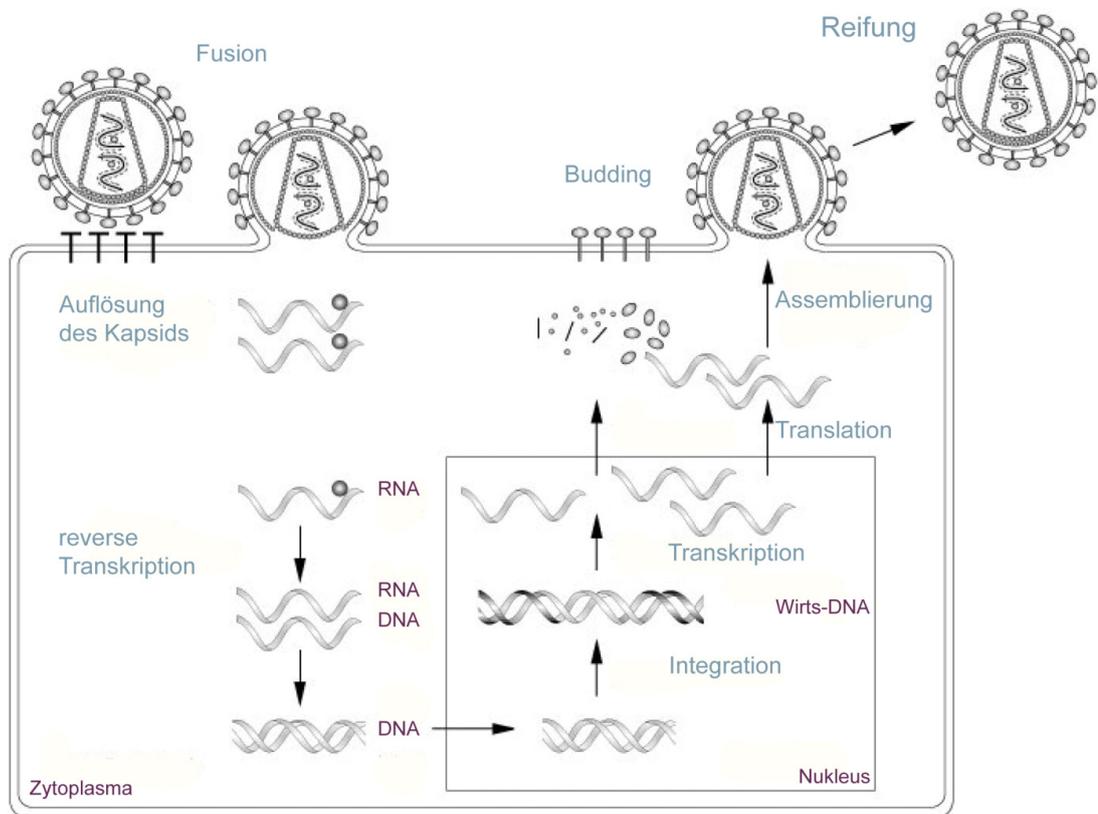


Abbildung 4: Schematische Übersicht des Replikationszyklus der Retroviren. Env vermittelt die Rezeptor-gebundene Adsorption des Retrovirus an die Wirtszelle. Nach der Fusion beider Membrane gelangt die Kapsid-verpackte RNA über eine Zellmembranpore ins Zytoplasma. Der Auflösung des Kapsids folgt die Reverse Transkription der virale RNA in doppelsträngige DNA. Der dann in den Nucleus exportierte „DNA-Präintegrationskomplex“ integriert als Provirus in das Wirtsgenom. Unter Mitwirkung der RNA-Polymerase II erfolgt die Transkription der proviralen DNA. Nach dem darauffolgenden Spleißen sind zwei verschiedene RNA-Formen vorhanden: gespleißte mRNA und ungespleißte Vollängen-RNA. Während die Synthese der Env-Proteine an der ER-Membran erfolgt, werden alle anderen Proteine an freie Ribosomen synthetisiert. An der Zellmembran bzw. im Zytoplasma assemblieren durch den Zusammenbau der Gag-Vorläuferproteine sowie den Einbau der zwei ungespleißten Vollängen-RNA`s virale Partikel. Nach der Knospung der Prokapside an der Wirtsmembran spaltet die Protease die Gag-Polypeptide proteolytisch. Es entstehen reife, infektiöse Partikel, die in der Lage sind, neue Zielzellen zu infizieren. Abbildung modifiziert. Quelle: <http://www.wissenschaft-online.de/lexika/images/biok/f3f805.jpg>

Nach dem Transport des mit Proteinkomponenten verbundenen „DNA-Präintegrationskomplex“ in den Zellkern erfolgt die kovalente Integration der viralen DNA als Provirus in das Wirtsgenom. Enzymatisch wird dieser Vorgang von der Endonuklease- und Ligaseaktivität der Integrase katalysiert. Als Folge der Integration können zelluläre Gene zerstört oder unter die Kontrolle des 3`-LTR-Promotors gebracht werden [Modrow, 2003].

Anschließend beginnt die späte Phase der Replikation, welche vor allem über die Enzyme der Wirtszelle reguliert wird. Unter Mitwirkung der zellulären RNA-Polymerase II wird die provirale DNA transkribiert und je nach Virusspezies entstehen daraufhin mehrfach oder einfach gespleißte mRNA-Moleküle sowie ungespleißte Vollängen-RNA's. Während ein Teil der Transkripte als genomische RNA in die naszierenden Viruspartikel eingebaut wird, wird der Rest als Gag-Vorläuferproteine translatiert. Das Env-Glykoprotein wird aus einer einfach gespleißten mRNA synthetisiert. Bei den komplexen Retroviren kodieren zusätzlich mehrfach gespleißte mRNA's für die kleineren, regulatorisch aktiven Proteine [Fields, 2007].

Die Synthese der Hüllmembran-Proteine erfolgt an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Bevor Env zur Zelloberfläche transportiert wird, kommt es zur Faltung und Oligomerisierung des Proteins [Tucker *et al.*, 1991]. Infolgedessen wird Env durch Furin-Proteasen im Golgi-Apparat proteolytisch in seine zwei Untereinheiten TM und SU gespalten. Alle anderen Virusproteine werden an freien Ribosomen im Zytoplasma translatiert. Zwei ungespleißte RNA-Spezies gelangen über das ψ -Verpackungssignal an die Nukleokapsidanteile der Gag-Polyproteine und werden dadurch in die entstehenden Partikel eingebaut.

Alle weiteren Schritte des Replikationszyklus - die Assemblierung, die Freisetzung sowie die Reifung der Partikel - werden in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben.

1.5.1 Assemblierung

Als Assemblierung wird der geordnete Zusammenbau aller Virusproteine und Virusgenome zu infektiösen Partikeln am Ende eines Replikationszyklus bezeichnet. Die retrovirale Assemblierung und die Freisetzung der entstandenen Partikel werden über die viralen Gag-Vorläuferproteine vermittelt. So genügt zur Abschnürung virusähnlicher Partikel eine alleinige Gag-Expression [Delchambre *et al.*, 1989; Gheysen *et al.*, 1989; Karacostas *et al.*, 1989]. Trotzdem rekrutiert Gag zur Entstehung funktioneller, infektiöser Partikel das Envelope-Protein, die virale genomische RNA sowie weitere essentielle virale

Komponenten wie die Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase, welche auf den Gag-Vorläuferproteinen exprimiert werden. Zusätzlich werden weitere virale aber auch zelluläre Proteine (z.B. Aktin, Cyclophilin A und multiple RNA-bindende Proteine) in die entstehenden Virionen eingebaut, deren genaue Funktionen allerdings häufig ungeklärt sind [Ott *et al.*, 2008; Swanson und Malim 2008].

Zur Bildung infektiöser Viren werden die Glykoproteine am ER synthetisiert und anschließend über das Trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran, an den Orten der Viruspartikelbildung, transportiert. An der Zellmembran angelangt, lagern sich die Env-Proteine in diese ein. Da die Zellmembran anschließend mit dem Viruskapsid interagiert, gelangen die Env-Proteine in die entstehenden Virionen. Außerdem kann die N-terminale Region der Gag-Proteine (beispielsweise gezeigt für HIV-1) mit dem zytoplasmatischen Schwanz der TM-Untereinheit interagieren. Über diese Bindung wird der Einbau der Env-Proteine in die naszierenden Viruspartikel gesteigert [Dubay *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1992 and 1993; Dorfman *et al.*, 1994b]. Das virale RNA-Genom wird hingegen über sein ψ -Verpackungssignal von den Gag-Proteinen erkannt und so im Komplex mit den Gag-Vorläuferproteinen zellulär transportiert. Bei Lentiviren findet die Bindung an die ψ -Stelle über zwei Zinkfinger motive statt [De Guzman *et al.*, 1998; Amarasinghe *et al.*, 2000]. Bei anderen Retroviren, die nur ein Zinkfinger motiv besitzen (z.B. MLV), wird die Interaktion über eine Konformationsänderung der RNA verursacht [D'Souza und Summers, 2004]. Außerdem können noch andere Faktoren eine Rolle beim RNA-Transport spielen. So wurde für HIV-1 gezeigt, dass die Bindung des akzessorischen Rev („regulator of expression of virion proteins“-) Proteins an das virale RNA-Genom wichtig für Selektion der Vollängen-mRNA während der Assemblierung ist [Brandt *et al.*, 2007].

Aufgrund fundamentaler Unterschiede bei der intrazellulären Assemblierung, aber auch beim Budding sowie bei der Kernstruktur der Retroviren wurde eine Klassifizierung in verschiedene morphologische Typen vorgenommen. Als A-Typen werden Retroviren bezeichnet, die an das endoplasmatische Retikulum knospen. Hierzu zählen die „Intracisternal Type-A Particles“ (IAPs), die von endogenen Retroviren-ähnlichen Elementen in Nagern gebildet werden [Leiter *et al.*, 1979].

Darüber hinaus werden zwei Hauptwege bei der Virusassemblierung unterschieden. Einerseits assemblieren unreife Prokapside der β - und δ -Retroviren sowie der Spumaretroviren, wie z.B. MPMV und MMTV, im Zytoplasma. Die so bei der B/D-Typ-Assemblierung entstandenen Partikel werden anschließend zur Plasmamembran transportiert. Andererseits formen alle anderen Retroviren erst nach dem Erreichen des Gag-Proteins an der Wirtsmembran elektronendichte Partikel (C-Typ-Assemblierung). In diesem Fall assoziieren die Gag-Polyproteine über hydrophobe Sequenzen,

basische Reste oder Myristinsäurereste mit der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran [Henderson *et al.*, 1983]. Dort verbinden sich die Gag-Proteine unter Bildung von Aggregaten unterhalb der Membran. Durch die immer größer werdenden Gag-Ansammlungen bildet sich eine Krümmung in der Membran, die schließlich zur Knospung der Partikel führt.

1.5.2 Budding

Budding bezeichnet die Knospung assemblierender Viruspartikel aus zellulären Membrankompartimenten. Retrovirales Budding benötigt die Komponenten des MVB („multivesicular bodies“)-Signalweges. Bei diesem Signalweg werden mißgefaltete Membranproteine sowie aktivierte Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokinrezeptoren in die intraluminalen Vesikel der multivesikulären, späten Endosomen (MVB) transportiert. Eine Sortierung der Proteine erfolgt dabei über eine Ubiquitinierung. Ubiquitin ist generell an diversen zellulären Prozessen beteiligt. Ursprünglich wurde dieses Protein im Zusammenhang mit dem Proteasom-System entdeckt, bei dem zelluläre Proteine abgebaut werden. Zur Degradation wird dabei ein Ubiquitin an ein Lysin des Zielproteins geknüpft. Anschließend werden weitere Ubiquitin-Einheiten über interne Lysine eines bereits gebundenen Lysins angeheftet. Sind mindestens vier Ubiquitin-Moleküle in einer Kette an das Zielprotein angehängen, führt dies zu dessen Degradation. Da Ubiquitin sieben Lysine enthält, sind verschiedene Arten der Kettenbildung möglich. Für das Ubiquitin-Proteasom-System sind Verknüpfungen über das Lysin an Position 48 notwendig [Chau *et al.*, 1989; Finley *et al.*, 1994]. Bei dem MVB-Signalweg hingegen spielen Polyubiquitininketten, die über Lysin⁶³ miteinander verknüpft sind, eine Rolle. Weiterhin können die Proteine aber auch über eine Monoubiquitinierung für den MVB-Signalweg markiert werden. In der endosomalen Membran werden die ubiquitinierten Proteine vom sogenannten ESCRT („endosomal sorting complex required for transport“)-System, einem Multiproteinkomplex, erkannt [Katzmann *et al.*, 2001; Ren und Hurley, 2010]. Diese in Säugetieren hochkonservierte Maschinerie hat drei verschiedene aber miteinander verbundene Aufgaben:

1. Sie erkennt und bindet ubiquitinierte Zielproteine und konzentriert diese mit Hilfe von Clathrin an den endosomalen Membranen.
2. Darüber wird die endosomale Membran der multivesikulären, späten Endosomen so eingestülpt beziehungsweise gekrümmt, dass die ubiquitinierten Proteine in die endosomalen Invaginationen befördert werden können.

3. Abschließend katalysiert dieser Komplex die finale Abschnürung der endosomalern Membraneinstülpungen, bei dem intraluminalen Vesikel geformt werden, die die ubiquitinierten Zielproteine beinhalten [Raiborg und Stenmark, 2009].

Somit ermöglichen die ESCRT-Proteine den späteren Transport ubiquitinierten Proteinen von den Endosomen in die Lysosomen.

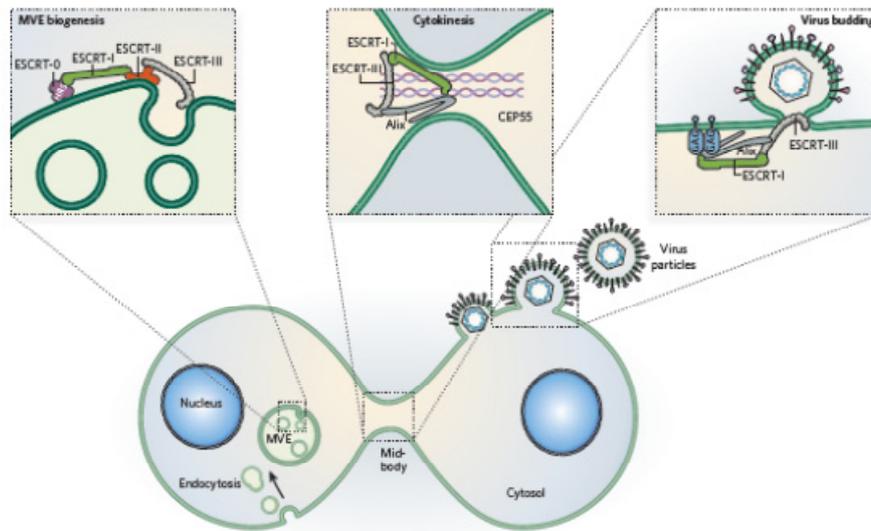


Abbildung 5: Die ESCRT-Maschinerie ist an drei topologisch äquivalenten Ereignissen der Membranabschnürungen beteiligt. ESCRT-III ist ein hoch konservierter Komplex, der die Abschnürung von dünnen mit Zytosol gefüllten Membranbrücken bewirkt. Links: In der Biogenese der multivesikulären Endosomen wird ESCRT-III über ESCRT-0, I und II rekrutiert. Mitte: Bei der Zellteilung erfolgt die Rekrutierung von ESCRT-III über das Zentrosomprotein CEP55 und Alix. Rechts: Beim retroviralen Budding wird dieser Prozess von den Gag-Proteinen, ESCRT-I und Alix gesteuert. Abbildung aus Raiborg und Stenmark, 2009.

Insgesamt vier ESCRT-(0, I, II, III) Komplexe sowie weitere zusätzliche Komponenten agieren bei diversen physiologischen Prozessen der Zelle. So übernimmt das ESCRT-System eine Aufgabe bei der finalen Abschnürung der Membran während der Zellteilung der Säugetiere [Spitzer *et al.*, 2006; Carlton und Martin-Serrano, 2007; Obita *et al.*, 2007]. Neueste Indizien lassen vermuten, dass ESCRT-Komplexe auch an Autophagie sowie an einer Remodellierung der Ubiquitinketten von Zielproteinen beteiligt sind [Swaminathan *et al.*, 1999; Doyotte *et al.*, 2005; Filimonenko *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Nikko *et al.*, 2007].

Retroviren, aber auch andere umhüllte Viren machen sich diese Maschinerie der Wirtszelle zu Nutze, um an der Zellmembran der Wirtszelle zu buddeln (Abbildung 5). Die Gag-Proteine der Retroviren sind in der Lage, mit diversen Mitgliedern des ESCRT-Systems zu interagieren. Eine Übersicht über alle beteiligten Proteine der ESCRT-Kaskade sowie der ESCRT-Proteine, die mit den Retroviren aber auch mit anderen umhüllten Viren interagieren, ist in Abbildung 6 dargestellt.

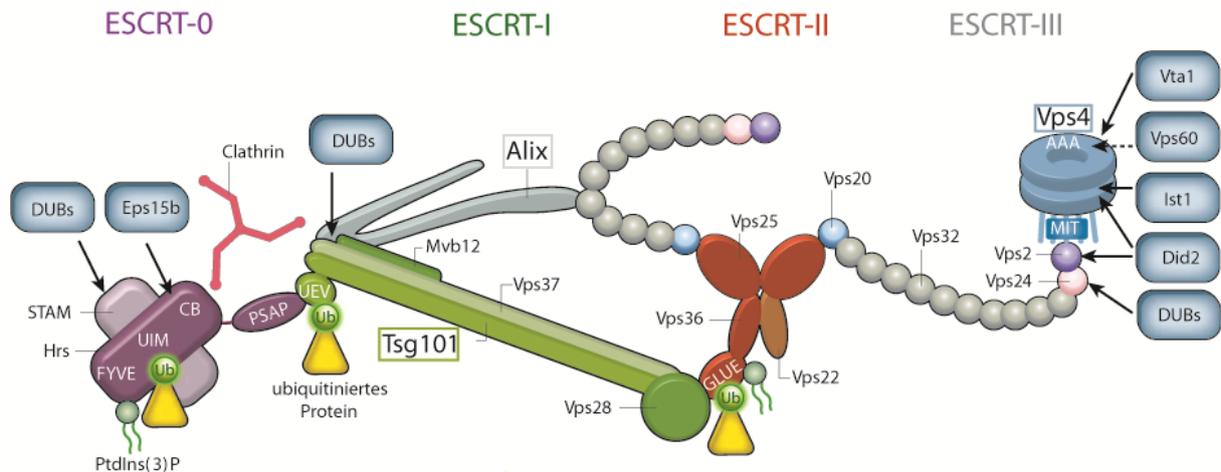


Abbildung 6: Zusammensetzung und molekulare Interaktionen des ESCRT-Systems. Die Interaktionen der vier ESCRT-Komplexe untereinander oder mit akzessorischen Molekülen, wie beispielsweise deubiquitinierenden Enzymen (DUBs), sind hier dargestellt. Der ESCRT-0-Komplex, der aus den Untereinheiten STAM und Hrs besteht, wird über die Bindung mit dem Lipidphosphat PtdIns(3)P zur endosomalen Membran rekrutiert. Das Hrs-Protein interagiert über seine PSAP-Domäne mit Tsg101, so dass weitere ESCRT-I- und ESCRT-II-Proteine angezogen werden. Beide ESCRT-Komplexe können ebenso an ubiquitinierte Proteine binden. Über das ESCRT-II-Protein Vps25 binden die ESCRT-III-Proteine, die zur Membranabschnürung benötigt werden. Währenddessen spalten die DUBs die Ubiquitin-Moleküle von den sortierten Proteinen ab. Mit Hilfe der ATPase Vps4 disassemblieren die ESCRT-Proteine, so dass diese erneut ubiquitinierte Proteine in intraluminale Vesikel befördern können. Die mit den Retroviren interagierenden Proteine Tsg101, Alix und Vps4 sind farbig umrandet. Die Domänen einzelner Proteine sind weiß markiert. Abbildung aus Raiborg und Stenmark, 2009 (verändert).

Erstmals konnte eine solche Bindung zwischen dem HIV-1 Hauptstrukturprotein und dem Tsg101 („tumour susceptibility gene“-)Protein nachgewiesen werden [Garrus et al., 2001]. Die Identifizierung

von Tsg101 als p6-interagierendes Protein erfolgte mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Versuchs in *Saccharomyces cerevisiae* [Garrus et al., 2001; Demirov et al., 2002; VerPlank et al. 2001; Myers und Allen, 2002]. Als Mitglied des ESCRT-I-Komplexes, ist Tsg101 ein funktionell wichtiger Bestandteil der Kaskade. Das Protein setzt sich aus vier funktionellen Domänen zusammen. So weist es eine prolinreiche, eine Coiled-Coil sowie eine C-terminale Domäne auf. Zusätzlich verfügt es über eine Region, die sequenzielle und strukturelle Ähnlichkeit mit Ubiquitin-konjugierenden (E2)-Enzymen besitzt. Die E2-Enzyme sind bei einer Ubiquitinierung von Bedeutung, da sie ein Ubiquitin an Lysine transferieren, die danach von Ubiquitin-Ligasen angeheftet werden. Tsg101 besitzt nun eine solche E2-ähnliche Domäne, allerdings ohne enzymatische Aktivität, da ein Cystein im aktiven Zentrum fehlt. Normalerweise bindet Tsg101 über seine E2-ähnliche Domäne an ein PSAP (Prolin- Serin-Alanin-Prolin)-Motiv des ESCRT-0-Proteins Hrs. Somit resultiert die Rekrutierung des ESCRT-I-Komplexes aus dem ESCRT-0-Komplex [Lu *et al.*, 2003]. Allerdings können auch umhüllte Viren diesen Komplex über bestimmte PT/SAP (Prolin-Threonin/Serin-Alanin-Prolin)-Motive rekrutieren. PT/SAP sind hoch konserviert und kommen weit verbreitet in vielen umhüllten Viren vor. Durch diese Bindung der viralen PT/SAP-Motive mit Tsg101 werden weitere ESCRT-Proteine an die Orte der Virusassemblierung angezogen, wodurch die Viren befähigt sind, sich von der Zellmembran abzuschneiden.

Ebenfalls gut untersucht ist der Einfluss von Alix, eine akzessorische Komponente des ESCRT-Systems, auf das virale Budding. Strukturelle Analysen zeigen, dass Alix aus drei funktionellen Regionen besteht. Während die N-terminale Bro-1-Domäne für die Bindung von ESCRT-III und die endosomale Rekrutierung verantwortlich ist, vermittelt die C-terminale prolinreiche Domäne die Bindung mit Tsg101 und weiteren Faktoren. Dementsprechend ist Alix ein wichtiges Protein, das eine direkte Verbindung zwischen ESCRT-I und ESCRT-III herstellt. Die zentral gelegene Domäne hingegen kann an konservierte YP_x_nL (Tyrosin-Prolin-beliebige Aminosäuren-Leucin)-Motive viraler Strukturproteine binden [Puffer et al., 1997; Chatellard-Causse et al., 2002; Strack et al., 2003; von Schwedler *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Fisher et al., 2007]. Nachdem Alix vom ESCRT-System beziehungsweise von den Retroviren gebunden wurde, rekrutiert es über seine Bro-1-Domäne die ESCRT-III-Proteine. Diese wiederum interagieren mit weiteren ESCRT-assoziierten Proteinen, insbesondere mit Vps4 („vacuolar protein sorting 4“). Somit ahmen umhüllte Viren ESCRT-Komponenten über ihre YP_x_nL-Motive nach, um mit Hilfe der ESCRT-Kaskade an der Plasmamembran zu buddieren.

Weiterhin können die HECT-Ubiquitin-Ligasen genannt werden, die über die Interaktion mit PPxY (Prolin-Prolin-beliebige Aminosäure-Tyrosin)-Motiven das retrovirale Budding beeinflussen. Dabei bilden die HECT-Ligasen eine funktionelle Verbindung zwischen den Retroviren und dem ESCRT-Signalweg

[Wills *et al.*, 1994; Kikonyogo *et al.*, 2001; Yasuda *et al.*, 2002; Bouamr *et al.*, 2003; Martin-Serrano *et al.*, 2005]. So können umhüllte Viren durch die PPxY-HECT/Ubiquitin-Ligasen-Bindung die ESCRT-Maschinerie rekrutieren, um an der Wirtszellmembran zu budden.

Ein weiteres Protein des ESCRT-Systems, das mit Retroviren interagiert, ist das Vps4-Protein. Dabei geht die Bezeichnung dieses Proteins auf historische Gründe zurück, da viele Komponenten des ESCRT-Systems als Vps („vacuolar protein sorting“)-Proteine bezeichnet werden. Als ATPase fungiert Vps4 in einem späten Stadium der ESCRT-Maschinerie, wobei es die Energie zur Dissoziation des ESCRT-Systems bereitstellt. Dadurch werden die ESCRT-Proteine wieder freigesetzt und können so erneut ubiquitinierte Proteine sortieren und in intraluminalen Vesikeln entlassen [Babst *et al.*, 1997; Babst *et al.*, 1998; Katzmann *et al.*, 2002; Baumgärtel *et al.*, 2011]. Verschiedene Studien konnten auch für Vps4 eine Rolle im retroviralen Budding belegen, da bei einer Überexpression einer katalytisch inaktiven Form dieses Proteins (Vps4_{E228Q}) eine Arretierung der MLV- und HIV-1-Knospeung eintritt [Garrus *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2005; Saksena *et al.*, 2007]. Zudem konnte mittels Lebendzellmikroskopie eine Rekrutierung von Vps4A an die Seite der entstehenden HIV-1 Partikel nachgewiesen werden [Baumgärtel *et al.*, 2011].

1.5.2.1 L-Domänen

Diese mit den ESCRT-Komponenten interagierenden, konservierten Motive PT/SAP, YP_x_nL und PPxY werden als L („Late assembly“)-Domänen bezeichnet. Denn Mutationen in diesen Sequenzen führen zu charakteristisch defekten Assemblierungs- und Budding-Phänotypen, wodurch sich die Virionen nicht mehr von der Plasmamembran lösen können. Erste Hinweise, dass Gag-Proteine in den Ablösungsprozess von Viren an der Zellmembran beteiligt sind, erbrachten Gottlinger und seine Kollegen im Jahr 1991. Ein inseriertes Stopp-Codon in der p6-Region von HIV-1 führte zu einer Blockierung der Virusfreisetzung aus der Wirtszelle. Später wurde erkannt, dass die hoch konservierte PTAP-Konsensussequenz für die Buddings- und Freisetzungsfähigkeit der HIV-1 Partikel verantwortlich ist [Huang *et al.*, 1995]. Ein ähnlicher Buddingdefekt wurde anschließend durch Mutationen im p2b-Peptid des *Rous-Sarkomvirus* hervorgerufen [Wills *et al.*, 1994]. Auch für das *Virus der infektiösen Anämie der Pferde* (EIAV) konnte eine YPDL-Sequenz im C-terminal gelegenen p9-Protein identifiziert werden [Puffer *et al.*, 1997]. Gegenwertig sind drei teilweise hoch konservierte L-Domänen-Typen bekannt, die in den Gag-Proteinen der Retroviren lokalisiert sind (Abbildung 7). Dabei sind die diversen

Typen PT/SAP, YP_X_nL und PPxY sogar zwischen nicht verwandten Viren funktionell austauschbar. Ferner kann deren Position im Gag-Protein variieren [Parent *et al.*, 1995].

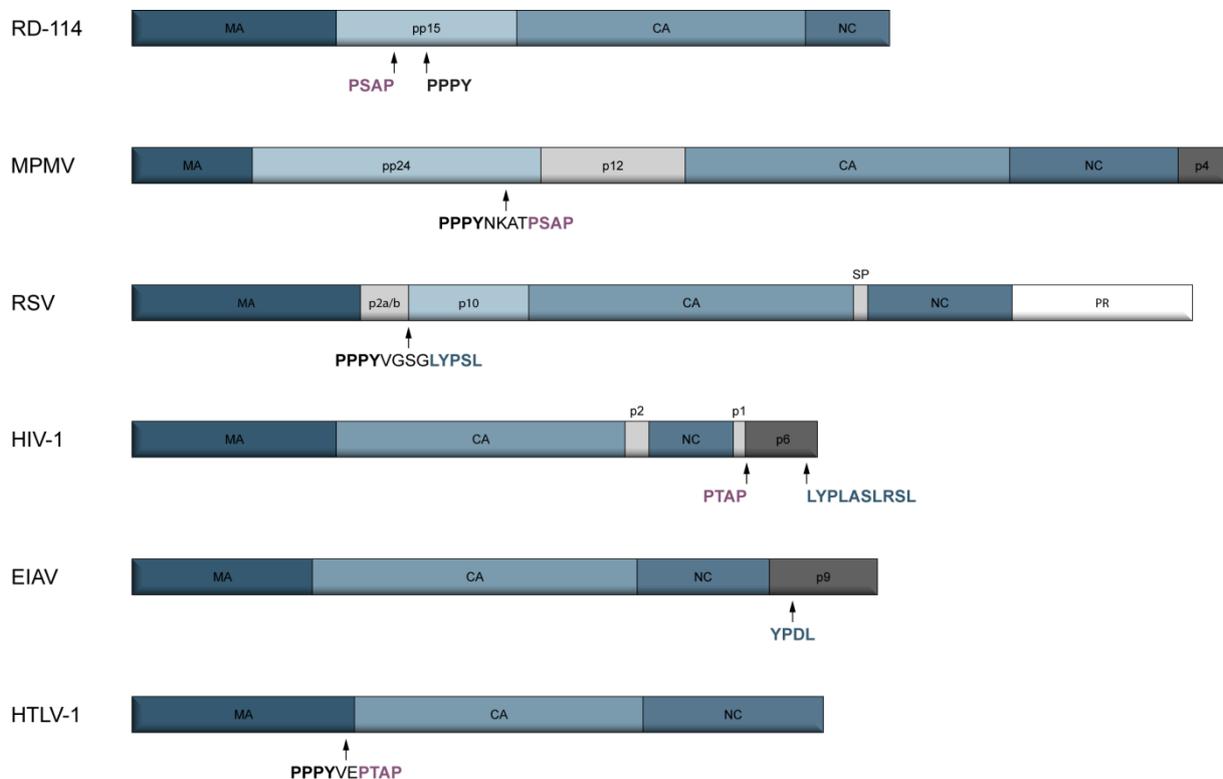


Abbildung 7: Übersicht über die verschiedenen retroviralen Gag-Proteine mit deren L-Domänen-Motive. Darstellung der Gag-Proteine des feline endogenen Retrovirus *RD-114*, des Betaretrovirus MPMV, des Alpharetrovirus RSV, der Lenitviren HIV-1 und EIAV, sowie des Deltaretrovirus HTLV-1. Die Gag-Proteine werden von der Protease (PR) in Matrix- (MA), Capsid- (CA), Nukleokapsidproteine (NC) sowie weiteren häufig kleinen Untereinheiten (pp15, pp24, p12, p4, p2a/b, SP, p2, p1, p6 und p9) prozessiert. Die L-Domänen-Sequenzen sind fettgedruckt und deren Positionen in den Gag-Proteinen mit Pfeilen gekennzeichnet.

Häufig besitzen Retroviren zwei Motive, die in unmittelbarer Nähe zueinander liegen. Oftmals werden diese Sequenzen nur durch wenige Aminosäuren voneinander getrennt. So trägt beispielsweise das feline endogene Retrovirus *RD-114* ein PSAP- und ein PPPY-Motiv in seinem pp15-Protein. Auch MPMV weist zwei, durch nur vier Aminosäuren, getrennte L-Domänen auf. Als primäre L-Domäne von HIV-1 agiert die PTAP L-Domäne. Allerdings ist die Funktionalität dieser Domäne abhängig vom Zelltyp.

In adhärennten Zellen, wie Makrophagen, wird das PTAP-Motiv für eine Virus-Zell-Ablösung benötigt, während es in T-Zellen, aber auch in primären Lymphozyten, für eine Virus-Virus-Abnabelung verantwortlich ist [Demirov *et al.*, 2002]. Neben diesem Motiv beinhaltet das HIV-1 Gag-Protein ein YP_x_nL-Motiv, dass wie bei Lentiviren üblich, im C-terminalen Linkerprotein lokalisiert ist. Diese als sekundär fungierende L-Domäne hat jedoch, solange die PTAP L-Domäne vorhanden ist, nur einen geringen Effekt auf das Budding der Viren [Strack *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2007]. Außerdem ist auch bei diesem Motiv der Effekt der Inaktivierung stark zelltypabhängig. So führt die Deletion dieses Motives in COS-7-Zellen zu einem zwei- bis dreifachen Rückgang der HIV-1 Partikelproduktion, während keine Auswirkungen in HeLa-Zellen beobachtet werden konnten [Demirov *et al.*, 2002].

Ausgehend von neuesten Beobachtungen sind auch die Nukleokapsidproteine einzelner Retroviren an der Ablösung der Virionen von der Plasmamembran involviert. Studien der Gruppe Bello *et al.*, 2012 zeigen, dass das NC-Protein wichtig für die Virusfreilassung der HIV-1 und der Lentiviren Affenimmundefizienzvirus cpzGAB2 (SIVcpzGAB2) oder SIVsmmE543 ist. Dabei interagiert die NC-Region mit einem intakten PTAP-Motiv. Sogar wenn dieses Motiv nachträglich in ein heterologes EIAV Gag-Protein inseriert wird, konnte eine NC-PTAP-Bindung festgestellt werden. Somit spielt die NC-Region des Gag-Vorläufers auch beim Budding von EIAV eine Rolle, sobald dieses ein zusätzliches PTAP-Motiv enthält.

In der Tabelle 1 ist eine Übersicht über alle ESCRT-Komponenten sowie die ESCRT-assoziierten-Proteine und deren Implikation im retroviralen Budding bzw. Interaktion mit den L-Domänen dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die Bedeutung der ESCRT-Untereinheiten auf das retrovirale Budding. Referenzen: (1) Pornillos *et al.*, 2003 (2) Martin-Serrano *et al.*, 2001 (3) Garrus *et al.*, 2001 (4) Gottwein *et al.*, 2003 (5) Bouamr *et al.*, 2003 (6) Martin-Serrano *et al.*, 2003a (7) Tanzi *et al.*, 2003 (8) Stuchell *et al.*, 2004 (9) Eastman *et al.*, 2005 (10) Morita *et al.*, 2007a (11) Langelier *et al.*, 2006 (12) Agromayor und Martin-Serrano, 2006 (13) von Schwedler *et al.*, 2003 (14) Martin-Serrano *et al.*, 2003b (15) Ward *et al.*, 2005 (16) Strack *et al.*, 2003 (17) Dilley *et al.*, 2010 (18) Medina *et al.*, 2005 (19) Saksena *et al.*, 2007 (20) Bajorek *et al.*, 2009 (21) Agromayor *et al.*, 2009. Tabelle aus McDonald and Martin-Serrano, 2009 (modifiziert)

Untereinheiten	Rolle im retroviralen Budding	Referenzen
ESCRT-0		
Hrs	nicht benötigt	1
Stam	ungeklärt	
ESCRT-I		
Tsg101	benötigt für das Budding der HIV-1, MPMV, HTLV-1 Viren > bindet an deren PT/SAP-Motive	2,3,4
Vps28	involviert	5,6,7,8
Vps37	involviert in der HIV-1 Freisetzung	8, 9
Mvb12	Rolle in der Reifung und/oder Infektiosität von HIV-1	10
ESCRT-II		
Vps22	nicht benötigt	11
Vps25	nicht benötigt	11
Vps36	nicht benötigt	11
ESCRT-III		
Did2	Überexpression eines YFP-Fusions-Konstrukt inhibiert Budding	12
Vps2A und VPS2B	Vps2A-YFP inhibiert das Budding, Vps2B hat keinen dominant-negativen Effekt	13,14
Vps24	Überexpression eines YFP-Fusions-Konstrukt inhibiert Budding	13
Vps32	YFP-Fusionsprotein inhibiert das Budding	13,14
Vps60	YFP-Fusionsprotein inhibiert Budding, aber Abbau steigert die virale Freisetzung	14, 15
Vps20	nicht benötigt	11
ESCRT-assoziierte-Proteine		
Alix	wird zum Budding von EIAV, HIV-1, RSV benötigt ➤ bindet an deren YP _x L-Motive	16,17
VPS4A, VPS4B	zum viralen Budding benötigt	3,13, 18,19
Ist1	nicht benötigt	20,21

1.5.3 Reifung und Morphologie retroviraler Partikel

Erstmals wurde 1975 mit Pulse-Chase-Experimenten an aviären Retroviren gezeigt, dass die Gag-Vorläuferproteine in kleinere Untereinheiten prozessiert werden [Vogt *et al.*, 1975]. Bei dieser Spaltung, die von der viralen Protease gesteuert wird, kommt es zu drastischen morphologischen Veränderungen des Virions. Der als Reifung bezeichnete Prozess ist essentiell für die Entstehung von infektiösen Partikeln (Abbildung 8).

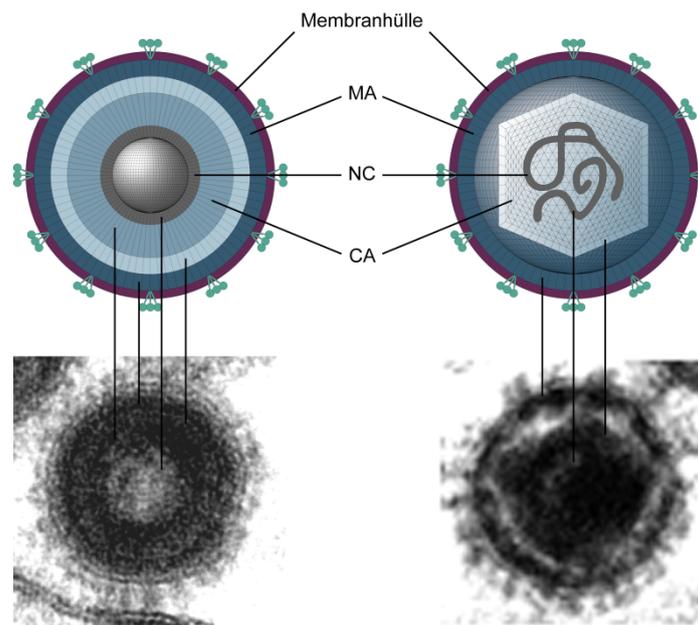


Abbildung 8: Anordnung der Gag-Proteine in unreife und reife retrovirale Partikel. Oben: Schematische Darstellung der Gag-Verteilung in Retroviren. Unten: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von HERV-K113 Partikeln in einem unreifen (links) oder reifen Stadium (rechts).

Unreife Partikel der Orthoretroviren zeichnen sich durch eine sphärische Morphologie mit radial angeordneten Gag-Polyproteinen aus. Die hierbei N-terminal gelegene Matrixdomäne ist mit der Doppellipidschicht der Zellmembran über ein Myristinsäurerest verankert, während das Nukleokapsid mit der viralen RNA in Kontakt steht [Yeager *et al.*, 1998; Briggs *et al.*, 2004]. Formationen von unreifen Partikeln benötigen multiple, aber schwache Gag-Protein-Interaktionen. Bei HIV-1 ist hierbei vor allem die C-terminale Kapsidomäne und das benachbarte SP1-Peptid involviert [Dorfman *et al.*, 1994; Krausslich *et al.*, 1995]. Die Anzahl der interagierenden Gag-Moleküle variiert, so enthält ein 145nm großer HIV-1 Partikel um die etwa 5000 Gag-Moleküle [Briggs *et al.*, 2004]. Aufgrund der sehr rigiden Gag-Hülle kann eine Disassemblierung und somit der Eintritt in eine neue Zelle wahrscheinlich nicht

erfolgen [Kurth und Bannert, 2010]. Dagegen verfügen reife Partikel über eine metastabile Struktur. Diese Struktur ermöglicht dem Partikel mit seiner Zielzelle zu interagieren und zu fusionieren. Hierbei ist das virale Genom in einem Proteinkern eingelagert, der in die Zielzelle eingeschleust wird und die Disassemblierung reguliert. Die innere Schicht der Virusmembran wird von dem Matrixprotein umrandet, wobei diese eine unvollständige Lage bildet und nur teilweise die Membran bedeckt [Briggs und Kräusslich, 2011]. Je nach Virustyp besitzen die Partikel sphärisch-ikosaedrisch oder konisch geformte Kerne, bei der das Kapsidprotein als Homomultimer eine Hülle um den NC-RNA-Komplex bildet. In Abbildung 8 ist die Anordnung der Gag-Proteine in unreife und reife Partikel schematisch dargestellt.

1.6 Endogene Retroviren

Retroviren können endogen im Genom vorliegen, das heißt, sie sind in allen Zellen eines Organismus integriert und werden vertikal über die Keimbahn vererbt. Ausgangspunkt ist die Infektion von Keimbahnzellen durch exogene Retroviren, die nach ihrer Integration der Vererbung der Mendelschen Regeln unterliegen. Jeder Nachkomme, der sich aus den Keimbahnzellen entwickelt, trägt dabei das Provirus an derselben chromosomalen Position. Endogene Retroviren (ERV) besetzen mit bis zu 10% Anteil die Säugetier-Genome, sind jedoch häufig durch Deletionen sowie Mutationen inaktiviert [Gifford *et al.*, 2003]. Trotzdem besitzen einige ERV's offene Leserahmen, die für Proteine kodieren.

Über die Vermehrungsprozesse der Reinfektion, Retrotransposition und Komplementation in *trans* konnten sich die endogenen Retroviren in den Genomen der Mammalia ausbreiten [Boeke und Stoye, 1997]. Alle drei Mechanismen der Proliferation sind in Abbildung 9 dargestellt. Reinfektion bedeutet den Wiedereintritt der Nachkommen endogener replikationsaktiver Retroviren in die Keimbahn eines Organismus. Voraussetzung für diese Form der Proliferation ist ein funktionelles Hüllprotein, welches den Wiedereintritt in die Keimbahnzellen bedingt. Ob das reintegrierte Virus direkt einer Keimbahnlinie entspringt oder nach der Infektion einer somatischen Zelle in die Keimbahn gelangt, ist dabei unerheblich. Exogene Phasen sind von großem Vorteil für die Erneuerung der Virus-Fitness, die durch anhaltenden Selektionsdruck beeinträchtigt wird [Bannert und Kurth, 2006].

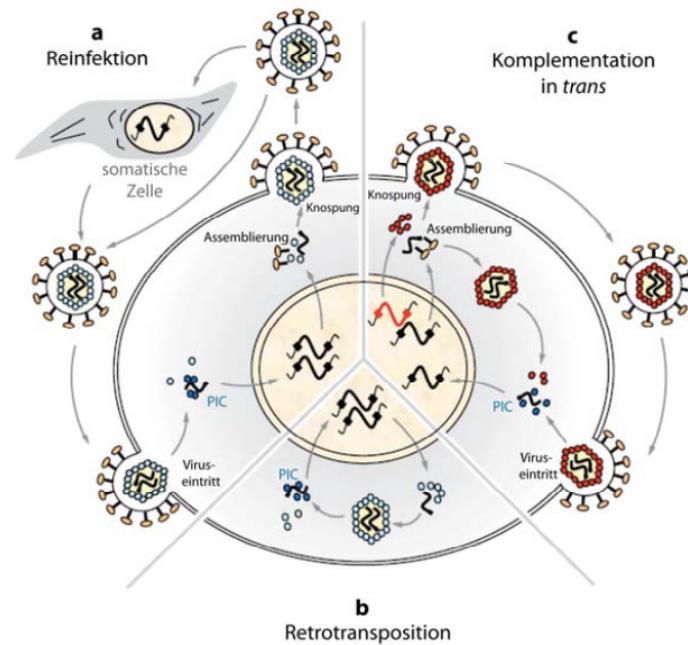


Abbildung 9: Mechanismen der Proliferation bei endogenen Retroviren. Die Vermehrungsprozesse Reinfektion (a), Retrotransposition (b) und Komplementation in *trans* (c) sind im Abschnitt 1.6 eingehend erläutert. Abbildung aus Bannert und Kurth, 2006 (verändert).

Endogene Retroviren können auch über die Retrotransposition amplifizieren. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bei dem Vermehrungsprozess weitgehend unbekannt, es sind jedoch zwei Hypothesen postuliert. Bei dem „Random Template Model“ sind alle Elemente einer ERV-Linie in der Lage zu amplifizieren. Im Gegensatz dazu können sich bei dem „Master Gen Model“ nur einzelne als „Master-Gene“ bezeichnete aktive Elemente vervielfältigen [Deininger und Batzer, 2002]. Diese bleiben über einen langen Zeitraum funktionell und setzen lediglich inaktive Kopien frei. Abschließend ist die Komplementation in *trans* als Proliferationsprozess beschrieben. Mit Hilfe eines „Helfer-Virus“, das Proteine bereitstellt, können die ERV's Partikel bilden, um über die Reinfektion oder Retrotransposition zu proliferieren. Dieser Amplifikationsprozess kann zur Entstehung von Chimären beitragen. Beispielsweise gilt das *Pavian endogene Retrovirus* (BaEV) als Chimäre, so beinhaltet das BaEV-Provirus, neben dem *env*-Gen des *Affen endogenen Retrovirus* (SERV), den *gag-pol*-Bereich des *Steppenpavian endogenen Retrovirus* (PcEV) [Mang *et al.*, 2000].

Taxonomisch lassen sich ERV's wegen ihrer Ähnlichkeit mit exogenen Retroviren wie folgt unterteilen. Typ-I Viren sind verwandtschaftlich sehr eng mit den exogenen γ - und ϵ -Retroviren verknüpft. Typ-II

ERV's sind hingegen mit β -, δ - und Lentiviren verwandt, während die Typ-III Viren die größte Ähnlichkeit mit den Spumaviren aufweisen.

Einige endogene Retroviren können infektiöse Viren bilden, so kommt z. B. das *Koala Retrovirus* (KoRV) als replikationskompetentes Volllängen-Provirus im Koala-Genom vor. Sequenzvergleiche des KoRV-Provirus mit anderen Retroviren zeigten eine große Ähnlichkeit zum exogenen *Gibbonleukämievirus* (GALV) auf. Daher scheint ein jüngst vollzogener „Artensprung“ wahrscheinlich [Hanger *et al.*, 2001]. Darüber hinaus ist die Prävalenz des Virus in australischen Koalabären unterschiedlich ausgeprägt. In Nordaustralien wiesen alle untersuchten Tiere endogene KoRV's auf, während südaustralische Tiere diese nicht in ihrem Genom enthielten. Dies lässt vermuten, dass der Prozess der Endogenisierung bei den Koalabären in vollem Gange ist [Tarlington *et al.*, 2006 und 2008].

Endogene Retroviren sind in der Lage, Tumorerkrankungen zu induzieren. So verursacht JRSV Lungenkarzinome in Schafen und MMTV löst bei Mäusen Mammakarzinome aus [Bittner, 1936; Palmarini *et al.*, 1999].

1.7 Humane endogene Retroviren

Im Rahmen der systematischen Sequenzierung des humanen Genoms im Jahr 2001 durch das „Human Genom Sequencing Consortium“ wurde ermittelt, dass 8% des menschlichen Genoms aus endogenen Retroviren oder LTR-Elementen bestehen [Lander *et al.*, 2001]. In Abbildung 10 ist die Endogenisierung einiger HERV-Elemente im Laufe der Primatenevolution gezeigt.

Der Integrationszeitpunkt der humanen endogenen Retroviren (HERV) variiert stark zwischen den einzelnen Viren (Abbildung 10). Neben Stammbaumanalysen wird das Alter eines HERV-Provirus über den Vergleich beider LTR's bestimmt. Zu Beginn der Integration sind beide identisch. Allerdings können pro Jahr Mutationen mit einer Rate von $2,3 \times 10^{-9}$ bis 5×10^{-9} in ein HERV-Element eintreten, das entspricht einem Basenaustausch in einem LTR-Bereich alle 200.000 bis 450.000 Jahre [Johnson *et al.*, 1999]. Je länger der Integrationszeitpunkt zurückliegt, umso größer sind die Abweichungen der LTR's zueinander. Erste Retroviren sind wahrscheinlich schon vor 60 bis 70 Millionen Jahre in die Genome der Primaten integriert [Tristem, 2000]. Sogar noch älter sind Fragmente HERV-L verwandter Elemente, welche evolutionäre Intermediate aus Retrotransposons und Retroviren darstellen.

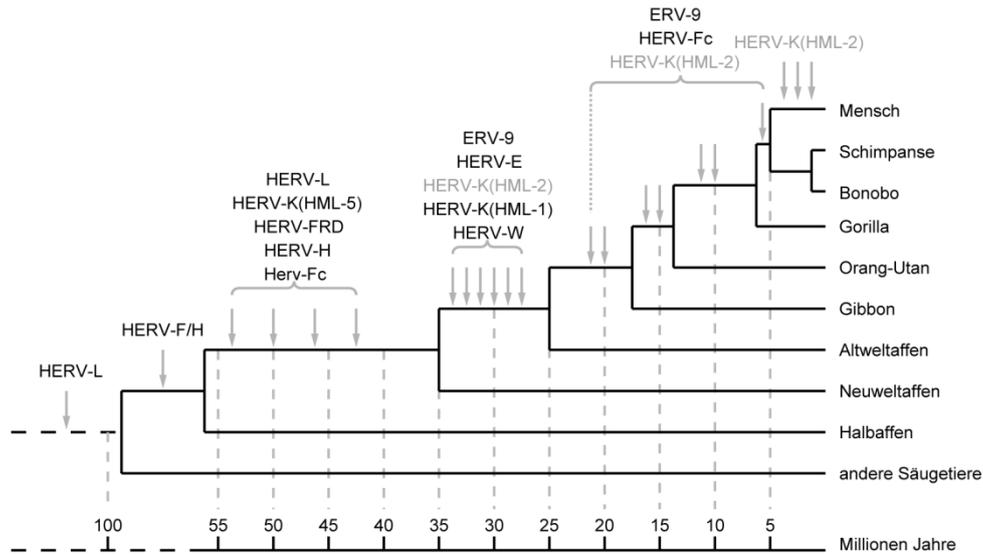


Abbildung 10: Endogenisierung diverser HERV-Familien im Laufe der Primatenevolution. Die HERV-K(HML-2)-Familie ist grau hervorgehoben. Altersbestimmungen aus Enard und Pääbo, 2004. Abbildung nach Bannert und Kurth, 2006 (modifiziert).

Die endogenen Retroviren der Menschen umfassen mindestens 31 monophyletische Familien. Als größte Gruppe umspannt die HERV-H-Familie bis zu 1300 Vollängen-Kopien [Katzourakis *et al.*, 2005]. Die systematische Nomenklatur der endogenen Retroviren beruht auf der Spezifität der zellulären tRNA, die als Primer bei der Initiation der RT dient. Beispielsweise erhält die HERV-K-Familie ihren Namen durch die an der Primerbindestelle gebundene, Lysin-tragende tRNA. Der Name wird hierbei nach dem Einbuchstabenkode der Aminosäuren (Lysin=K) vergeben [Larsson *et al.*, 1989]. Weitere namensgebende Merkmale können Kosmid- oder Klontnamen sowie beliebige Labornamen sein.

1.7.1 Biologische Bedeutung der humane endogenen Retroviren

Endogene Retroelemente beeinflussen aufgrund ihrer hohen Anzahl und homogenen Verteilung im humanen Genom sowie ihrer funktionellen Regulationselemente die Genexpression des Wirtes. Beispielsweise wirkt sich die *in vivo* Promotoraktivität der HERV-K(HML-2) LTR's auf die nicht-repetitive DNA-Transkription aus, was die Expression benachbarter Gene zur Folge haben kann [Buzdin *et al.*, 2006]. Viele HERV „long terminal repeats“ besitzen Interaktionsdomänen für p53-Regulatoren. Als Folge daraus stellen sie über 30% aller p53-Bindestellen im Genom und erweitern als regulatorische

Sequenzen das p53-Transkriptionsnetzwerk [Wang *et al.*, 2007; Kurth und Bannert, 2010]. Auch eine Schutzfunktion der endogenen retroviralen Proteine gegen die Infektion von pathogenen, exogenen Retroviren ist postuliert. So stellten Ponferrada und Kollegen im Jahr 2003 einen Zusammenhang zwischen dem Einbau eines HERV-W Env-Proteins in die Zellmembran und einer signifikanten Verringerung der Infektionsrate mit dem avianen δ -Retrovirus *Milz-Nekrosevirus* (SNV) her. Dieses Phänomen ist auch für weitere Viren in der Tierwelt bekannt, beispielsweise inhibiert die endogene Expression des Superantigens (SAg) von MMTV die Infektion von MMTV des gleichen Subtyps in der Maus [Golovkina *et al.*, 1992]. Des Weiteren spielen *env*-Gene eine wichtige und vorteilhafte Rolle im Wirtsorganismus. Insgesamt sind 16 Proviren mit funktionellen offenen Leserahmen für das Env-Protein nachgewiesen [Bénil et al., 2001]. Große Bedeutung haben hierbei die *env*-Genprodukte von HERV-W und HERV-FRD, die auch als Syncytin-1 und Syncytin-2 bekannt sind. Über ihre Zell-Zell fusogene Aktivität vermitteln sie die Verschmelzung des Zytotrophoblasten mit dem Syncytiotrophoblasten. Daher spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Plazenta. Ebenso wird der immunsuppressiven Wirkung von Syncytin-2 eine Aufgabe bei der Mutter-Kind-Toleranz während der Schwangerschaft zugeschrieben [Blond *et al.*, 2000; Blaise *et al.*, 2003; Mangeney *et al.*, 2007].

Humane endogene Retroviren werden aber auch in Verbindungen mit Autoimmunerkrankungen und Tumorerkrankungen gebracht. Im Fokus der Investigationen zur tumorfördernden Wirkung stehen die Hüllproteine sowie akzessorische Proteine der HERV's. In der Familie der HERV-K(HML-2) kommen zwei putative Onkoproteine, Rec und Np9, vor [Büscher *et al.*, 2005; Denne *et al.*, 2007]. Funktionell ist Rec für den Transport von ungespleißter oder einfach gespleißter viraler mRNA verantwortlich. Unter bestimmten Bedingungen kann Rec eine Transformation von Zellen auslösen, Galli und Kollegen konnten beispielsweise eine Beziehung zwischen der *rec*-Expression in transgenen Mäusen und Keimzelltumoren herstellen. Auch eine Interaktion von Rec und Np9 mit dem zellulären Transkriptionsfaktor „promyelozytisches Leukämie Zinkfinger Protein“ (PLZF) ist beschrieben [Boese *et al.*, 2000; Denne *et al.*, 2007]. Des Weiteren sind Rec und Np9 in der Lage, den transkriptionshemmenden Effekt von PLZF aufzuheben. Dadurch erhöht sich die Synthese des c-Myc-Proteins sowie weiterer „downstream“ regulierter Proteine wie p53. Als Folge treten vermehrte Zellproliferationen und reduzierte Apoptose-Ereignisse auf. Ein weiteres Indiz für das tumorigene Potential von Np9 ist die Tatsache, dass in über 50% aller untersuchten Tumorzelllinien sowie in Biopsien von Primärtumoren, Seminomen, Mammakarzinomen und Lymphozyten von Leukämiepatienten *np9*-mRNA detektiert werden konnte [Armbruster *et al.*, 2002]. Neben den beiden akzessorischen Proteinen beeinflusst die tumorsuppressive Funktion von Env die Entstehung maligner

Erkrankungen. In Tumorzellen exprimiert, inhibiert Env eine immunologische Erkennung der Zellen. Als Folge daraus werden die Tumorzellen vom Immunsystem nicht zerstört, wodurch das Wachstum des Tumors gefördert wird. Ferner wurden *env*-Transkripte in Melanomen sowie in Personen mit Mammakarzinomen nachgewiesen [Wang-Johanning *et al.* 2001 und 2003].

Ebenso intensiv wird ein Zusammenhang zwischen HERV's und Autoimmunerkrankungen untersucht. Besonderes Interesse gilt der Entstehung der Multiplen Sklerose (MS), bei der die HERV-W-Familie unter Verdacht steht, involviert zu sein. Beispielsweise isolierten französische Wissenschaftler *MS-assoziiertes Retrovirus* (MSRV)-Partikel mit RT-Aktivität in MS-Patienten. Darüber hinaus wurden erhöhte Mengen von MRSV und HERV-H Partikel sowie deren RNA in MS-Patienten detektiert [Perron *et al.*, 1997; Lindskog *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 2000 und 2002].

1.7.2 Die endogenen Retroviren der Familie K

Erstmals wurde HERV-K in den frühen 1980ern aufgrund der Ähnlichkeit zu MMTV im humanen Genom entdeckt [Callahan *et al.*, 1982]. Die HERV-K Familie wird in verschiedenen Gruppen unterteilt, wobei die Verwandtschaft zu MMTV namensgebend für 11 als humane MMTV-like (HML-1 bis 11) bezeichnete Mitglieder ist. Zwei weitere Gruppen HERV-K(14C) und HERV-K(C4) werden ebenfalls zur Familie gezählt [Bannert und Kurth, 2006; Subramanian *et al.*, 2011]. Bis heute konnten insgesamt über 550 HERV-K Elemente und 6400 einzelne LTRs der HERV-K Familie zugeordnet werden [Mager *et al.*, 2003].

Am besten charakterisiert und untersucht sind die HML-2-Elemente. Die Integration der ersten HERV-K(HML-2) Viren in die Keimbahn früher Primaten erfolgte vor etwa 35 Millionen Jahren, nach der Abspaltung der Linie, die zu den Neuweltaffen führte. Im Anschluss an die erste Keimbahn-Infektion haben wiederholt Proliferationsereignisse stattgefunden, die zur Verteilung der Elemente im Genom des Menschen geführt haben. Bis heute sind 140 HERV-K(HML-2)-Insertionen und 947 Einzel-LTR's bekannt, von denen 15 bis 18 gut erhalten als intakte Proviren existieren. In der HERV-Familie einzigartig zeichnen sich 11 der humanspezifischen HERV-K(HML-2) Proviren durch polymorphe Loci aus. Diese sehr jungen Elemente können als leere Integrationsstellen, Einzel-LTR's, intakte Proviren oder als Duplikation („Tandem-Repeat“) in verschiedenen Individuen vorliegen [Macfarlane und Simmonds, 2004; Mamedov *et al.*, 2004; Subramanian *et al.*, 2011].

Als einziges bisher bekanntes Provirus trägt das HERV-K113-Element vollständig offene Leserahmen für alle Proteine. Turner und Kollegen identifizierten im Jahr 2001 bei der Durchsuchung der humanen RP11-BAC-Bibliothek mit Hilfe einer HERV-K-Polymerase-Gensonde das HERV-K113 Provirus [Turner *et al.*, 2001]. Das polymorphe Provirus ist integriert auf dem Chromosom 19p13.11, allerdings nur bei einem bestimmten Prozentsatz der Bevölkerung [Turner *et al.*, 2001, Moyes *et al.*, 2005, Beimforde *et al.*, 2007]. Besonders weit verbreitet ist das Provirus (mit bis zu 30%) in Populationen mit afrikanischer Abstammung. Deutlich geringer fällt die Prävalenz bei Eurasiern aus. Während in Polen etwa 8% aller getesteten Personen Träger dieses Provirus sind, konnten in England nur 4% der Population als Träger ausgemacht werden [Moyes *et al.*, 2005; Krzysztalowska-Wawrzyniak *et al.*, 2011]. Der Ursprung des Virus ist daher auf dem afrikanischen Kontinent zu vermuten. Aufgrund nahezu identischer LTR`s wird das Alter von HERV-K113 auf 600.000 Jahre geschätzt [Turner *et al.*, 2001]. Allerdings ist das Virus nicht in der Lage zu replizieren. Diverse Mutationen in den *gag*- und *pol*-Bereichen verhindern die Fähigkeit zur eigenständigen Replikation [Beimforde *et al.*, 2008; Heslin *et al.*, 2009]. Trotz der Präsenz von replikationskompetenten ERV`s in anderen Vertebraten blieb die generelle Suche nach infektiösen endogenen Retroviren im humanen Genom erfolglos. Es ist jedoch gelungen, zwei schwach infektiöse HML-2-Proviren aus Sequenzvergleichen mit diversen Mitgliedern der Gruppe wiederherzustellen [Dewannieux *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007].

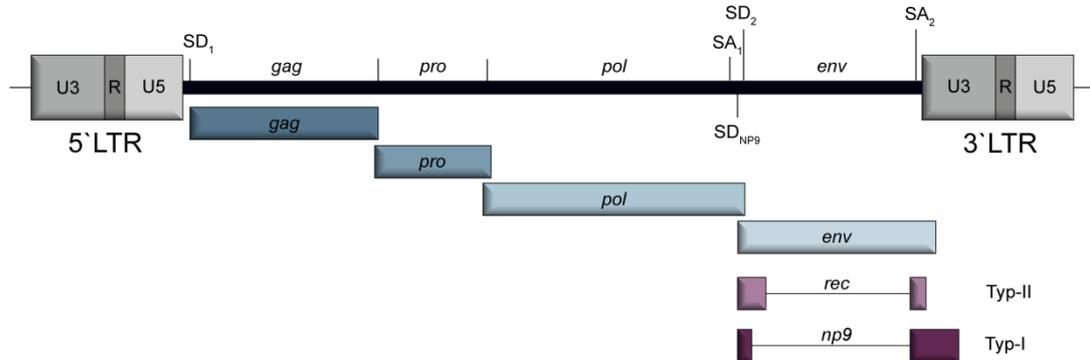
1.7.3 Genomaufbau der HERV-K(HML-2)-Elemente

Der genomische Aufbau der HERV-K(HML-2)-Gruppe ähnelt sehr dem der exogenen Retroviren. Am Beispiel von HERV-K113, eines der am bestuntersuchteten Mitglieds der HERV-K(HML-2)-Gruppe, wird die provirale Struktur nachfolgend näher erläutert.

Das Provirus von HERV-K113 besitzt eine Länge von ca. 8,9 kb und wird von den LTR`s flankiert (Abbildung 11). Die HERV-K113 mRNA enthält überlappende offene Leserahmen zur Synthese der *gag*-, *pro*- und *pol*-Gene. Wie bei den β -Retroviren üblich entstehen bei der Translation drei Gag-Vorläuferproteine (Gag-/Gag-Pro-/Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteine). Voraussetzung für die Synthese der Gag-Pro- und Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteine ist die Verschiebung des ribosomalen Leserasters um -1 bp in den Übergangsbereichen *gag-pro* und *pro-pol* [Wang *et al.*, 2002]. Dabei findet die Verschiebung in Bereichen statt, die als Slippery Sequenzen deklariert sind. Es handelt sich hierbei um Heptanukleotidfolgen mit der typischen Sequenz XXXYYZ [Jacks *et al.*, 1988]. Sechs bis neun

Nukleotide weiter sitzen Pseudoknoten, die das translaterende Ribosom stoppen bzw. verlangsamen, um so die Effizienz der Leserasterverschiebung zu erhöhen [Tuerk *et al.*, 1992; Somoyogi *et al.*, 1993].

(A)



(B)

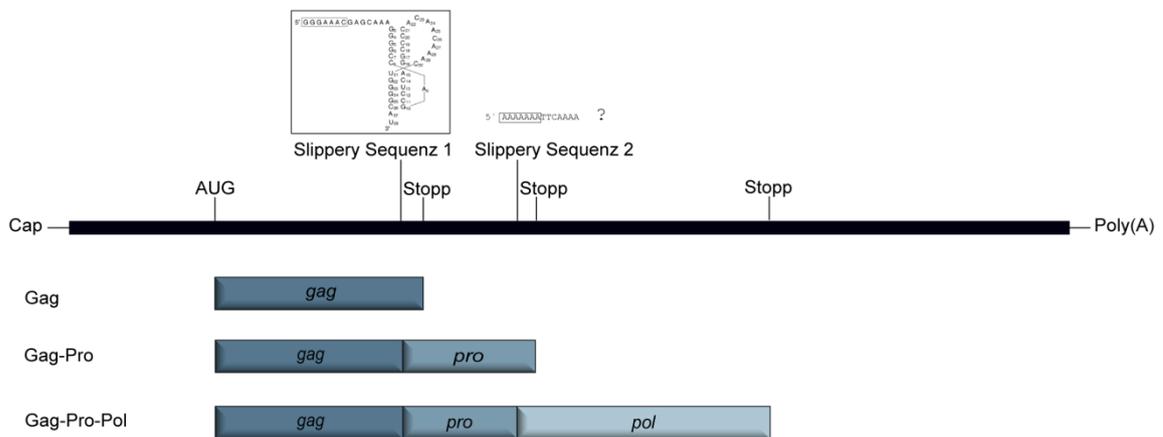


Abbildung 11: Genomorganisation der HERV-K(HML-2)-Gruppe. A: Typischer Aufbau eines integrierten HERV-K(HML-2)-Elements. Spleißdonor- (SD) und Spleißakzeptorstellen (SA) sind ausgewiesen. Weiterhin sind die durch das Spleißen akzessorische Proteine Np9 (Typ-I Proviren) und Rec (Typ-II Proviren) aufgeführt. Die spezifische Spleißdonorstelle des Np9-Proteins (SD_{NP9}) ist gesondert gekennzeichnet. B: Schematische Abbildung der VollängenmRNA eines HML-2-Elements sowie der durch die Translation hervorgehenden Gag-Vorläuferproteine. Abbildung der HERV-K Slippery Sequenz 1 und der Struktur des Pseudoknoten (eingerahmt) aus Wang *et al.*, 2002.

Zum Leserasterschub kommt es selten, häufig endet die Proteinsynthese mit einem Translationsstopp, wodurch nur Gag-Vorläuferproteine gebildet werden. Gelingt hingegen der Leserasterschub um -1 an der ersten Slippery-Stelle, bricht die Translation häufig durch ein Stopp-Codon im Protease-Bereich ab.

Nur in sehr geringem Maße kommt es zur Synthese des Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteins. Dafür ist ein -1 Sprung an der 2. Slippery Sequenz des Ribosoms in den Leseraster des *pol*-Gens notwendig. Während die Slippery Sequenz und der Pseudoknoten im *gag-pro*-Übergangsbereich eingehend untersucht und charakterisiert sind, fehlen die Konsensussequenzen im *pro-pol* Bereich. Trotzdem konnte durch Mutationen in beiden Bereichen gezeigt werden, dass die Verschiebung der Leseraster und damit die Verhältnisse der Gag-Vorläuferproteine zueinander zwingend notwendig zur Produktion intakter Viruspartikel sind [Diplomarbeit Claudia Chudak, Robert Koch-Institut].

Am 3'-Ende des *pol*-kodierenden Bereichs ist der *env*-Leserahmen kodiert. Hier befindet sich auch die Spleißakzeptorstelle (SA₁), die für die Bildung des Env-Proteins notwendig ist. Die Synthese der Hüllproteine erfolgt von einem unvollständig gespleißten Transkript. Zusätzlich ist eine weitere 1,5 kb große „*hel*“-Spleißvariante vorhanden, deren Funktion bisher aber ungeklärt ist.

Im humanen Genom sind zwei verschiedene Typen von HERV-K(HML-2) Proviren integriert (Abbildung 11, A). Typ-II Viren besitzen im spezifischen *env*-Abschnitt (beispielsweise von HERV-K113), eine Spleißdonorstelle (SD₂) zur Generierung zweier Exons des Rec-Proteins. Dagegen verfügen Typ-I Viren über eine Deletion von 292 Nukleotiden im *env*-Gen. Zudem besitzt dieser Typ fusionierte *env*- und *pol*-Gene [Löwer *et al.*, 1993]. Als akzessorisches Protein konnte ein Protein mit einer Masse von 8,7 kDa, das als Np9 bezeichnet wird, identifiziert werden [Armbreuster *et al.*, 2002]. Die Typ-I Viren haben daher eine zusätzliche, spezifische Spleißdonorstelle SD_{Np9}.

1.7.4 Die Hauptstrukturproteine der HERV-K(HML-2)-Elemente

Wie bei allen Retroviren werden die Untereinheiten des Gag-Proteins der HERV-K(HML-2)-Elemente auf einem 74 kDa großen Vorläufer synthetisiert. Bei der Reifung der Virionen spaltet die virale Protease den Gag-Vorläufer proteolytisch in die MA-, p15-, CA- und NC-Einheiten. Am N-terminalen Ende des Gag-Proteins befindet sich die MA-Domäne, bei der nach erfolgreicher Prozessierung ein 15,3 kDa schweres Protein entsteht. Das zur Bildung des späteren Viruskapsid essentielle CA-Protein besitzt als größte Domäne im Gag-Vorläufer eine molekulare Größe von 27,7 kDa. Das reife 10 kDa NC-Protein enthält zwei Zinkfinger-Motive, vermutlich zur Bindung des ψ -Verpackungssignals an das virale RNA-Genom, wie bei exogenen Retroviren (z.B. HIV-1) bereits beschrieben. Interessanterweise zeigte sich, dass wie bei den verwandten β -Retroviren MMTV und MPMV, weitere kleinere Domänen zwischen der MA- und der CA-Einheit lokalisiert sind. So identifizierten George *et al.* im Jahr 2011 ein

direkt am C-terminalen Ende der MA-Domäne liegendes, 14 Aminosäuren langes SP1 („spacer peptid“-Polypeptid. Ähnliche Zwischenpeptide an analogen Positionen in anderen Retroviren fungieren als Regulatoren, die den Reifungsprozess der Virionen beeinflussen [Hizi *et al.*, 1989; Henderson *et al.*, 1985; Cameron *et al.*, 1992]. Eine solche regulatorische Aufgabe wird daher auch für das im HERV-K113 Genom lokalisierte SP1-Protein angenommen [George *et al.*, 2011]. Stromabwärts vom SP1 befindet sich ein Protein mit einer molaren Masse von 15 kDa, dass als p15 bezeichnet wird. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde in diesem Protein ein PTAP-Motiv identifiziert [Diplomarbeit Claudia Chudak; Robert Koch-Institut]. Weiterhin sind zwei glutamin- und prolinreiche Peptide entdeckt worden, die am C-Terminus des Gag-Proteins lokalisiert sind [George *et al.*, 2011]. Bisher konnte jedoch die Funktion der 42 Aminosäuren umfassenden QP1- und QP2-Peptide nicht geklärt werden. In Abbildung 12 ist der Aufbau des Gag-Vorläuferproteins zusammenfassend dargestellt.

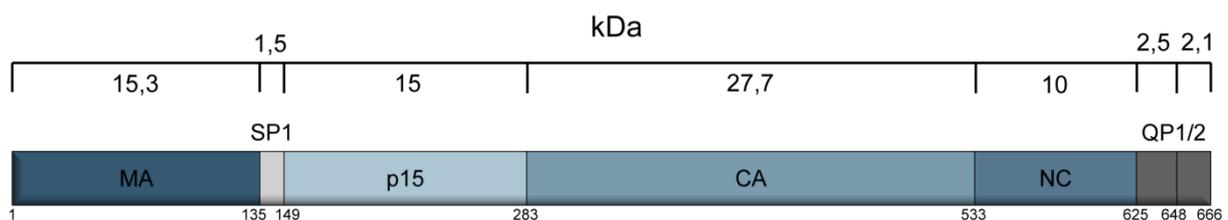


Abbildung 12: Struktur des Gag-Proteins. Der Gag-Vorläufer (hier von HERV-K113) wird proteolytisch von der Protease in die Untereinheiten Matrix (MA), „spacer Peptid“ (SP1), p15, Kapsid (CA), Nukleokapsid (NC) und QP1/2 prozessiert. Die Molekulargewichte der einzelnen Proteine sind oberhalb angegeben. Die Zahlen unterhalb der Proteine kennzeichnen die Anzahl der Aminosäuren, beginnend mit dem Methionin der MA-Domäne.

1.7.5 Rekonstruktion eines originalen HERV-K113-Elements als Modellsystem zur Untersuchung von Proteinfunktionen

Aufgrund der Tatsache, dass erste HERV-K-Elemente sehr früh ins Genom von Primaten integrierten, führten im Laufe der Evolution viele postinsertionale Mutationen zum Verlust der Replikationskompetenz aller bisher identifizierten HERV-K-Mitglieder. Allerdings sind einige HERV-K(HML-2)-Elemente wegen ihres geringen evolutionären Alters besser erhalten und HERV-K113 besitzt sogar offene Leserahmen für alle viralen Gene. Trotz dieser Eigenschaften führen auch bei diesem Element Basenaustausche und Mutationen, vor allem in den *gag*-, *env*- und *RT*-Bereichen, zur Inaktivierung der Gene. Weiterhin ist

die Expression viraler Proteine bzw. virusähnlicher Partikel der nativen HERV-K113 Sequenz in transfizierten Zellen sehr gering. Daher ist die Detektion und somit Charakterisierung der Proteine bzw. Partikel äußerst schwierig [Turner *et al.*, 2001; Beimforde *et al.*, 2008; Heslin *et al.*, 2009]. Beispielsweise werden die Hüllproteine der K113-Elemente nur äußerst schwach in Säugetierzellen exprimiert und auch ein Einbau in virale Partikel erfolgt nicht [Hanke *et al.*, 2009].

Zur Analyse des Buddings humaner endogener Retroviren K, wurde ein rekonstituiertes oriHERV-K113 Konstrukt als Modellsystem verwendet. Die HERV-K113 Sequenz wurde hierbei so modifiziert, dass sie der zum Zeitpunkt der Integration originalen Sequenz entspricht. Um postinsertionale Mutationen zu identifizieren, wurde die Sequenz von HERV-K113 mit zehn anderen gut erhaltenden HML-2-Mitgliedern (HERV-K101, HERV-K102, HERV-K104, HERV-K107, HERV-K108, HERV-K109, HERV-K115, AP000776, AC025420 und Y17833) abgeglichen (Anhang, Abschnitt 8.2). Eine nicht-synonyme Mutation lag dann vor, wenn kein oder nur ein weiteres Element die gleiche Aminosäure an einer bestimmten Position besaß. Diese erst nach der Integration ins humane Genom entstandene nicht-synonyme Mutation wurde gezielt mit einer Mutagenese revertiert. Alle weiteren Sequenzunterschiede, wenn also zwei oder mehrere HERV-K(HML-2)-Mitglieder dieselbe Veränderung in ihren offenen Leserahmen aufwiesen, wurden als Polymorphismen betrachtet und nicht revertiert [Promotionsarbeit Nadine Beimforde, Kirsten Hanke, Robert Koch-Institut; Hanke *et al.*, 2009; George *et al.*, 2011]. Die 24 postinsertionalen Mutationen des wiederhergestellten, originalen HERV-K113 Genoms sind in Abbildung 13 dargestellt.

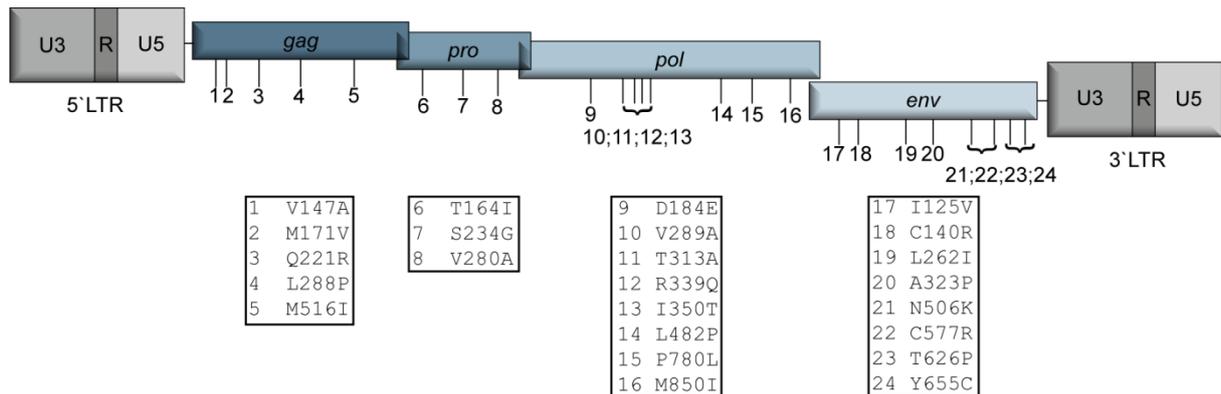


Abbildung 13: Aminosäure-Austausche in den HERV-K113 offenen Leserahmen an den Positionen der identifizierten, postinsertionalen Mutationen. Die Positionen aller 24 revertierten Mutationen sind im oriHERV-K113 Konstrukt eingezeichnet. Darunter sind die Austausche der Aminosäuren in den eingerahmten Kästchen abgebildet.

Anhand der ursprünglichen, rekonstruierten *gag*-Sequenz liegt nun ein intaktes, funktionelles Hauptstrukturprotein vor, welches die Assemblierung und das Budding im Lebenszyklus der Viren zum Zeitpunkt der Integration vermittelte. Mit Hilfe des oriHERV-K113 Konstrukts kann die Implikation der Gag-Proteine humaner endogener Retroviren K während des Budding untersucht werden.

1.8 Zielsetzung

L („late assembly“)-Domänen sind Protein-Interaktionsmotive, deren Dysfunktion zur charakteristisch defekten Knospungssphänotypen führen. Bei diesem Defekt sind die Virionen nicht in der Lage, sich in einem späten Stadium des Buddings von der Plasmamembran der Wirtszelle zu lösen. Drei verschiedene Motive in den Hauptstrukturproteinen können dabei eine Rolle im Replikationszyklus von Retroviren spielen: PT/SAP, YP_x_nL und PPxY. Über Interaktionen mit zellulären Proteinen des ESCRT („endosomal sorting complex required for transport“)-Systems veranlassen sie die Knospung der Retroviren.

Während das Budding für exogene Retroviren sehr gut untersucht ist, ist dieser Prozess des Replikationszyklus bei humanen endogenen Retroviren bisher kaum erforscht. Ziel dieser Promotionsarbeit soll daher die Identifizierung und Charakterisierung von L-Domänen in den Gag-Proteinen endogener Retroviren des Menschen sein. Als Modellsystem dient hierbei ein rekonstituiertes HERV-K113 Konstrukt, dessen offene Leserahmen so verändert sind, dass sie mit der originalen Sequenz zum Zeitpunkt der Integration übereinstimmen. Anhand von Mutationen in den putativen L-Domänen-Motiven soll ermittelt werden, welchen Einfluss diese auf die Assemblierung, das Budding sowie auf die Morphologie der Partikel ausüben. Des Weiteren werden die QP1/2-Peptide auf eine mögliche Rolle in der HERV-K(HML-2) Knospung analysiert, indem QP1/2-Deletionsmutanten generiert werden. Die Untersuchung des Buddings- und Freisetzungsverhalten aller Mutanten soll anhand von RT-Aktivitäts-Messungen und Western Blot-Analysen erfolgen. Weiterhin soll mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie analysiert werden, ob die verschiedenen L-Domänen-Mutanten vermehrt Partikel in späten Buddingstadien aufweisen.

Darüber hinaus soll das Zusammenspiel der L-Domänen mit den zellulären Proteinen der ESCRT-Maschinerie bei dem Zusammenbau entstehender Viruspartikel und der daraus folgenden Knospung eingehend charakterisiert werden. Von besonderem Interesse ist hierbei die Interaktion der Motive mit den Proteinen Tsg101 und Alix, denen bereits eine wichtige Aufgabe bei der Ablösung verschiedener umhüllter Viren zugeschrieben wird. Mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie soll überprüft werden, ob das zelluläre ESCRT-Protein Tsg101 mit den HERV-K Gag-Proteinen in transfizierten HEK-293T-Zellen kolokalisiert. Neben dieser Untersuchung soll ermittelt werden, welchen Effekt eine Tsg101-Überexpression auf das Budding von Partikeln, die Mutationen in den putativen L-Domänen besitzen, ausübt. Analog dazu soll der Einfluss zellulär erhöhter Alix-Konzentrationen auf die Freisetzung der L-Domänen Mutanten untersucht werden. Aus den ermittelten Daten soll ein Modell zum Budding von HERV-K(HML-2) Viren hergeleitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Agfa Curix 60 – Filmentwicklungsmaschine	Agfa – Gevaert, Mortsel, Belgien
Alphaimager 2200 Multimage Light Cabinet	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
CO ₂ -Inkubator C 200 für eukaryotische Zellen	Labotect, Göttingen, Deutschland
Coulter-Counter Z2 – Zellzähler	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Digital Graphic Printer UP-D895	Sony Corporation, USA
DNA Engine Thermocycler	BioRad, Hercules, USA
<u>Gelelektrophoresekammern:</u>	
1. Mini-Protean 3 Electrophoresis	Biorad, Hercules, USA
2. Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System	Biorad, Hercules, USA
Gene Pulser Xcell – Elektroporationsgerät	Biorad, Hercules, USA
Heiz – Kühl – Thermomixer KTMR 133	HLC, Bovenden, Deutschland
Horizontalschüttler GFL 3016	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Hybridisierungsöfen Minidizer HB-500	UVP, Upland, USA
Inkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies, Oak Ridge, USA
Microplate Reader Sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz
<u>Mikroskope:</u>	
1. Inverses Lichtmikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
2. Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 510 META	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
3. Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 780	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

4. Transmissionselektronenmikroskop Tecnai 12	FEI Company, Hillsboro, USA
NanoDrop Spectrophotometer ND-100	Nanodrop, Wilmington, USA
Photometer UV-1202	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Power Pac HC	BioRad, Hercules, USA
Rocking Platform Shakers	VWR, Darmstadt, Deutschland
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Trans Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, Hercules, USA
Transilluminator UV-Licht	BioView, Billerica, USA
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Deutschland
<u>Zentrifugen:</u>	
1. Biofuge	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
2. Multifuge 1 S-R	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
3. Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
4. Ultrazentrifuge Optima L100K	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Antibiotika und Enzyme

Chemikalien, Antibiotika und Enzyme	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	MERCK, Darmstadt, Deutschland
BigDye3.1	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Foster City, USA
DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
dNTP's	Fermentas International Inc, Burlington, Canada
EDTA	Serva, Heidelberg, Deutschland

Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FKS (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gene Ruler 1kb Ladder Plus	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Glutaraldehyd (25%-ige Lösung)	TAAB Laboratories, Berkshire, England
Glycerin, 100%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isoton II Diluent	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Magermilchpulver, Sucofin	TSI GmbH & Co.KG, Zeven, Deutschland
Methanol	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 100x	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Pfu-Turbo-DNA Polymerase	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
Protease-Inhibitor-Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Red-Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
SDS	Biorad, München, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
T4-DNA Ligase	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
TEMED	Biorad, München, Deutschland
Tris-HCL	Biorad, München, Deutschland
Triton-X100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Puffer und Medien

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer und Medien

Puffer, Medien	Zusammensetzung/Hersteller
2xHBS (Hepes buffer saline)	5,6 ml 5 M Natriumchlorid, 10 ml 0,5 M HEPES (pH 7,1), 1 ml 0,15 M Na ₂ HPO ₄ , ad 100 ml Aqua bidest.
2xTY-Medium	1 % Bacto-Trypton, 1 % Bacto-Hefe-Extrakt; 0,5 % Natriumchlorid
2xTY-Agar	2xTY-Medium mit 20 g/l Agar
DNA-Ladepuffer, 6 x	10 mM Tris-Acetat; 10 mM EDTA; 10 % (w/v) Ficoll-400 ; 0,4% (w/v) Orange G in H ₂ O
Blockierungspuffer	5 % Magermilchpulver in PBS/1 % Tween
Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM)	Gibco GmbH, Gaithersburgh, USA
Einfriermedium	90 % FKS, 10 % DMSO
LB-Medium	1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Bacto Hefe-Extrakt; 1 % Natriumchlorid; pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/l Agar
Lysispuffer	1 % Triton-X 100, 20 mM Tris (pH 7,7), 150 mM Natriumchlorid
PBS	123 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat; pH 7,0
10 % SDS	(w/v) in Aqua bidest.
1 % Magermilchpulver	1 % Magermilchpulver in PBS
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt; 10 mM Natriumchlorid; 2,5 mM Kaliumchlorid; 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat; 20 mM Glucose
Stripping Puffer	62,5 mM Tris ,pH 6,7, 2%SDS 100 mM β-Mercaptoethanol;
TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA; pH 7,2 in Aqua bidest.
Transferpuffer	2,5 mM Tris, 19,2 mM Glycin, pH 8,3 20 % Methanol
Trypsin/EDTA	0,25 % Trypsin, pH 7,2; 0,2 % EDTA

Western Blot-Proben Puffer, 4x	200mM Tris-CL pH 6.8, 8% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 40% Glycerol 400mM DTT
--------------------------------	---

Der Lysispuffer wurde mit den Protease-Inhibitor-Tabletten nach Herstellerangaben komplementiert. LB-Medium und LB-Agar sowie 2xTY-Medium und 2xTY-Agar wurden mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) versetzt.

2.1.4 Kits

Tabelle 5: Bezeichnung und Herstellerangaben der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
Endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
HS-Mg RT Activity Kit (Cavidi Assay)	Cavidi AB, Uppsala, Schweden
Luciferase 1000 Assay System	Promega Corporation, Madison, USA
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiaprep® Spin MiniPrep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
Rodeo Sensitive Western Blot Detection	USB, Cleveland, USA
Super Signal West Femto Max. Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Logan, USA

2.1.5 Konstrukte/Vektoren

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Konstrukte und ihrer Vektoren mit Angaben der Bezugsquellen. n.p.: nicht publiziert.

Konstrukname	Vektor	Bezugsquelle/Publikation
WT / oriHERV-K113	pBSK	Nadine Beimforde, n.p.
PAAP	pBSK	Claudia Chudak, n.p.
ΔQP1/2	pBSK	Claudia Chudak/ Anja Zimmermann, n.p.

PAAP_ΔQP1/2	pBSK	Claudia Chudak, n.p.
YPETLKL Mutante	pBSK	Claudia Chudak, n.p.
YPETLKL_PAAP Mutante	pBSK	Claudia Chudak, n.p.
YP(x ₆)L Mutante	pBSK	Claudia Chudak, n.p.
YP(x ₆)L_PAAP Mutante	pBSK	Claudia Chudak, n.p.
YPETLKL_YP(x ₆)L Mutante	pBSK	Claudia Chudak, n.p.
YPETLKL_YP(x ₆)L_PAAP Mutante	pBSK	Claudia Chudak, n.p.
YPD(x ₄)L Mutante	pBSK	Claudia Chudak, n.p.
PAAP_YPD(x ₄)L Mutante	pBSK	Claudia Chudak, n.p.
pGL3-Promoter (firefly Luziferase)	pGI3	Promega Corporation, Madison, USA
oricoGagCherry (GagCherryWT)	pmCherry-N1	Anja Zimmermann, n.p.
GagCherry _{PAAP}	pmCherry-N1	Claudia Chudak, n.p.
Tsg101-F (pcGNM2/Tsg-F)	pcGNM2	Goila-Gaur <i>et al.</i> , 2003
Tsg101-3' (pcGNM2/Tsg-3')	pcGNM2	Goila-Gaur <i>et al.</i> , 2003
Flag-Alix (pCMV-FLAG-ALIX)	pCMV	Votteler <i>et al.</i> , 2009
GFP-Vps4A	pEGFP	Kieffer <i>et al.</i> , 2008
pBSK (pBlueskript SK)	pBSK	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande

2.1.6 Antikörper

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Antikörper mit ihren Bezugsquellen

Konstruktnamen	Spezies	Bezugsquelle/Publication
α-CA Protein HERV-K113	Ratte	Dr. Hohn, Robert Koch-Institut; George <i>et al.</i> , 2011
α-Ratten-IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
α-Aktin	Maus	Cell Signaling Technology, Boston, USA
α-Maus-IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
α-HA	Maus	Cell Signaling Technology, Boston, USA
AlexaFluor® 488 α-Maus-IgG	Ziege	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

2.1.7 Oligonukleotide (Primer)

Alle Primer sind synthetisch hergestellte Produkte der Firma Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA). Zur Durchführung der Mutagenesen, Sequenzierungen und Klonierungen wurden die gefriergetrockneten Primer mit Aqua bidest auf eine Endkonzentration von 100 pmol/µl verdünnt. Eine detaillierte Auflistung aller Oligonukleotidsequenzen sowie deren Verwendung ist im Anhang (Anhang, Abschnitt 8.1) zu finden.

2.1.8 Bakterienstämme

Für die Durchführung der Transformationen wurden die kommerziell erhältlichen Bakterienstämme *Escherichia coli* One Shot Top 10 und Stbl3 von der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA) verwendet.

2.1.9 Software

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Systems Inc., San José, USA
Adobe Photoshop® CS4	Adobe Systems Inc., San José, USA
Adobe Reader	Adobe Systems Inc., San José, USA
Berthold Luminometer Analysis Software	Berthold Technologies, Oak Ridge, USA
Clone Manager 9 Professional Edition	Sci-Ed Software, Cary, USA
GraphPad Prism	GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA
iTEM	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland
Microsoft® Office Word 2007	Unterschleißheim, Deutschland
Microsoft® Exel Word 2007	Unterschleißheim, Deutschland
Nanodrop ND-1000 v3.3	Nanodrop, Wilmington, USA
ncbi.nlm.nih.gov	National Center for Biotechnology Information
ZEN 2010b	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Analytik

2.2.1.1 Herstellung elektrokompenter One Shot Top 10 *E.coli*

Zur Herstellung elektrokompenter One Shot Top 10 *E.coli* Zellen wurden gekaufte Top 10 *E.coli* (Invitrogen) auf einer 2xTY-Platte ausgestrichen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden einzelne Kolonien der Platte gepickt und in 10 ml 2xTY-Medium angeimpft. Am nächsten Tag sind je 2,5 ml der Übernachtskultur auf vier Kolben mit Schikane und vorgelegten 250 ml 2xTY-Medium verteilt worden. Bei 37°C wurden die Tagkulturen so lange geschüttelt, bis im Photometer UV-1202 eine optische Dichte von 0,6 bis 0,8 gemessen werden konnte. Anschließend wurden die Kulturen vereinigt, 15 bis 30 min auf Eis gestellt und danach in vier, mit 0,1 N HCL desinfizierten, Zentrifugationsbecher überführt. Nach einer Zentrifugation bei 3500 g und 4°C erfolgte die Resuspendierung der entstandenen Bakterienpellets mit 250 ml eiskalten 1 mM HEPES. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Im Anschluss wurden die pelletierten Bakterienzellen in 50 ml 1 mM HEPES/10 % Glycerin aufgenommen und erneut für 20 min bei 3500 g und 4°C zentrifugiert. Nach dem restlosen Entfernen des Überstandes konnte das Bakterienpellet in 4 ml eiskaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert werden. Je 55 µl Zellen wurden auf Eppendorfgefäße verteilt und diese nach der Aliquotierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der One Shot Top 10 *E.coli* erfolgte bei -80°C. Zur Bestimmung der Effizienz der Zellen bei einer Elektroporation wurden 55 µl der Top 10 *E.coli* mit 1 pg des puc 19 Vektors transformiert. Nach Aufnahme der gepulsten Zellen in 1 ml SOC-Medium wurden je 50 µl und 100 µl auf LB/Amp-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Klone ausgezählt und die Effizienz der Bakterien nach folgender Formel berechnet werden:

Berechnung der Effizienz der elektrokompenten Zellen

Anzahl der Klone x Verdünnungsfaktor x Umrechnungsfaktor puc Konzentration = Effizienz

$$\begin{aligned} \text{Verdünnungsfaktor} &= \text{SOC-Menge/ausplattierte Menge} \\ \text{Umrechnungsfaktor puc Konzentration} &= 10^6 \end{aligned}$$

Die Effizienz der elektrokompenten Zellen entsprach ca. 1×10^9 pro µg Vektor-DNA.

2.2.1.2 Transformation

Die Vervielfältigung von rekombinanter DNA oder Vektor-DNA *in vivo* erfolgte in Bakterienzellen. Bei dieser Arbeit fanden zwei verschiedene Methoden zur DNA-Transformation Anwendung.

Elektroporation von elektrokompetenten *E.coli*

Elektroporation ist eine Transformationsmethode, bei der DNA über eine permeabel gemachte Zytoplasmamembran in die Zelle eingebracht wird. 55 µl Top 10 *E.coli* Zellen wurden für die Transformation mit 1 µl DNA (5-50 pg) vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt. Über einen kurzen elektrischen Puls bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ohm am Elektroporationsgerät Gene Pulser Xcell erfolgte die Transferierung, der bereits an der Zellmembran angelagerten Plasmid-DNA in die Bakterienzellen. Nach dem Puls wurden die Bakterienzellen in 250-500 µl SOC-Medium aufgenommen und für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Erfolgreich modifizierte Bakterien beginnen in dieser Regenerationsphase mit dem Ablesen der auf dem Vektor kodierenden Antibiotikaresistenzgene. Anschließend wurden die Kulturen auf den Selektion-LB-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin ausgestrichen, um die transformierten Zellen selektiv zu kultivieren.

Hitzeschock-Transformation von chemokompetenten *E.coli*

Bei dieser Methode werden die über CaCl₂ permeabilisierten *E.coli* Stbl3 Bakterienzellen zusammen mit der Plasmid-DNA 40 min auf Eis inkubiert. Die Behandlung mit CaCl₂ bewirkt die Anlagerung der rekombinanten DNA an die Zellmembran, da zwischen der negativ geladenen Plasmamembran und der negativ geladenen DNA weniger abstoßende Kräfte bestehen. Durch einen kurzen Hitzeschock von 45 s bei 42°C gelangt die Plasmid-DNA über entstandene Membranporen in die Bakterienzelle. Eine rasche Abkühlung des Transformationansatzes für 2 min auf Eis verhindert die Umkehrung des Prozesses. Unmittelbar danach wurden 250 µl SOC dazugegeben und die Bakterien für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte das Ausstreichen der Bakterienkulturen auf Selektionsplatten.

2.2.1.3 Plasmidisolierung

Je nach gewünschter DNA-Menge ist zur Plasmidisolierung das Qiaprep® Spin MiniPrep Kit oder das Endo-free Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet worden (Tabelle 5). Zur Gewinnung von 50-500 ng/µl DNA wurden Einzelkolonien in 5 ml LB-Medium, versetzt mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml), bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgte nach Qiagen-Herstellerangaben, basierend auf einer Säulenreinigung. Die Elution der DNA wurde mit 50 µl Aqua bidest vorgenommen. Um höhere Ausbeuten zu erzielen, sind die Plasmide mit Hilfe des Endo-free Plasmid Maxi Kits isoliert worden. 5 ml LB-Medium (komplementiert mit Ampicillin oder Kanamycin) wurden hierfür mit einer Einzelkolonie beimpft und tagsüber zwischen 6-10 Stunden bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Über Nacht wurden die 5 ml Tagkulturen in 250 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz bei 37°C erneut geschüttelt. Auch hier erfolgte die Plasmidisolierung nach Qiagen-Herstellerangaben. Anschließend konnte die DNA in 250 µl endotoxinfreiem Aqua bidest eluiert werden. Zur Überprüfung der isolierten DNA erfolgte ein Kontrollverdau (2.2.1.5) oder die Sequenzierung (2.2.1.9.3) der DNA. Für weiterführende Arbeiten wurde diese bei -20°C gelagert.

2.2.1.4 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der DNA

Die Messung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte mit Hilfe des NanoDrop Spectrophotometers ND-100. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die Adsorption an jeweils 1 bis 2 µl der eluierten DNA gemessen. Die Bestimmung des Koeffizienten aus der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm ermöglichte Aussagen über die Reinheit der gemessenen DNA. Proteinfreie Nukleinsäuren weisen einen Koeffizienten zwischen 1,8-2,0 auf.

2.2.1.5 Restriktion mit Endonukleasen

Mit Hilfe dieser Methode ist die Überprüfung der Identität der aus einer Plasmidisolierung hervorgegangen isolierten DNA möglich, außerdem können spezifische Sequenzabschnitte oder Vektoren für die Generierung neuer Expressionskonstrukte präpariert werden. Palindromartige Sequenzen innerhalb eines DNA-Abschnitt werden dabei von Restriktionsendonukleasen des Typs II erkannt und gespalten. Die verschiedenen Restriktionsendonukleasen (Tabelle 3) wurden nach

Angaben des Herstellers für 1 bis 2 Stunden bei 37°C zur DNA gegeben. Die Qualitätsanalyse der Restriktionsanalyse erfolgte durch anschließende Untersuchung der Ansätze in einer Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.7).

2.2.1.6 Ligation

Um neue Expressionsvektoren zu generieren, sind die zuvor mit Restriktionsendonukleasen gespaltenen DNA-Abschnitte (Inserts) bzw. Vektoren über ihre freien 3'-OH-Gruppen und die 5'-Phosphat-Enden miteinander verknüpft worden. Diese neuen Phosphodiester-Bindungen wurden unter Verwendung von ATP, durch das Enzym T4-DNA Ligase generiert. Bei einer Ligationreaktion wurde jeweils 25 ng Vektor DNA eingesetzt. Die Berechnung der Insert-Menge erfolgte nach der Formel:

Berechnung der Insert-Menge

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} = 125 \text{ [ng]} \times \text{Länge}_{\text{Insert}} \text{ [bp]} / \text{Länge}_{\text{Vektor}}$$

Der Ligationsansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16° C inkubiert, um dann in Bakterienzellen transformiert und auf den Selektion-LB-Platten ausgestrichen zu werden.

2.2.1.7 Auftrennung von Nukleinsäuren über Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von Nukleinsäuren gilt die Agarose-Gelelektrophorese als Standardmethode und ist deshalb für die Größenbestimmung der verwendeten Konstrukte eingesetzt worden [Sambrook *et al.*, 1989]. Die vor allem aus roten Meeresalgen gewonnene Agarose (peqlab Biotechnologie GmbH) wurde je nach Größe der aufzutrennenden DNA auf eine Endkonzentration von 0,8-1,5% in 1xTAE (Tabelle 3) gebracht und mit 0,02 µl/ml Ethidiumbromid versetzt. Zur Analyse wurde den Proben 6xDNA-Ladepuffer zugegeben und diese bei einer Spannung von 40-120 V im elektrischen Feld getrennt. Eine Zuordnung und Größenbestimmung der aufgetrennten Fragmente erfolgte stets durch das Mitführen des Größenstandards Gene Ruler 1 kb Ladder Plus von Fermentas. Anschließend wurden die Agarosegele unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm mit dem Alphaimager 2200 dokumentiert.

2.2.1.8 Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit wurden DNA-Fragmente isoliert und aufgereinigt. Die gewünschte DNA ist hierbei mit einem Skalpell unter dem UV Transilluminator ausgeschnitten und in ein Eppendorfggefäß überführt worden. Die weitere Prozedur erfolgte nach den Herstellerangaben.

2.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient zur Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnitts *in vitro* [Saiki *et al.*, 1985]. Das typische PCRProgramm besteht aus drei sich wiederholenden Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation.

2.2.1.9.1 Mutagenese Polymerase-Kettenreaktion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Aminosäure-Substitutionen und Insertions-Mutagenesen innerhalb der Konstrukte wurde mittels einer *in vitro* Mutagenese eingeführt. Die Generierung der Mutation erfolgte durch Verwendung des QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kits. Über diese Technik können bis zu fünf verschiedene Mutationen in eine Sequenz, während einer PCR-Reaktion eingefügt werden. Zur Mutagenese wurden 35-50 bp lange Primer eingesetzt, deren Zentrum die gewünschten Mutationen trägt. Um eine erfolgreiche Mutagenese zu gewährleisten, sollten die Primer eine Schmelztemperatur T_M von $\geq 75^\circ\text{C}$ aufweisen. Die Schmelztemperatur wird durch folgende Formel bestimmt:

Berechnung der Schmelztemperatur T_M

$$T_M = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%mismatch$$

N = Primergesamtlänge

GC-Gehalt = Anteil der Guanine und Cytosine der Primersequenz

Über die Länge der Oligonukleotide soll sichergestellt werden, dass trotz der veränderten Nukleotidsequenz eine stabile Bindung zur Ursprungssequenz zustande kommt. Als weiteres

Charakteristikum für eine optimale Bindung sollte der GC-Gehalt der eingesetzten Primer mindestens bei 40% liegen. Der Reaktionsansatz sowie die Mutagenese-PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 9 und 10 dargestellt.

Tabelle 9: Mutagenese-Ansatz

Komponente	eingesetztes Volumen/Konzentration
Template-DNA	100 ng
Mutagenese Primer	0,5 µl-1,5 µl (je nach Primerlänge)
QuickChange® Multi, 10x	1x
Reaktionspuffer, 10x	1x
Quick Solution, 25x	1x
QuickChange® Multi enzyme	2,5 Units
dNTP Mix, 25x	1x
Aqua bidest	ad. 25 µl

Tabelle 10: Mutagenese-PCR-Bedingungen

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	1 min	
Denaturierung	95°C	1 min	} 30x
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	65°C	2 min/kb Plasmidlänge	

Bei einzelnen Mutagenesen wurde ein komplementäres Primärpaar verwendet. Über die Pfu-Turbo-DNA Polymerase (Stratagene) wurde das komplette Expressionskonstrukt neu amplifiziert. Nach der Mutagenese-PCR wurde 1 µl Dpn I (10 Units) zum Reaktionsansatz gegeben. Die Dpn I Endonuklease schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA und wurde eingesetzt, um die methylierte, parentale DNA zu verdauen. Die Mutageneseansätze wurden anschließend in elektro- oder chemokompetente Bakterienzellen transformiert und auf Selektions-LB-Platten ausgestrichen.

2.2.1.9.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente zur Selektion von positiven Transformanden, also Bakterienkulturen, die die Plasmid-DNA mit den gewünschten Mutationen tragen [Walker et al., 1993]. Dazu wurden die plasmidtragenden Bakterienzellen direkt als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt. Durch eine initiale Inkubation von 95°C erfolgte die Lysis der Bakterienzellen, so dass die freigesetzte DNA daraufhin direkt in der PCR vervielfältigt werden konnte. Die für die Reaktion verantwortliche „Red-Taq (*Thermus aquaticus*)-DNA Polymerase“ enthält einen inerten roten Marker-Farbstoff, durch den eine Identifikation positiver Kolonien anhand einer Agarose-Gelelektrophorese direkt und ohne Zugabe von DNA-Ladepuffer möglich ist. Positiv getestete Kulturen sind im Anschluss mit Selektionsmedium bei 37°C kultiviert worden, um danach die Plasmid-DNA über Mini-Präparationen zu isolieren. Ein exemplarischer Ansatz sowie die PCR-Bedingungen sind in den folgenden Tabellen dargestellt:

Tabelle 11: Ansatz der Kolonie-PCR

Komponente	eingesetztes Volumen/Konzentration
Template-DNA	1 Kolonie
Forward + Reverse Primer	je 1,25 µl (15pmol)
Reaktionspuffer, 10x	2,5 µl
Red-Taq-DNA-Polymerase	0,25 Units
dNTP Mix	0,5 µl (5pmol)
Aqua bidest	add. 25 µl

Tabelle 12: Kolonie-PCR-Bedingungen

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	0,5 min	} 30x
Annealing	51°C	1 min	
Elongation	72°C	2 min	
Finale Elongation	72°C	7 min	

2.2.1.9.3 Sequenzierungs-PCR nach der Sanger Methode

Für die Ermittlung von Sequenzinformationen wurden die Expressions-Konstrukte und Vektoren mittels Kettenabbruch-Synthese der Sanger-Methode sequenziert [Sanger *et al.*, 1977]. Bei dieser Methode werden Oligonukleotide verwendet, die sich durch eine Länge von 18-25 Nukleotide und einen GC-Gehalt von mindestens 40% auszeichnen (Anhang, Abschnitt 8.1.1). Zur Sequenzierung wurde neben den Sequenzier-Primern ein BigDye-Premix eingesetzt. Dieser BigDye-Premix enthält einen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphat-Mix (ddNTP's) sowie eine *AmpliTaq* DNA-Polymerase. Diese Reaktionsmischung wurde zur direkten Anwendung bei Applied Biosystems (Carlsbad, USA) erworben. Nach Beendigung der Sequenzierungs-PCR (Tabelle 14) wurde diese in 4,8%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen der Nukleotide konnte die Sequenz mit Hilfe eines lasergeleiteten Sequenziergeräts ermittelt werden. Die Sequenzierungen erfolgten im Sequenzierlabor des Robert Koch-Institutes.

Tabelle 13: Sequenzierungs-Ansatz

Komponente	eingesetztes Volumen (Konzentration)
Template-DNA	150-300 ng
Sequenzier-Primer	0,5 µl (10 µM)
Big-Dye®	1-2 µl
ABI-Puffer	1 µl
Aqua bidest	ad. 10µl

Tabelle 14: Sequenzierungs-PCR-Bedingungen (Annealing-Temperatur abhängig von den eingesetzten Primern)

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	96°C	2 min	
Denaturierung	96°C	10 s	} 25 x
Annealing	50°-60°C	10 s	
Elongation	60°C	4 min	

2.2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.2.1 Zelllinien

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten humanen Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe
HEK-293T	embryonale Nierenzellen
SK-Mel13	Melanom
Tera-1	Hoden

Alle verwendeten Zelllinien (Tabelle 15) wachsen als adhärenente Monolayer.

2.2.2.2 Kultivierung verschiedener Zelllinien

Die verschiedenen Zelllinien wurden in DMEM mit 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin und 2 mM Glutamin kultiviert und alle Zellen bei 37°C, 5 % CO₂ Begasung und 98 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank in 75 cm² Zellkulturflaschen gehalten. Bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 80 % wurde das DMEM abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, um tote Zellreste zu entfernen. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA Lösung wurden die Adhäsionsproteine der Zellen abgebaut. Hierdurch konnten die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und homogen resuspendiert werden. Anschließend wurde 9 ml 37°C warmes Medium hinzugefügt und je nach Konfluenz der Zellen 1/10, 1/20 bzw. 1/5 des Medium-Zellgemisches in neue Zellkulturflaschen gegeben und das Gemisch dann mit frischem Medium auf 20 ml aufgefüllt. Auf diese Weise sind die Zellen alle 2-3 Tage kultiviert worden.

2.2.2.3 Lagerung und Auftauen von Zellen

Die langfristige Aufbewahrung der Zelllinien gewährleistete das Einfrieren der Zellen bei einer Konfluenz von 80%. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen, mit Trypsin vom Zellboden abgelöst und bei 300 g abzentrifugiert. Zur Verhinderung der Bildung schädlicher Eiskristalle wurden die pelletierten Zellen in 2 ml Einfriermedium (Tabelle 3) resuspendiert und in Kryo-Röhrchen (TPP/Biochrom, Berlin,

Deutschland) aliquotiert. Um ein schonendes Einfrieren zu garantieren, wurden die Kryo-Röhrchen für 24 h in einen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei -80°C gelagert. Nach Abschluss des Einfrierprozesses sind die Aliquots in flüssigem Stickstoff bei -196°C überführt worden.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen schnell in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt und mit 10 ml PBS vermengt. Um die Zellen kultivieren zu können, wurden diese für 8 min bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt.

2.2.2.4 Zellzahl-Bestimmung

Zellen in Suspension können mit einem automatischen Zellzähler gezählt und somit die für eine optimale Transfektion erforderliche Anzahl an Zellen bestimmt werden. Vor der Zählung wurden die Zellen trypsiniert und in 10 ml PBS resuspendiert. Nach Zentrifugation der Zellen bei 150 g für 8 min wurden diese erneut in 10 ml PBS aufgenommen. Durch Auf- und Abziehen der Suspension mit einer Pipette erfolgte die Vereinzelung der Zellen. $10\ \mu\text{l}$ der Zellsuspension wurden in 10 ml einer isotonischen Lösung verdünnt und mittels Coulter Z2 (Tabelle 2) gemessen. Zur Messung der Zellzahlen sind je nach Zellart und Zellgröße bestimmte Messprofile nach den Angaben des Herstellers (Beckman Coulter) eingerichtet worden. Die Anzahl der Zellen sowie die entsprechenden Volumen des Mediums für die verschiedenen Kultivierungsformen sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Zellzahl, die in verschiedene Kultivierungsformate ausgesät werden

Kultivierungsgefäß	Anzahl der Zellen pro Kultivierungsgefäß	
	HEK-293T	Tera-1
Chamber-Slides (Labo-Tek II)	$2,5 \times 10^5$	-
6-Well Platten	6×10^5	1×10^6
100 mm Schalen	$2,4 \times 10^6$	4×10^6

2.2.2.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Für eine Expression von Proteinen und die Produktion von HERV-K Virionen in eukaryotischen Zellen sind diese mit den verschiedenen generierten Konstrukten transferiert worden. Zwei verschiedene chemische Verfahren kamen hierbei zur Anwendung.

Calciumphosphat-Präzipitation

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung der Plasmid-DNA an ausfallende Calciumkristalle, die im weiteren Verlauf von der Zelle über Endozytose aufgenommen werden. In der Zelle wird die DNA zum Nukleus transportiert, wo sie transkribiert und später translatiert wird. Zur Transfektion wurde die DNA mit Aqua bidest vermischt und anschließend mit 2,5 M Calciumchlorid versetzt und danach das Gemisch vorsichtig über 2x HBS pipettiert. Das so entstandene Calciumphosphat-DNA-Gemisch bildet während einer dreißigminütigen Phase die Calcium-DNA-Kristalle, die dann über die Cytoplasmamembran der transfizierenden Zellen aufgenommen wurden. Für die Transfektion betrug die optimale Konfluenz der adhärenen Zellen zwischen 50-80 %. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Anschließend wurde das Calciumphosphat-DNA-Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben. Acht bis zwölf Stunden nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium erneuert und die Zellen bis zur gewünschten Expressionsstärke der Proteine kultiviert.

Transfektion mittels PolyFect

Eine Transfektion mit diesem chemischen Verfahren geht auf die Bildung von Dentrimeren zurück. Als positiv geladene, stark verzweigte Polymere sind sie in der Lage, Plasmid-DNA zu komplexieren. Die DNA-Dentrimerstrukturen werden dann ebenso wie bei der Calciumphosphat-Präzipitation über Endozytose von der Zielzelle aufgenommen. Zur transienten Transfektion mit dem PolyFect Reagenz wurden je nach Größe des Kultivierungsgefäßes und der Zelllinie unterschiedliche Zellmengen ausgesät (Tabelle16). Die Durchführung dieses Verfahrens erfolgte mit Hilfe des PolyFect Transfection Reagent Kits nach den Qiagen-Herstellerangaben. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen präpariert bzw. die Proteine aus den Zellen extrahiert.

2.2.3 Protein-Analytik

2.2.3.1 Chemische Lyse von eukaryontischen Zellen

Zur molekularbiologischen Untersuchung der rekombinant hergestellten Proteine wurden diese aus den transfizierten Zellen extrahiert. Dazu wurden die Zellkulturüberstände verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Je nach Kultivierungsformat wurden diese anschließend 100 µl (6-well Platte) oder 500 µl (10 cm Schale) Lysispuffer, komplementiert mit Protease-Inhibitor-Tabletten, überschichtet. Nach einer vollständigen Lyse der Zellen, bei der die Zellmembranen, jedoch nicht die Kernmembranen aufgelöst werden, erfolgte die Ablösung der Zellreste vom Zellkulturgefäß mit Hilfe eines Zellschabers. Bei einer Temperatur von 4°C wurden die Zellysate bei 2700 g für 5 min zentrifugiert. Während sich die Zelltrümmer am Boden des Reaktionsgefäßes absetzten, konnte der Proteinüberstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden. Bis zum weiteren Gebrauch wurde das Zellysat bei -20°C eingefroren.

2.2.3.2 Ultrazentrifugation zur Sedimentierung viraler Partikel aus Zellkulturüberständen

Eine Anreicherung von Viruspartikeln aus den Überständen transfizierter Zellen wird durch eine Ultrazentrifugation erreicht. Um die Virussuspensionen von Zellresten zu trennen, wurden diese bei 150 g für 8 min zentrifugiert. Außerdem erfolgte eine Sterilfiltration mit 0,45 µm dichten Filtern zur Entfernung der letzten Zelltrümmer. Um die Pellets nach der Ultrazentrifugation sichtbar zu machen, wurden die filtrierten Überstände mit 40 µl Goldpartikel versetzt und die Proben anschließend vorsichtig in mit 15 ml Sucrose (20 %) gefüllte Ultrazentrifugations-Röhrchen pipettiert. Vor dem Gebrauch der Röhrchen erfolgte deren Reinigung mit 70 %igem Ethanol und ein dreimaliges Waschen mit PBS. Die Ultrazentrifugation der auf Sucrosekissen gebetteten Suspensionen wurde mit der Beckman Optima L (Tabelle 3) für 3 h bei 32.000 rpm vorgenommen. Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig vom Pellet abgenommen und verworfen und dann das mit Goldpartikeln versetzte Viruspellet in 30 µl 0,05 mol/l HEPES resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Zur Quantifizierung der viralen Proteine wurden die Viruspellets im Western Blot-Verfahren analysiert. Die Lagerung der Viruspellets erfolgte bei -20°C.

2.2.3.3 Western Blot-Analyse

Mit Hilfe dieser immunologischen Methode werden bestimmte Proteine oder Protein-Modifizierungen nachgewiesen. Dabei sind über diese Technik bereits geringe, spezifische Proteinmengen (< 2 ng) detektierbar.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zuerst werden die zu untersuchenden Proteine in einem SDS-Gel unter denaturierenden Bedingungen im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt [Laemmli, 1970]. Dabei passieren die Proteine zunächst das Sammelgel (5%), bevor sie ins Trenngel (12%) einwandern. Das Trenngel hat im Gegensatz zum Sammelgel eine höhere Salzkonzentration, eine geringere Porenweite sowie einen höheren pH-Wert. Die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele sind in der Tabelle 17 aufgelistet. Um eine Polymerisierung der Acrylamid-Monomere zu gewährleisten, wurde N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) beigelegt.

Tabelle 17: Zusammensetzung der verschiedenen Trenn- und Sammelgele

	Trenngel 12%	Sammelgel 5
Aqua bidest	3,4 ml	5,7 ml
Acrylamid 30%	4,0 ml	1,7 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	-
0,5M Tris pH 6,8	...-	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurden die Proben mit 4x Western Blot-Probenpuffer nach Laemmli (Tabelle 3) versetzt. Durch Erhitzen des Protein-Probenpuffer-Gemischs für 10 min bei 95°C wurden die Wasserstoffbrückenbindungen der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine unterbrochen. Der Zusatz von Dithiothreitol (DTT) im Probenpuffer reduzierte die Schwefelbrückenbindungen, während eine hohe Konzentration an SDS die Renaturierung der zu

analysierenden Proteine verhinderte und eine uniforme Ladung erzeugte. Die Elektrophorese der Proben im Sammelgel erfolgte bei 100 V. Nachdem die Lauffront der Proben das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 180 V erhöht. Durch das Auftragen eines vorgefärbten Größenstandards bekannter Größe (Page Ruler Prestained Protein Ladder) wurde die Proteinauftrennung kontrolliert und analysiert.

Blotting

Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der getrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran, die Proteine werden dann mittels spezifischer Antikörper detektiert. Als Standardverfahren kam ein elektrophoretisches „Semidry“-Verfahren zur Anwendung. Um den Transfer zu ermöglichen, wurden die SDS-Gele 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Parallel inkubierten die PVDF-Membranen 1 bis 2 min in Methanol, um später die zu analysierenden Proteine binden zu können. Der Transfer der Proteine wurde bei einer Spannung von 20 V für 40 min vorgenommen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper inkubierten die Membranen für 1 h im Blockierungspuffer. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der verdünnten primären Antikörper in Blockierungspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Um die ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen 3 x mit PBS/Tween 0,1% gewaschen. Der Inkubations- und Waschvorgang wurde danach für den Sekundärantikörper wiederholt.

Detektion

Anhand einer enzymatischen Kopplung des Sekundärantikörpers mit Meerrettich-Peroxidase („Horseradishperoxidase“, HRP) wurde die Detektion der geblotteten Proteine durch die Erzeugung von Chemilumineszenz mit dem Rodeo Sensitive Western Blot Detection oder den Super Signal West Femto Max. Sensitivity Substrate Kits (Tabelle 5) vorgenommen. Über die Schwärzung eines Röntgenfilms (X-Ray Retina, Fotochemische Werke Berlin GmbH) war die Reaktion sichtbar, wobei die Stärke der Reaktion durch den Auflage-Zeitraum des Röntgenfilms auf die Membran beeinflusst wird.

Rehybridisieren der PVDF-Membranen

Für den Nachweis von Proteinen mit ähnlichen molekularen Größen auf einer bereits verwendeten PVDF-Membran mussten die primären und sekundären Antikörper der ersten Nachweisreaktion entfernt werden. Dazu wurden die Membranen im Hybridisierungssofen Minidizer HB-500 für eine Stunde bei 50°C mit Stripping Puffer inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBS/Tween 0,1% und der Behandlung mit Blockierungspuffer erfolgte eine weitere Inkubierung der Membran mit spezifischen Antikörpern.

2.2.3.4 RT-Aktivitäts-Messung (Cavidi-Assay)

Die Quantifizierung der Reversen Transkriptase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des HS-Mg RT Activity Kits. Das Prinzip dieses Kits setzt sich aus zwei verschiedenen Schritten zusammen: der DNA Synthese sowie der DNA Quantifizierung. In Abbildung 14 ist das Prinzip der RT-Aktivitäts-Messung im Cavidi-Assay dargestellt.

Bei dieser Messung wird neben den zu untersuchenden Zellüberständen ein Reaktionsmix mit Primern und Nukleotiden (BrdUTP) auf eine Reaktionsplatte gegeben. Während der folgenden Reaktion synthetisiert die virale RT einen DNA-Strang. Ein mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierter α -BrdU-Antikörper bindet an dem doppelsträngigen DNA/RNA-Molekül. Durch Zusatz eines kolorimetischen AP-Substrats wird die AP-Aktivität quantifiziert. Die RT-Aktivität der Probe ist dabei proportional zur AP-Aktivität und wird in pg/ml angegeben.

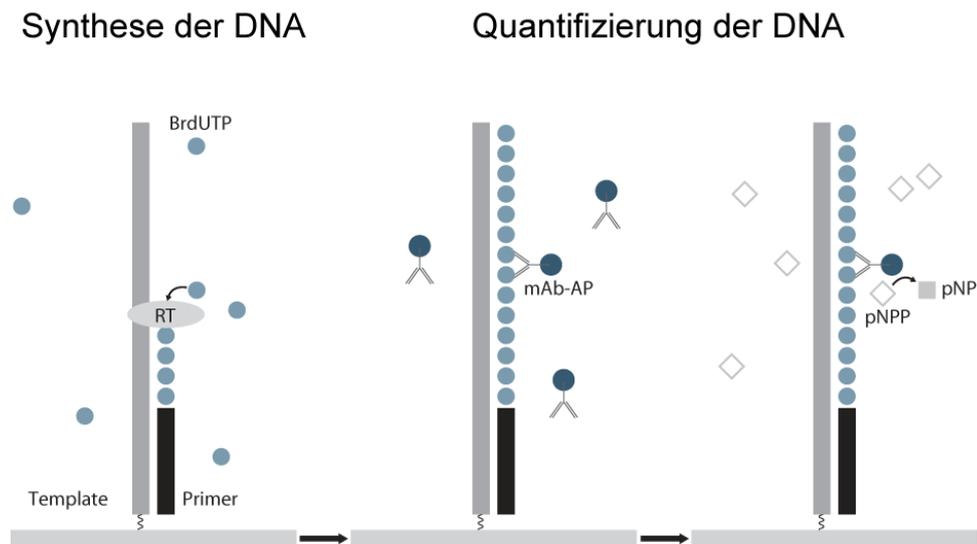


Abbildung 14: Prinzip der RT-Aktivitäts-Messung: Bei der Reaktion synthetisiert die virale RT ein neuen DNA-Strang, bei dem BrdUTP-Nukleotide eingebaut werden. Ein spezifischer alkalischer Phosphatase konjugierter α -BrdU-Antikörper erkennt die Nukleotide und bindet an den neu generierten RNA/DNA-Strang. Über die zusätzliche Zugabe eines kolorimetrischen AP-Substrates wird die Konzentration der alkalischen Phosphatase bestimmt. Die AP-Quantifizierung ist proportional zur RT-Aktivität in der Probe und somit zur Virusmenge. BrdUTP, RT-Substrat; mAb-AP, alkalische Phosphatase konjugierter α -BrdU Antikörper; pNPP, kolomiretisches Substrat für die alkalischen Phosphatase.
(<http://www.cavidi.se/Templates/Cavidi/FileService.axd?id=420&v=1>)

Die Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Cavidi). Zur Detektion der RT-Aktivität wurden je 10 μ l der Zellkulturüberstände eingesetzt, wobei jede Probe über eine Doppelbestimmung untersucht wurde. Statistische Signifikanzen wurden durch den Mann-Whitney-U Test ausgewertet. Signifikanz liegt vor, wenn $p < 0,05$ ist.

2.2.3.5 Luziferase-Assay

Zur Quantifizierung der Zellzahlen und somit zur Normalisierung der im Cavid-Assay erhaltenden Daten wurde die „firefly“-Luziferase in den Zellysaten bestimmt. Luziferasen sind Enzyme, die in Anwesenheit von Luciferin, ATP und Mg^{2+} Licht erzeugen können. Die Lichtproduktion ist bei Überschuss von Substrat proportional zur Luziferase-Menge. Als Reporter gen diente die firefly Luziferase, die den Leuchtkäfern (*Photinus pyralis*) zur Biolumineszenz verhilft. Dem Versuch ging immer die Kotransfektion

des „firefly“-Luziferase Vektors pGL3-Promotors (50 ng pro Transfektionsansatz) mit dem im Cavid-Assay zu analysierenden L-Domänen-Mutanten voraus. Während die Überstände der transfizierten Zellen zur RT-Aktivitäts-Messung eingesetzt wurden, erfolgte die Lysis der Zellen zur Quantifizierung der Luziferase-Menge. Die Präparierung der Zellen erfolgte mit dem Luciferase 1000 Assay System der Firma Promega, wobei hierbei wie auch bei den Einstellungen und der Messung am Luminometer exakt die Vorgaben des Herstellers eingehalten wurden.

2.2.4 Analytische Mikroskopie

2.2.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Um Aussagen über die Morphologie der in den Zellen produzierten Viren und deren Buddingverhalten zu bekommen, wurden diese durch das bildgebende Verfahren der TEM untersucht. Tera-1- und HEK-293T-Zellen wurden in 10 cm Schalen für vier bis fünf Tage nach der Transfektion mit den Expressionsvektoren kultiviert, dann fixiert, entwässert, gehärtet, ultradünn geschnitten und kontrastiert.

Präparation von Probenmaterial

Nach der Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen. Daraufhin folgte die Fixierung der Zellen, um deren Lebensprozesse abzustoppen und Strukturen zu stabilisieren, um sie so für den weiteren Präparationsverlauf vorzubereiten. Als Fixativ wurde 2,5 %iges Glutaraldehyd in 0,05 M HEPES verwendet, das für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben wurde. Im Anschluss wurden die Zellen von dem Zellkulturgefäß gelöst und durch Zentrifugation bei 5000 rpm pelletiert und mit 0,05 M HEPES gewaschen. Durch Zugabe von 3%iger Agarose und einer Zentrifugation für 2 min bei 14000rpm wurde das Zellpellet von dem Agens umschlossen. Eine zusätzliche Inkubation auf Eis hatte zur Folge, dass das Pellet aushärtete und so in kleine Gelstücke geschnitten werden konnte. Über Nacht sind die Gele in Gläschen mit 2,5 %iges Glutaraldehyd in 0,05 M HEPES gelagert worden, um danach für eine Stunde mit Osmiumtetroxid auf einem Drehrad fixiert zu werden. Aufgrund dieser Inkubation kann trotz abgestorbener Zellen die Zellstruktur erhalten bleiben. Zur Entwässerung wurden die Agarosewürfel mit einer Alkoholreihe mit aufsteigender Ethanolkonzentration (30%, 50%, 70%, 96%) behandelt, und anschließend mit Verdünnungen von Epon/Propylenoxyd (1:2, 1:1, 3:1) inkubiert. Die Einbettung

erfolgte danach mit unverdünnten Epon, wobei die Proben im Brutschrank bei 37°C aushärteten. Aus den Harzblöcken wurden nach den Trimmen der Präparate (Entfernung überschüssiger Einbettreste) Dünnschnitte mit einer Schnittdicke von weniger als 100 nm hergestellt. Dazu wurde ein Ultramikrotom (Ultracut S oder UCT) verwendet, wobei die Schnitte über ein Diamantmesser Ultra 45° präpariert wurden. Diese Ultradünnschnitte wurden dann auf die raue Seite der Grids (kleine Objektträger aus Kupfer) übertragen. Eine positive Kontrastierung mit Uranylacetat (UA) steigerte den Kontrast und die Signalabgabe der Proben. Das ist notwendig, da biologische Proben aufgrund ihrer Zusammensetzung normalerweise eine niedrige Streuung von Elektronen aufweisen. Dabei werden die Grids mit UA (2%) für 20 min inkubiert, dann dreimal mit Aqua bidest gewaschen, um für bis zu 3 min mit Bleicitrat Tropfen behandelt zu werden. Nach einem erneuten Waschschrift mit Natriumhydroxid und Aqua bidest mussten die Grids für 15 min getrocknet werden. Bis zur Untersuchung am TEM wurden die Grids bei Raumtemperatur in Gridboxen aufbewahrt.

Analyse der präparierten Proben am TEM

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie werden die Proben im Vakuum mit Elektronen durchstrahlt, so dass eine Aussage über deren Strukturierung möglich ist. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV im Tecnai 12 BioTwin (Tabelle 2) angefertigt, welches mit einer 1,376 x 1,024 Pixel auflösenden CCD-Kamera MegaView III der Firma Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (Hamburg, Deutschland) ausgestattet ist.

2.2.4.2 Immunfluoreszenz-Analyse/konfokale Laserscanning-Mikroskopie (cLSM)

Mit Hilfe dieser Methode sind Proteine über spezifische mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper in der Zelle nachweisbar.

Immunfluoreszenzfärbung

Hierfür wurden HEK-293T-Zellen in „Chamber Slides“ (NUNC, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät (siehe Abschnitt 2.2.2.4), kultiviert und transient transfiziert. Nach einem Zeitraum von einem Tag erfolgte die Fixierung der Zellen mit 800 µl Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde überschüssiges PFA durch dreimaliges Waschen restlos entfernt. Zur intrazellulären Färbung erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 800 µl 0,5% Triton X-100. Um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper zu vermeiden, wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1 ml Blockierungspuffer behandelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubierung der Zellen mit dem primären Antikörper für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit dem Fluoreszenz-Antikörper AlexaFluor® 488 α-Maus-IgG. Bei diesem und allen weiteren Vorgängen wurden die Zellen abgedunkelt. Anschließend wurden die Zellen mit einer verdünnten DAPI-Lösung (0,2 ng/ml) behandelt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Dabei bindet DAPI an doppelsträngige DNA, wodurch die Zellkerne anhand fluoreszierender Komplexe ausgebildet werden. Daraufhin sind die Zellen erneut gewaschen worden, um dann die verbliebene Restflüssigkeit abzunehmen, die Kammern vom Objektträger zu entfernen und die Zellen mit Mowiol einzubetten. Bis zur mikroskopischen Analyse erfolgte die Lagerung der Präparate bei 4°C im Dunkeln.

cLSM

Die Untersuchung der Präparate wurde am konfokalen Laserscanning-Mikroskop LSM-780 vorgenommen. Mit Hilfe der Software Zen2010b sind die Aufnahmen ausgewertet worden.

3 Ergebnisse

Bei vielen verschiedenen umhüllten Viren konnten in den letzten Jahren L-Domänen identifiziert werden, die maßgeblich am Budding und der Assemblierung beteiligt sind. Anhand des Modellvirus HERV-K113 wurden in dieser Arbeit funktionelle L-Domänen-Motive der humanen endogenen Retroviren identifiziert und deren Implikation im Replikationszyklus der Viren untersucht. Da das Gag-Protein als Hauptstrukturprotein den Knospungsprozess von Retroviren steuert, ist gezielt dieses Protein nach den L-Domänen Konsensussequenzen PT/SAP, YP_{x_n}L und PPxY durchsucht worden. Anhand von RT-Aktivitäts-Messungen, Western Blot- und Transmissionselektronenmikroskopie-Analysen wurde die L-Domänen-Aktivität der identifizierten Motive verifiziert. Für das Gag-Protein wurden außerdem zelluläre Interaktionspartner gefunden, die HERV-K113 zum Budding an der Zellmembran benötigt.

3.1 Identifizierung und Charakterisierung der L-Domänen von HERV-K

Auf der Suche nach L-Domänen wurde die gesamte Aminosäure-Sequenz des Gag-Proteins nach putativen Motiven durchsucht. In der p15-Region des HERV-K Gag-Proteins konnte ein PTAP-Motiv ausgemacht werden, welches 100% mit der Konsensussequenz übereinstimmt. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde das PTAP-Motiv hinsichtlich seiner L-Domänen-Aktivität untersucht [Diplomarbeit Claudia Chudak, 2008]. Hierbei wurde auf ein funktionelles HERV-K113-Provirus zurückgegriffen, welches in einem ursprünglichen, zum Zeitpunkt der Integration in das menschliche Genom wiederhergestellten Zustand vorliegt. Zur Wiederherstellung ist die von Turner *et al.* entdeckte Provirus-Sequenz von HERV-K113 (Genbank-Nr.: AY037928) mit anderen hochkonservierten, humanspezifischen HERV-K(HML-2)-Elementen verglichen worden. Insgesamt konnten 24 postinsertionale Mutationen identifiziert und revertiert werden, viele davon waren in der Reversen Transkriptase und im Gag-Vorläuferprotein lokalisiert. Zur Erhöhung der Proteinexpression wurden die einzelnen Gene teilweise codonoptimiert. Der von der Firma GeneArt vorgenommene Austausch der HERV-K-Codons gegen häufig in humanem System vorkommende Codons wurde jedoch nicht in den Übergangsbereichen der Gene sowie am Anfang des Gag-Proteins vollzogen. Eine erhöhte Proteinexpression konnte außerdem durch den Ersatz des viruseigenen Promotor in der 5'LTR mit

einem CMV Promotor erreicht werden. Da dieses CMV_{ori}HERV-K113 Konstrukt sehr artifiziell ist, unterscheidet es sich im Phänotyp aber auch im Proteinverhalten sehr von dem originalen 5'LTR beinhaltenden, nicht codonoptimierten oriHERV-K113 Konstrukt. So sind die CMV_{ori}HERV-K113 Partikel im Durchschnitt 20-40 nm kleiner als die nicht artifiziellen Partikel und besitzen keine env-Proteine auf ihrer Oberfläche. Weiterhin weisen die Partikel kaum RT-Aktivität auf. Aufgrund der sehr artifiziellen Eigenschaften des codonoptimierten Plasmids soll die L-Domänen-Aktivität des PTAP-Motivs in dem oriHERV-K113 Modellsystem überprüft und charakterisiert werden. Außerdem sollen weitere, bisher nicht identifizierte, Motive im Gag-Protein auf ihren Einfluss beim Zusammenbau und der Ablösung der Partikel von der Zellmembran experimentell erforscht werden. Zur Untersuchung des Buddingsverhalten der HERV-K Viren wurde die humane embryonale Nieren-Zelllinie HEK-293T ausgewählt. Diese sehr leicht kultivierbare Zelllinie zeichnet sich durch hohe Transfektionsraten aus, so dass auch die schwach exprimierten Proteine des oriHERV-K113 Konstrukt untersucht werden können. Außerdem wurden in HEK-293T sehr viele Studien über L-Domänen von umhüllten Viren vorgenommen. Deshalb ist in den nachfolgenden Experimenten ausschließlich mit diesem humanem Zellsystem gearbeitet worden.

3.1.1 Ein PTAP-Motiv im p15-Protein fungiert als L-Domäne im HERV-K Budding

Das im Rahmen meiner Diplomarbeit identifizierte PT/SAP-Motiv ist ubiquitär in den Strukturproteinen der umhüllten Viren enthalten. Um zu überprüfen, ob diese Sequenz ebenfalls weitverbreitet in humanen endogenen Retroviren vorliegt, wurden 13 gut erhaltene HERV-K(HML-2)-Typen, HERV-K113 (AY037928), K101 (AF164609), K102 (AF164610), K104 (AC116309), K107 (AF164613), K108 (AC072054), K109 (AC055116), K115 (AY037929), K(C19) (Q9YNA8), AP000776, Y178333, AC025420 und Q9HDB9 untersucht (Abbildung 15).

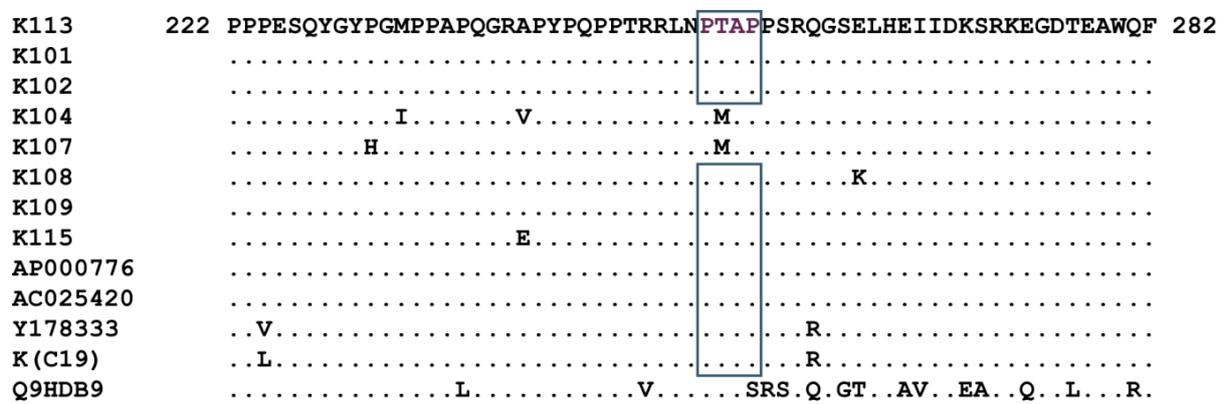


Abbildung 15: Das PTAP-Motiv ist in der HERV-K(HML-2)-Familie weit verbreitet. Zwölf hochkonservierte, humanspezifische HERV-K(HML-2) p15-Protein Teilsequenzen (K101, 102, 104, 107, 108, 109, 115, 3, AC025420, Y17833, K[C19] und Q9HDB9) wurden mit dem C-terminalen Ende des p15-Proteins (222-282 AS) von K113 verglichen. Das PTAP-Motiv ist farbig dargestellt, die blau umrandeten Sequenzen sind intakte nicht mutierte PTAP L-Domänen.

Insgesamt konnte in zehn der überprüften HERV-K(HML-2)-Typen ein intaktes, nicht mutiertes Motiv gefunden werden. Auch in einer im Jahr 2004 von Lavie *et al.* aus 62 proviralen HERV-K(HML-5)-Elementen zusammengesetzten Konsensussequenz, ist ein PSAP-Motiv im Gag-Protein lokalisiert [Lavie *et al.*, 2004].

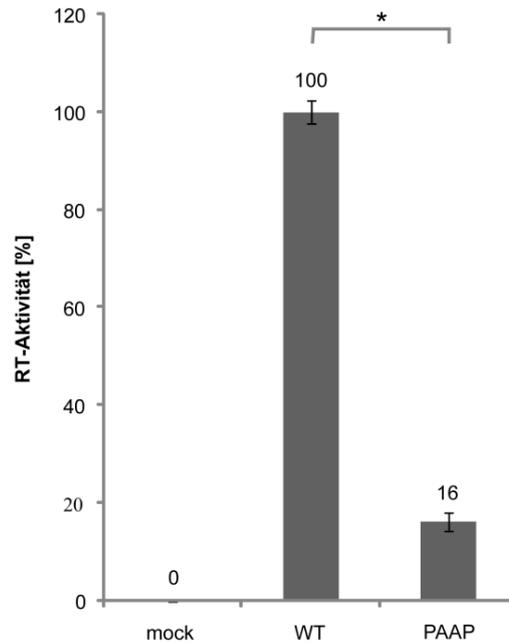


Abbildung 17: Effekt der PTAP-Mutation auf die RT-Aktivität. Die Überstände der Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion im Cavid-Assay analysiert. Der Effekt der PTAP-Mutation auf die RT-Aktivität ist relativ zum Wildtyp oriHERV-K113 gesetzt. Die hier gezeigten Mittelwerte setzen sich insgesamt aus vier Einzelmessungen zusammen. Zusätzlich erfolgte eine Normalisierung bezüglich der Zellzahl, indem die Zellen mit pGL3-Promotor Plasmid kotransfiziert wurden. Anschließend konnte die Luziferase-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt werden. Signifikanztest: Mann-Whitney-U Test; *: $p < 0,05$

Zur Bestätigung dieser Annahme wurden beide Konstrukte durch eine Western Blot-Analyse charakterisiert (Abbildung 18). Zwei Tage nach der Transfektion sind die Überstände steril filtriert und über ein 20%iges Sucrosekissen ultrazentrifugiert worden. Anschließend erfolgte eine Analyse der Zelllysate und der Viruspellets mit Hilfe eines Kapsid-spezifischen Antikörpers. Wie erwartet wies das Wildtyp Viruspellet eine etwa fünffach erhöhte Menge des 27 kDa schweren Kapsidproteins auf. Ebenso war mehr Kapsidprotein im WT-Zelllysate detektierbar, demgegenüber wurde lediglich eine geringe Menge des 74 kDa Gag-Vorläuferprotein nachgewiesen. Das Proteinverhältnis der PTAP-Mutante besaß hingegen eine deutlich ausgeglichene Relation zwischen dem Vorläufer sowie dem Kapsidprotein in den Lysaten. Durch diesen Versuch konnten die durch den Cavid-Assay erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Deutlich ist gezeigt worden, dass im Gegensatz zum Wildtyp nur eine sehr geringe Menge an PAAP Viren aus den Zellen entlassen wird.

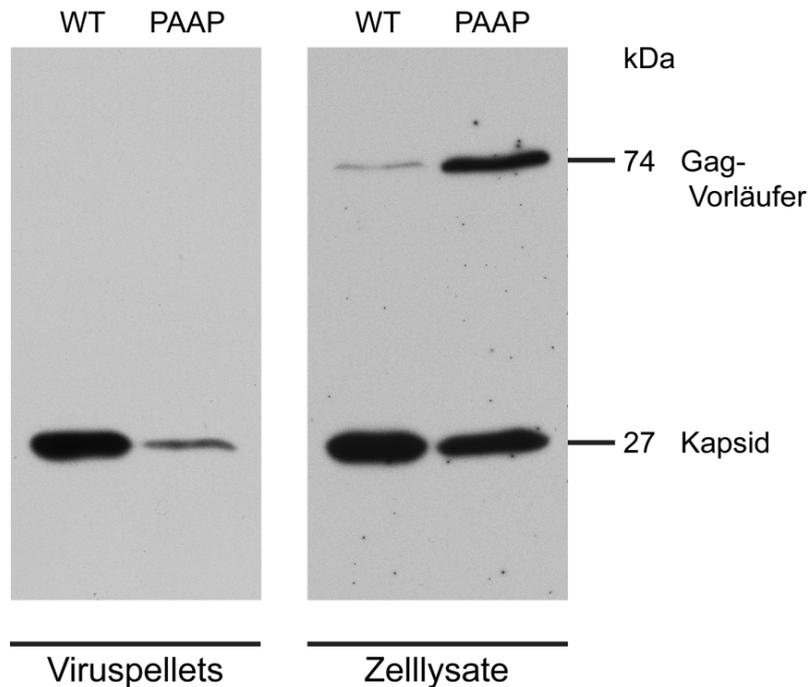


Abbildung 18: Effekt der PTAP-Mutation auf die Gag-Expression. HEK-293T-Zellen wurden mit dem Wildtyp und der PTAP-Mutante transfiziert. Die virushaltigen Überstände wurden durch eine Ultrazentrifugation aufkonzentriert und mit den Zelllysaten auf ein 12% SDS-Gel geladen. Für die Detektion im Western Blot wurde ein α -CA-Rattenserum verwendet.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die PTAP-Mutation tatsächlich einen defekten Assemblierungs- und Buddings-Phänotyp hervorruft. Abbildung 19 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von reifen oriHERV-K113 Virionen, die in HEK-293T-Zellen produziert wurden. Reife HERV-K Viruspartikel zeichnen sich vor allem durch einen elektronendichten, sichtbaren, hexagonalen Core aus, der im Inneren der Viren angeordnet ist (Abbildung 18, Reihe 1, weißer Pfeil). Neben ausgereiften Viren konnten natürlich auch viele unreife WT Partikel detektiert werden, die durch einen elektronendichten Außenring gekennzeichnet sind. Dieser wird durch die noch nicht von der Protease prozessierten Gag-Proteine gebildet. Häufig lagen die unreifen Partikel unterhalb der Plasmamembran oder waren noch mit Membranstücken an der Plasmamembran gebunden. Der Durchmesser der detektierten Partikel betrug im Durchschnitt 120 bis 140 nm. Die Inaktivierung der PTAP L-Domäne hatte großen Einfluss auf die Morphologie der Viruspartikel. Zwar konnten noch einzelne reife Viren nachgewiesen werden, aber der größte Teil der Partikel befand sich in einem unreifen Stadium.

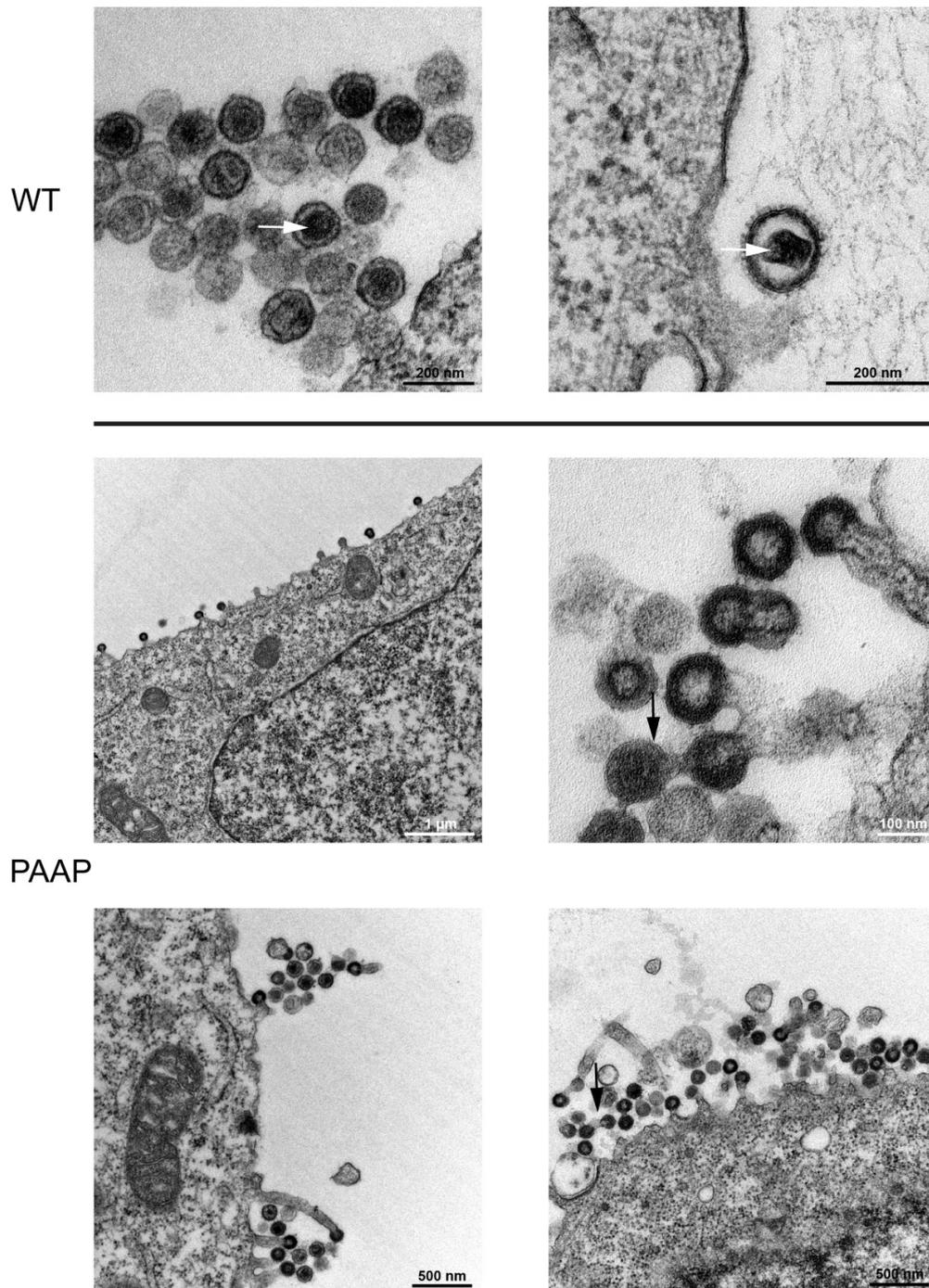


Abbildung 19: Morphologie der WT und PAAP Partikel. TEM-Aufnahmen von oriHERV-K113 (WT) und oriPAAPHERV-K113 (PAAP) DNA transfiziert in HEK-293T-Zellen. Die Fixierung und Einbettung der Zellen erfolgte 4 Tage nach der Transfektion. Oben: Reife, virale WT Partikel, die, für β -Retroviren typisch, ein elektronendichtes sphärisches Kapsid beinhalten (weißer Pfeil). Unten: Aufnahmen von PAAP Virionen. Viele unreife Partikel (elektronendichte Außenhülle) und viele abweichende Buddingstrukturen wie Buddingketten (schwarze Pfeile) konnten detektiert werden.

Wie in Abbildung 18, Reihe 2, linkes Bild zu sehen ist, waren viele der unreifen Prokapside mit der Plasmamembran verbunden und schienen in einem späten Buddingstadium arretiert zu sein. Zusätzlich förderte eine Inaktivierung der PTAP-Sequenz die Bildung anormaler Buddingstrukturen. So waren häufig unreife Prokapside über Membranbrücken miteinander verknüpft (Abbildung 18, Reihe 2 und 3 rechts, schwarze Pfeile). Diese als „Buddingketten“ bezeichneten Strukturen enthielten mehrere Virionen (zwei bis zehn), von denen häufig noch eines mit der Plasmamembran verbunden war.

Um den späten Buddingdefekt der PTAP-Mutanten quantifizieren zu können, wurden zunächst 191 oriHERV-K113 Partikel und 232 oriPAAPHERV-K113 in reife und unreife Virionen unterteilt. Insgesamt waren etwa 40% der beobachteten WT Partikel reife Viren. Demgegenüber konnten sehr viel weniger reife PAAP Partikel (12%) detektiert werden (Abbildung, 20A). Darüber hinaus wurde eine Klassifizierung der unreifen Virionen in unreife freie Partikel, Partikel in einem frühen (weniger als die Hälfte des Prokapsids befindet sich außerhalb der Plasmamembran) oder späten (mehr als die Hälfte des Prokapsids befindet sich bereits außerhalb der Zelle) Buddingstadium und in Buddingketten vorgenommen (Abbildung, 20B). Dabei war bei der PTAP-Mutante ein deutlicher Anstieg der spät buddenden Viren nachweisbar, denn während etwa 30% der Wildtyp Viren in einem späten Buddingstadium arretiert waren, befanden sich 45% der PAAP Partikel in diesem. Außerdem verdoppelte sich die Anzahl der früh knospenden Viren von etwa 2% beim WT auf circa 4% bei der PTAP-Mutante, die Anzahl der Buddingketten verdreifachte sich sogar. So befanden sich etwa 15% aller detektierten PAAP Partikel in über Membranstücke verbundenen Prokapsidketten, während beim Wildtyp nur 5% der Viren in diesen Zustand vorlagen.

Letztendlich konnte gezeigt werden, dass das PTAP-Motiv in der p15-Region des Gag-Proteins eine L-Domänen-Funktion übernimmt. Folglich führt eine Mutation des PTAP-Motivs zu einem defekten Assemblierungs- und Budding-Phänotyp, bei dem die Virionen sich nicht mehr von der Plasmamembran lösen können. Trotz allem konnten vereinzelt reife PAAP Viren detektiert werden. Es ist zu vermuten, dass mindestens eine weitere bisher unbekannte L-Domäne den Buddingprozess von HERV-K steuert.

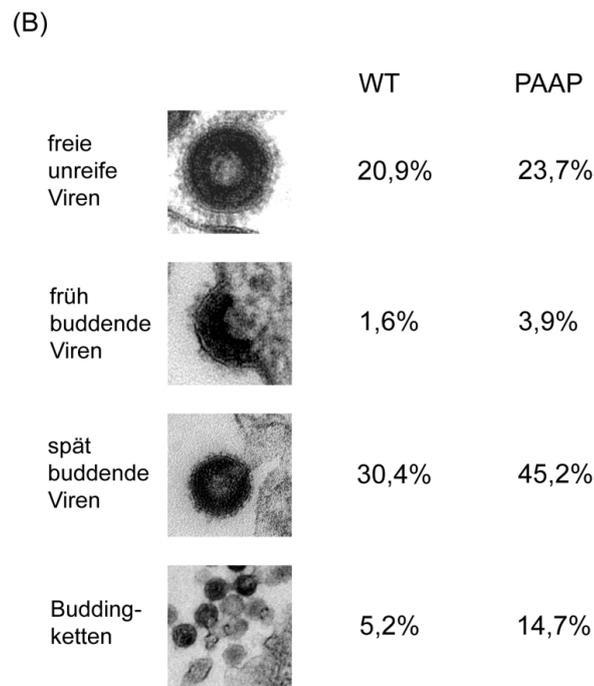
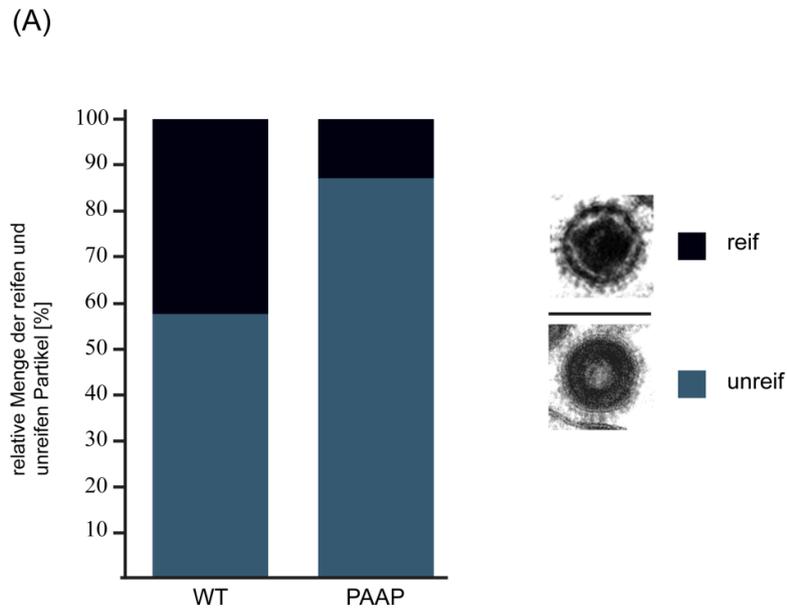


Abbildung 20: Quantifizierung der Buddingstrukturen vom WT und der PTAP-Mutante. HEK-293T-Zellen wurden mit oriHERV-K113-DNA oder oriPAAPHERV-K113-DNA transfiziert. Nach fünf Tagen sind die produzierten Viruspartikel elektronenmikroskopisch untersucht worden. A: Klassifizierung in reife und unreife Partikel. Hierfür sind 191 WT und 232 PAAP Partikel gezählt und in reife und unreife Partikel unterteilt worden. B: Unterteilung der unreifen Prokapside. Die unreifen Partikel wurden zusätzlich in freie unreife, früh und spät buddende Partikel sowie Buddingketten klassifiziert.

Zur Überprüfung dieser Hypothese sind weitere Motive im Gag-Protein identifiziert worden, die an der Knospung des HERV-K113 Modellvirus beteiligt sein könnten. Die putativen YPx_nL L-Domänen sind im Ergebniss-Teil Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4 untersucht worden. Weiterhin könnten die erst kürzlich entdeckten QP1/2-Peptide im Buddingprozess involviert sein. Anhand der Deletion beider Peptide soll ebenfalls überprüft werden, inwieweit diese im Replikationszyklus von HERV-K113 involviert sind. (Ergebnisse, Abschnitt 3.1.2). In Abbildung 21 sind die weiteren, möglichen L-Domänen übersichtlich dargestellt.

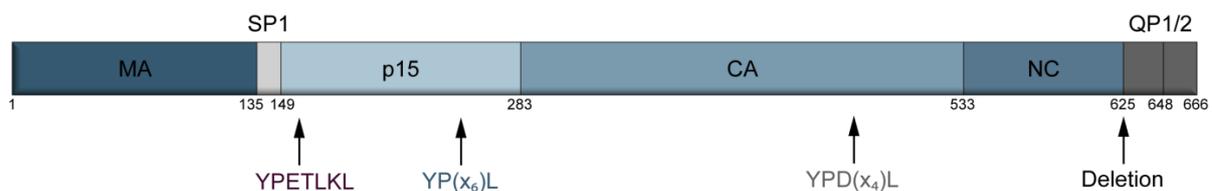


Abbildung 21: Übersicht über weitere, potenzielle L-Domänen-Motive im HERV-K(HML-2). Drei weitere im HERV-K113 Gag-Protein lokalisierte putativen L-Domänen-Motive konnten identifiziert werden. Zusätzlich werden die QP1/2-Peptide deletiert, um deren mögliche Mitwirkung an der Virionen Knospung zu überprüfen.

3.1.2 Die C-terminalen QP1/2-Proteine sind nicht am Budding der HERV-K(HML-2) Partikel beteiligt

Viele Retroviren besitzen kleine C-terminal gelegene Proteine, die L-Domänen-Funktionen beinhalten. So konnte 1991 erstmals eine Region im p6-Protein von HIV-1 nachgewiesen werden, die eine Rolle bei der Virusfreisetzung spielt [Gottlinger *et al.*, 1991]. Auch das *Virus der infektiösen Anämie der Pferde* enthält eine YPDL-Sequenz in der carboxylterminal-gelegenen p9-Domäne des Gag-Proteins [Strack *et al.*, 2003]. Kürzlich wurden ebenfalls in der HERV-K(HML-2)-Sequenz zwei kleine glutamin (Q)- und prolin (P)- reiche Proteine am C-Terminus des Gag entdeckt. Für die als QP1 (23 AS; 2.5 kDa) und QP2 (19 AS; 2.1 kDa) bezeichneten Proteine konnte bisher keine funktionelle Rolle im HERV-K-Replikationszyklus gezeigt werden [George *et al.*, 2011]. Zwar ergab eine Sequenzanalyse, dass keine typischen L-Domänen-Motive vorhanden sind, aber, wie bereits erwähnt, sind die QP1/2-Sequenzen prolinreich. Da alle L-Domänen-Konsensussequenzen Proline enthalten, ist ein Zusammenhang zwischen den Polypeptiden und einer L-Domänen-Aktivität durchaus wahrscheinlich.

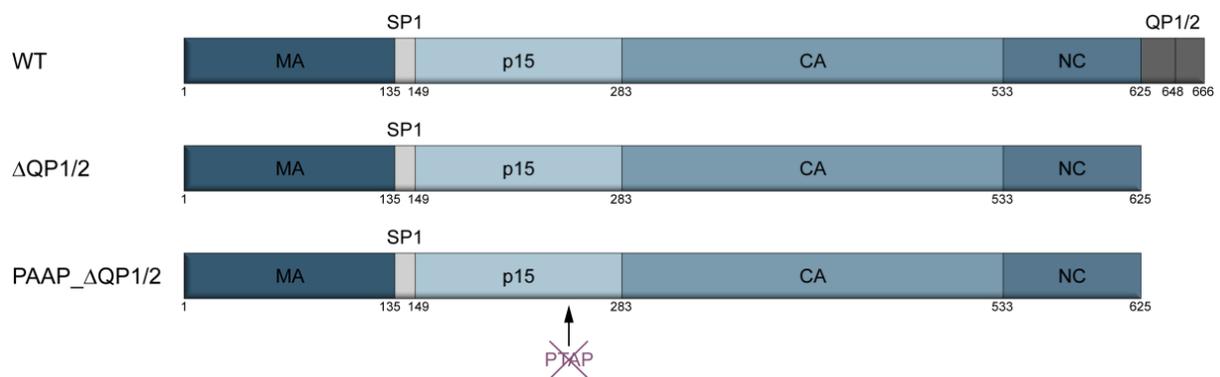


Abbildung 22: Überblick über die QP1/2-Deletionsmutanten. Darstellung der WT, oriHERV-K113_ Δ QP1/2 (mit intakter PTAP L-Domäne) und oriPAAPHERV-K113_ Δ QP1/2 Konstrukte. Die Mutante PAAP_ Δ QP1/2 trägt ein mutiertes PTAP-Motiv (T254A) im p15-Protein.

Um zu prüfen, ob die QP1/2-Polypeptide eine Funktion im Budding- und Freisetzungprozess von HERV-K übernehmen, wurde ein Stopp-Codon am C-terminalen Ende des NC-Proteins mittels Mutagenese-PCR inseriert. Diese Mutation ergab eine vollständige Deletion der 42 Aminosäuren langen QP1/2-Sequenz (Abbildung 22). Des Weiteren wurde eine Mutante generiert, die zusätzlich zum Stopp-Codon eine Mutation im PTAP-Motiv trägt (Aminosäure-Austausch an der Position T254A).

Anschließend sind HEK-293T-Zellen mit beiden Mutanten sowie zusätzlich mit dem WT und der PAAP-Mutante als Kontrolle transfiziert worden. Zwei Tage später erfolgten die RT-Aktivitäts-Messungen in den Zellkulturüberständen. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, konnte keine signifikante Veränderung der RT-Aktivität in den Überständen zwischen dem WT und dem Δ QP1/2 Konstrukt festgestellt werden. Darüber hinaus war im Vergleich zum PAAP Konstrukt keine relevante Abnahme der RT-Aktivität in den Überständen der PAAP_ Δ QP1/2-Mutante, die ein zerstörtes PTAP-Motiv enthält, messbar.

Es wurden außerdem Western Blot-Analysen durchgeführt, die den Gehalt des prozessierten Spaltprodukts des Gag-Vorläuferproteins, dem Kapsid, in den Viruspellets im Vergleich zum WT und der PTAP-Mutante zeigen sollten. Auch dieser Versuch bestätigte, dass das Fehlen der Proteine QP1 und QP2 keinen Einfluss auf die Virusfreisetzung hat. So unterschied sich der Gag-Gehalt in den Viruspellets der Deletionsmutanten nicht von den Kontrollen WT und PAAP.

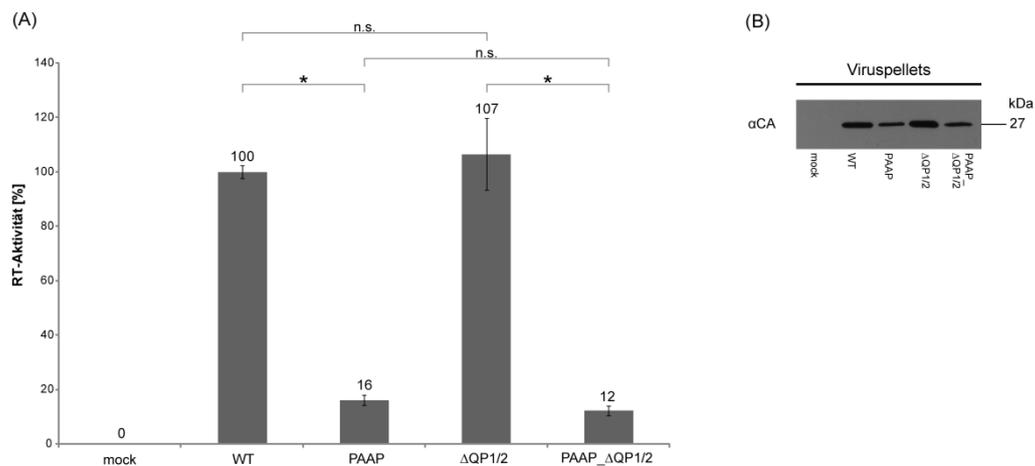


Abbildung 23: Effekt der QP1- und QP2-Deletionen auf die Virusfreisetzung. A: Die Messung der RT-Aktivität erfolgte 48 Stunden nach Transfektion in den HEK-293T-Zellkulturüberständen. Für eine übersichtlichere Darstellung der Werte wurde der Wildtyp auf 100% gesetzt und alle anderen Werte darüber normalisiert. Zusätzlich wurde das Plasmid pGL3-Promotor in die Zellen transfiziert, um über eine Luciferase-Aktivitätsbestimmung in den Zellen die Messwerte des RT-Aktivitäts-Assays an die Zellzahl anzugleichen. Alle Werte sind durch vierfache Messungen ermittelt worden. Signifikanztest: Mann-Whitney-U Test; n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$. B: Western Blot-Untersuchungen der QP1/2-Deletionsmutanten. Die Zellkulturüberstände wurden über ein Sucrosekissen mit einer Ultrazentrifugation aufkonzentriert und auf ein 12%iges SDS-Gel geladen. Zur Detektion der Proteine wurde als erster Antikörper ein α -CA Rattenserum und als zweiter Antikörper ein α -Ratten-IgG-HRP-gekoppelter Antikörper (aus der Ziege) verwendet.

Abschließend wurde die Morphologie der QP1/2-Deletionmutanten auf charakteristische Buddingdefekte untersucht. Wie in Abbildung 24, Reihe 1 erkennbar, zeigt auch die TEM-Untersuchung keinen Defekt im Assemblierungs- und Knospungsverhalten der Δ QP1/2-Mutante. Vergleichbar mit dem Wildtyp wurden viele reife Δ QP1/2-Viren außerhalb der Zellen beobachtet. Der PAAP_ Δ QP1/2-Phänotyp hingegen besitzt einen typischen L-Domänen-Defekt. Allerdings unterscheidet sich dieser nicht von der PAAP-Mutante und war somit auf die Mutation der PTAP L-Domäne zurückzuführen (Abbildung 24, Reihe 2). Dadurch ist bewiesen, dass die 42 Aminosäuren langen QP1- und QP2-Polypeptide keinen Einfluss auf das Budding von HERV-K(HML-2) haben. Ein Fehlen dieser Polypeptide hatte weder auf die Virusfreisetzung noch auf den Phänotyp der Mutanten einen Effekt. Die Funktion beider Proteine konnte noch nicht geklärt werden und sollte weiter untersucht werden.

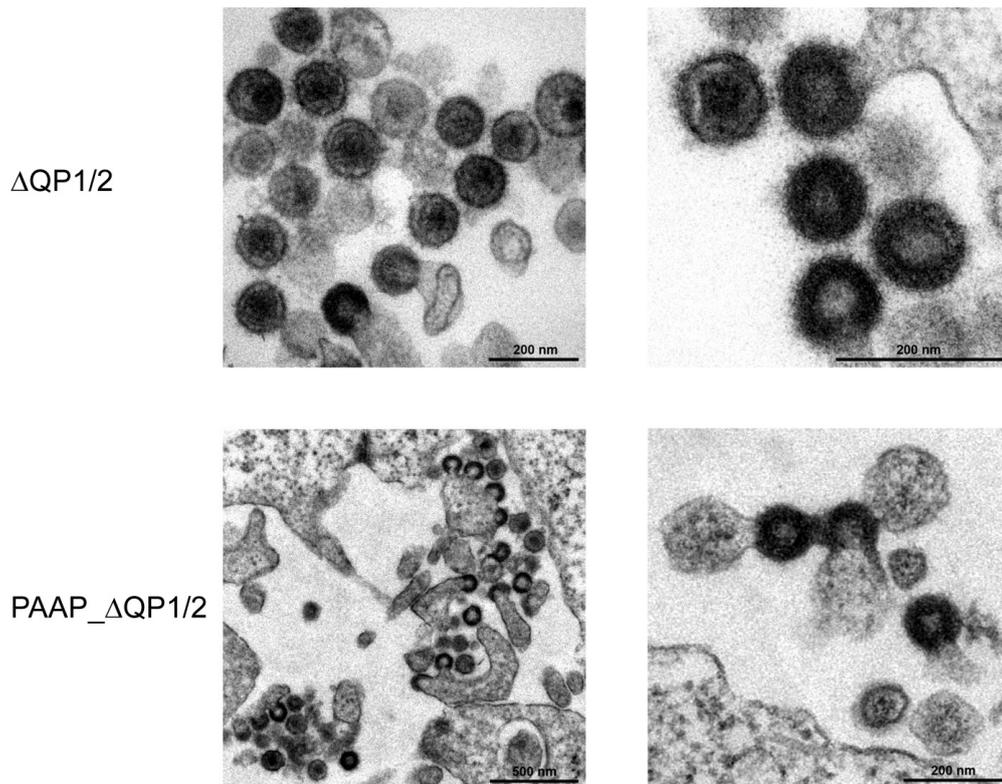


Abbildung 24: Morphologie der QP1/2-Deletionsmutanten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von der Deletionsmutante Δ QP1/2 und der Doppelmutante PAAP_ Δ QP1/2. HEK-293T-Zellen wurden fünf Tage nach Transfektion fixiert und eingebettet.

3.1.3 Effekt einer YP_x_nL-Sequenz des Kapsidprotein auf die HERV-K Knospung

Viele verschiedene umhüllte Viren steuern ihr Budding über mehr als eine L-Domäne. Oft sind diese L-Domänen in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert und werden nur durch wenige Aminosäuren voneinander getrennt wie z.B. bei den Viren HTLV-1 und MPMV [Bouamr *et al.*, 2003; Gottwein *et al.*, 2003]. Entgegen früherer Annahmen können die Motive der L-Domänen deutlich von den beschriebenen Konsensussequenzen abweichen. Besonders die YP_x_nL-Motive unterscheiden sich teilweise stark in ihren Aminosäure-Sequenzen. Deshalb und aufgrund der Tatsache, dass die bisherigen Ergebnisse auf eine weitere L-Domäne hindeuten, wurde das Gag-Vorläuferprotein erneut nach L-Domänen durchsucht. Dabei wurde ein YP_x_nL-Motiv im Kapsidprotein identifiziert. Dass es sich bei diesem Motiv um eine L-Domäne handelt, ist aber eher unwahrscheinlich. So ist bisher kein retrovirales Motiv, welches über eine L-Domänen-Aktivität verfügt, im CA-Protein ausgemacht worden. Des Weiteren besitzen die CA-Domänen hoch konservierte Regionen, die essentiell für die Gag-

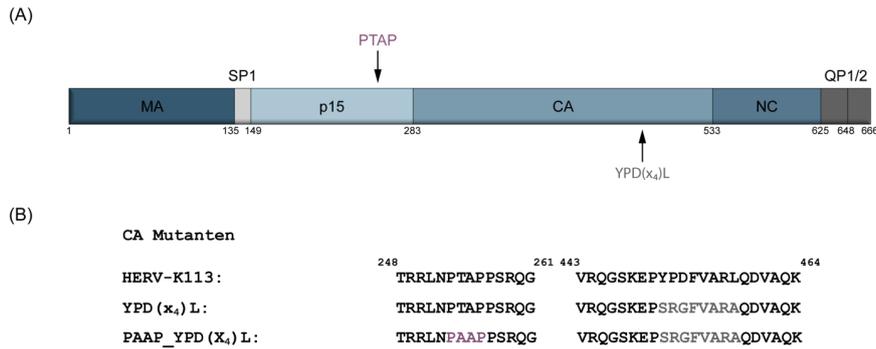


Abbildung 26: Schematische Darstellung des HERV-K113 Gag-Proteins mit dem im CA gelegenen YPD(x₄)L-Motiv. A: Übersicht des Gag-Proteins mit den Positionen des PTAP- sowie des YPD(x₄)L-Motivs. B: Die farbig dargestellten Sequenzen zeigen die Regionen, in denen die Aminosäure-Substitutionen inseriert wurden.

Wie aus Abbildung 27 ersichtlich, war kaum RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen der Mutanten nachweisbar, so wurde bei der Mutante YPD(x₄)L sowie bei der Doppelmutante YPD(x₄)L_PAAP keine bzw. nur 2% RT-Aktivität im Vergleich zum WT detektiert.

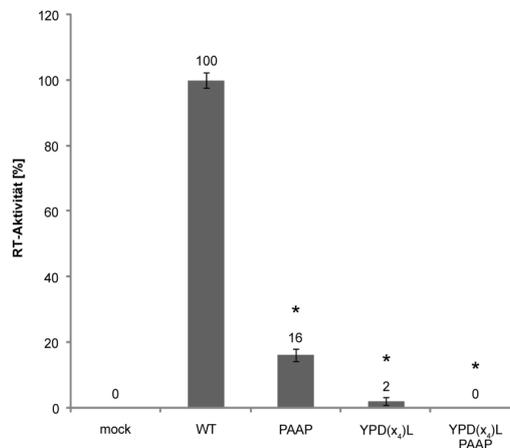


Abbildung 27: RT-Aktivitäts-Messungen in den Überständen der mit den YPD(x₄)L-Mutanten transfizierten Zellen. Messung der enzymalen Aktivität in mit WT, PAAP, YPD(x₄)L-Mutante und YPD(x₄)L_PAAP-Mutante transfizierten HEK-293T-Zellen. Des Weiteren wurde eine Normalisierung der Werte durchgeführt, indem durch die Transfektion des Plasmids pGL3-Promotor, die Lumineszenz (in relative light units“, RLU) in den lysierten Zellen im Luziferase-Assay bestimmt werden konnte. Alle hier gezeigten Werte sind Mittelwerte aus vier Einzelmessungen. Signifikanztest: Mann-Whitney-U Test; *(: p<0,05) zeigt die statistische Signifikanz verglichen mit den WT-Wert.

Ein Motiv, welches die Sequenz YPETLKL besitzt, befindet sich am N-terminalen Ende des p15-Proteins. Während die Aminosäuren Tyrosin, Prolin sowie Leucin der Konsensussequenz YPx_nL zugeordnet werden können, stellen die Glutaminsäure, das Threonin sowie das Lysin die in der Konsensussequenz angegebenen „Zwischen-Aminosäuren“ dar (Abbildung 29). Des Weiteren ist eine YQPPTRRRL-Sequenz in unmittelbarer Nähe zum PTAP-Motiv im p15-Protein lokalisiert. Zur vereinfachten Darstellung wird diese putative L-Domäne als $YP(x_6)L$ -Sequenz bezeichnet, denn im Vergleich mit der allgemein publizierten Konsensussequenz sind nur die Aminosäuren Tyrosin, Prolin und Leucin konstant. Alle weiteren Aminosäuren in der Sequenz sind variabel.

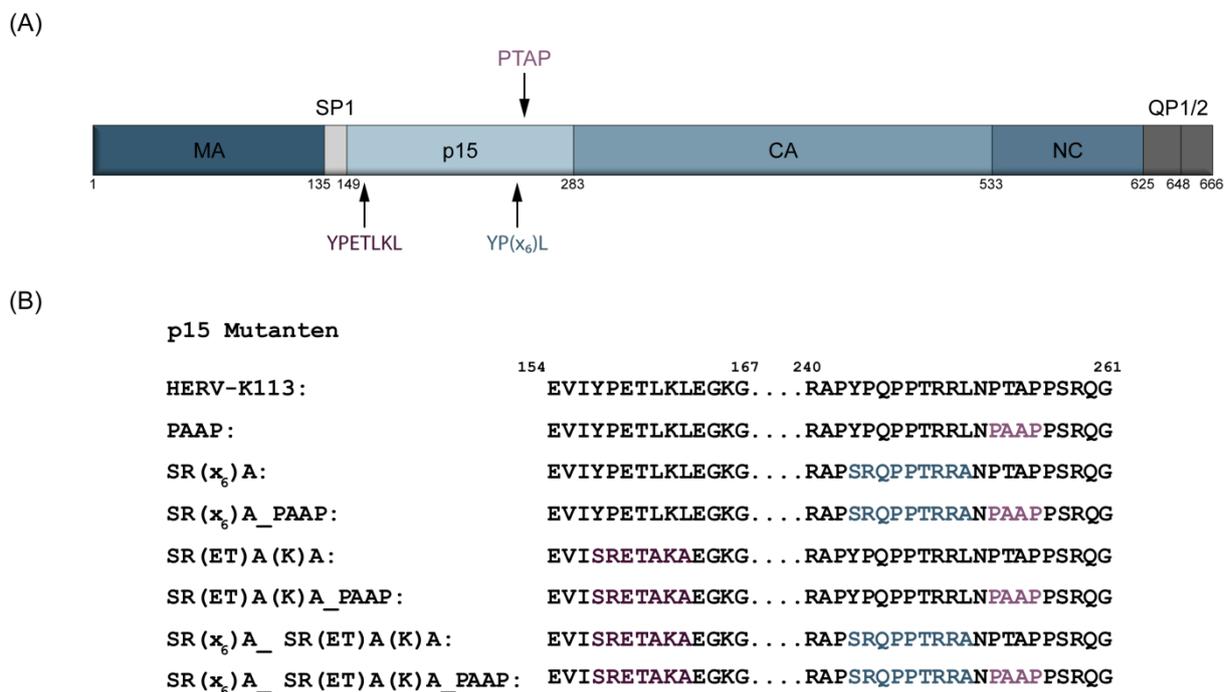


Abbildung 29: Schematische Übersicht der putativen YPx_nL -Mutanten im Gag-Protein von HERV-K. A: Ansicht des HERV-K Gag-Vorläuferproteins mit der PTAP L-Domäne und weiteren potentiellen Motiven in den p15. B: Die Darstellung zeigt alle generierten Mutanten im Überblick. Die farbige markierten Aminosäure-Sequenzen stellen die Bereiche dar, die durch Mutagenesen verändert wurden. Zum Vergleich ist jeweils die ursprüngliche HERV-K113-Sequenz abgebildet.

Über Sequenzanalysen in 13 verschiedenen HERV-K(HML-2)-Typen HERV-K113 (AY037928), K101 (AF164609), K102 (AF164610), K104 (AC116309), K107 (AF164613), K108 (AC072054), K109 (AC055116), K115 (AY037929), K(C19) (Q9YNA8), AP000776, Y178333, AC025420 und Q9HDB9

konnte gezeigt werden, dass diese Motive in den untersuchten HERV-K(HML-2) konserviert sind. Interessanterweise stimmte die Aminosäure-Sequenz des YPETLKL-Motivs in allen untersuchten Elementen überein und auch bei der YP(x₆)L-Domäne waren alle Sequenzen mit einer Ausnahme, identisch (Abbildung 28).

Um zu evaluieren, ob die neu entdeckten Sequenzen funktional am Buddingprozess beteiligt sind, wurden verschiedene Aminosäuren durch Mutagenesen substituiert. Dabei wurden die Mutationen nach entsprechenden publizierten Algorithmen inseriert, welche schon bei anderen Retroviren zu einer Inaktivierung der YP_{x_n}L-Motive führten. Hierbei ist jedes Tyrosin gegen ein Serin, jedes Prolin gegen ein Arginin, jedes Leucin gegen ein Alanin und eine Asparaginsäure gegen ein Glycin ausgetauscht worden [Li *et al.*, 2002; Joshi *et al.*, 2008; Fujii *et al.*, 2009]. Wie in Abbildung 29 B dargestellt, sind folgenden Single-Mutanten hergestellt worden: SRETAKA (Y158S, P159R, L161A, L163A) und SR(x₆)A (Y243S, P244R, L251A). Weiterhin wurde eine Doppelmutante generiert, bei der beide im p15-Protein lokalisierten YP_{x_n}L-Sequenzen inaktiviert wurden. Zusätzlich wurde ein Konstrukt hergestellt, bei der alle drei im p15-Protein liegenden Motive durch Mutationen (Triple-Mutante) zerstört wurden. Hierbei handelt es sich um Kontrollen, die bei einem kompletten Stopp der Freisetzung von RT-aktiven Viren anzeigen sollen, dass keine weiteren L-Domänen an dem Freisetzungsprozess beteiligt sind. Als weitere Kontrollen sind verschiedene Doppelmutanten durch eine zusätzliche Inaktivierung der PTAP L-Domäne generiert worden (Abbildung 29). Zur übersichtlicheren Darstellung werden die YP_{x_n}L-Mutanten als YPETLKL-Mutante und YP(x₆)L-Mutante bezeichnet.

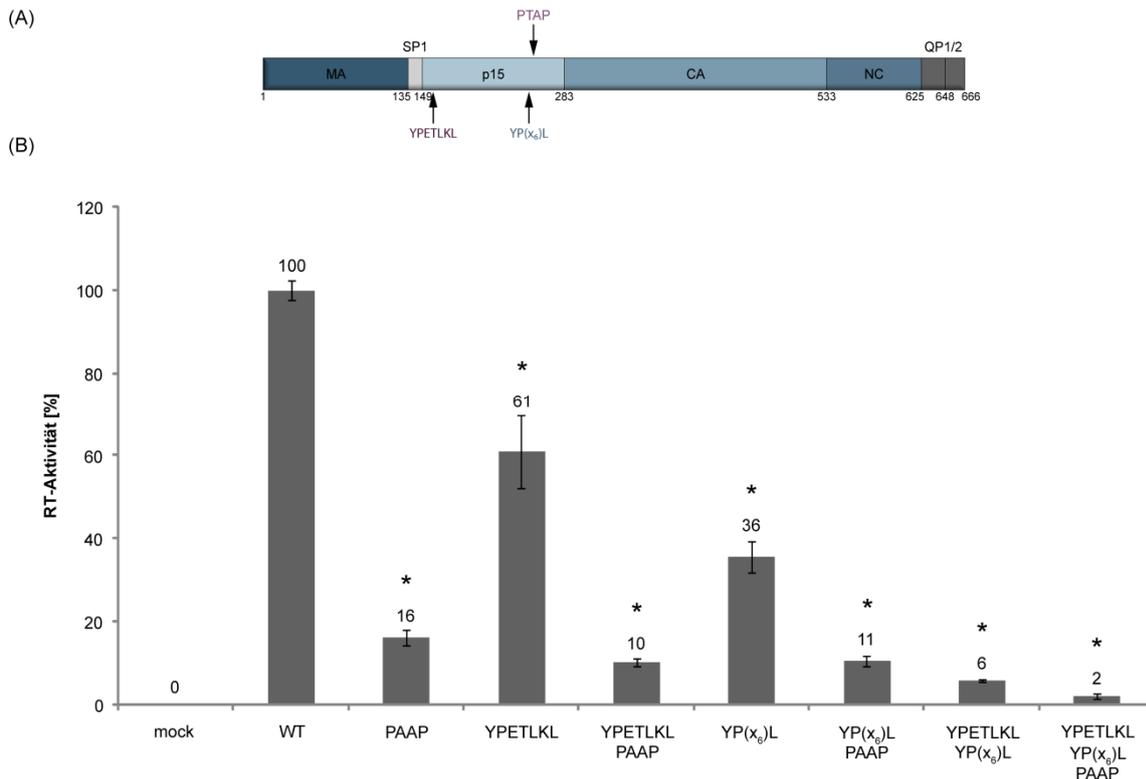


Abbildung 30: Effekt der verschiedenen Mutationen auf die RT-Aktivität. A: Übersicht der YP_{x_n}L-Motive in der p15-Domäne des HERV-K Gag-Proteins. B: RT-Aktivitäts-Messung. Die Überstände der mit den verschiedenen Konstrukten transfizierten HEK-293T-Zellen wurden mittels Cavid-Assay auf RT-Aktivität überprüft. Um die Auswirkungen der verschiedenen Mutationen übersichtlicher darzustellen, wurden alle Werte relativ zum Wildtyp gesetzt. Außerdem erfolgte eine Normalisierung der Werte, indem durch die Transfektion des pGL3-Promotor Plasmides die Lumineszenz (in „relative lighth units“, RLU) in den lysierten Zellen im Luziferase-Assay bestimmt werden konnte. Alle hier gezeigten Werte sind Mittelwerte aus vier Einzelmessungen. Signifikanztest: Mann-Whitney-U Test; (*: p<0,05) zeigt die statistische Signifikanz verglichen mit den WT-Wert.

Um eine L-Domänen-Aktivität der verschiedenen Motive festzustellen, wurde eine Untersuchung der RT-Aktivität in transfizierten HEK-293T-Zellen vorgenommen. Wie Abbildung 30 zeigt, verringert sich die gemessene RT-Aktivität bei allen Mutanten. Ein besonders starker Abfall war jedoch bei der Mutation des YP(x₆)L-Motives detektierbar. So führte die Mutation der in der Nähe des PTAP-Motivs liegenden YP(x₆)L-Sequenz zu einer Reduktion um etwa 70%. Hingegen resultierte die Einzelmutation von YPETLKL in weniger als einer zweifachen Verminderung der Aktivität. Diese Verringerung der Freisetzung der Reversen Transkriptase konnte noch deutlich vergrößert werden, wenn zusätzlich das

PTAP-Motiv mutiert wurde. Zu einer verstärkten Abnahme der RT-Aktivität kam es ebenfalls, wenn beide im p15-Protein lokalisierten Sequenzen zerstört wurden. Einen nahezu vollständigen Stopp der RT-Aktivitäts-Freisetzung in den Zellkulturüberständen war folglich bei einer Triple-Mutation aller im p15-Protein liegenden Motiven erkennbar. Insgesamt zeigte dieser Versuch, dass alle im p15-Protein lokalisierten Sequenzen als L-Domänen fungieren. Allerdings nimmt die PTAP L-Domäne einen dominanten Part im Replikationszyklus von HERV-K ein.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Freisetzungsdefekte, den die YP_{x_n}L-Mutationen hervorrufen, auch in Western Blot-Analysen nachweisbar sind. Für diesen Test wurden HEK-293T-Zellen mit den WT und dem PAAP Konstrukt sowie mit allen in Abbildung 29 aufgelisteten YP_{x_n}L-Mutanten transient transfiziert. Die virushaltigen Überstände wurden vier Tage nach Transfektion über ein 20%iges Sucrosekissen ultrazentrifugiert und mit den lysierten Zellen im Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 31, oben gezeigt, war eine Abnahme des 27 kDa schweren, prozessierten Kapsidproteins der YPETLKL-Mutante im Viruspellet nachweisbar (Abbildung 31 oben, Spur 4). Allerdings konnte deutlich weniger Kapsidprotein bei der YP_(x₆)L-Mutante in der Spur 6 beobachtet werden. Wie die Ergebnisse des Cavid-Assays erwarten ließen, war noch weniger prozessiertes Protein bei den YPETLKL_PAAP, YP_(x₆)L_PAAP, YPETLKL_YP_(x₆)L und der Triplemutante YPETLKL_YP_(x₆)L_PAAP detektierbar. Während für den WT in beiden Immunoblots kein unprozessierter Gag-Vorläufer mit einem Molekulargewicht von 74 kDa detektiert wurde, konnte das Polyprotein bei allen anderen Mutanten nachgewiesen werden. Dass auch in den Viruspellets Gag-Vorläuferproteine detektiert wurden, ist durch das Vorhandensein von Mikrosomen erklärbar. Diese bis zu 100 nm großen durch eine Membran begrenzten Vesikel können trotz Filtration mit einem 0,45 µm Filter und Ultrazentrifugation zu einer Verunreinigung der Viruspellets führen. In den Zelllysaten war ebenfalls kein Gag-Vorläufer beim WT detektierbar. Es ist jedoch auffällig, dass in beiden Immunoblots die Vorläufer der YP_(x₆)L-Mutanten am stärksten exprimiert sind. In dem Zelllysate der YPETLKL-Mutante hingegen ist das 74 kDa schwere Protein kaum nachweisbar. Dass gleiche viele Zellen im SDS-Gel aufgetragen wurden, die das Virus produzieren, konnte mittels α-Aktin-Antikörper nachgewiesen werden. Insgesamt können in diesem Experiment die Ergebnisse der RT-Aktivitäts-Messung verifiziert werden. Während die YPETLKL-Mutante über ähnliche Proteinverhältnisse wie der WT verfügt, unterscheidet sich die Triplemutante (Spur 9) am stärksten von diesem. So wird bei dieser Mutante kaum prozessiertes Gag, dafür aber mehr Vorläufer beobachtet. Das lässt vermuten, dass keine weiteren L-Domänen an der HERV-K113 Knospung beteiligt sind.

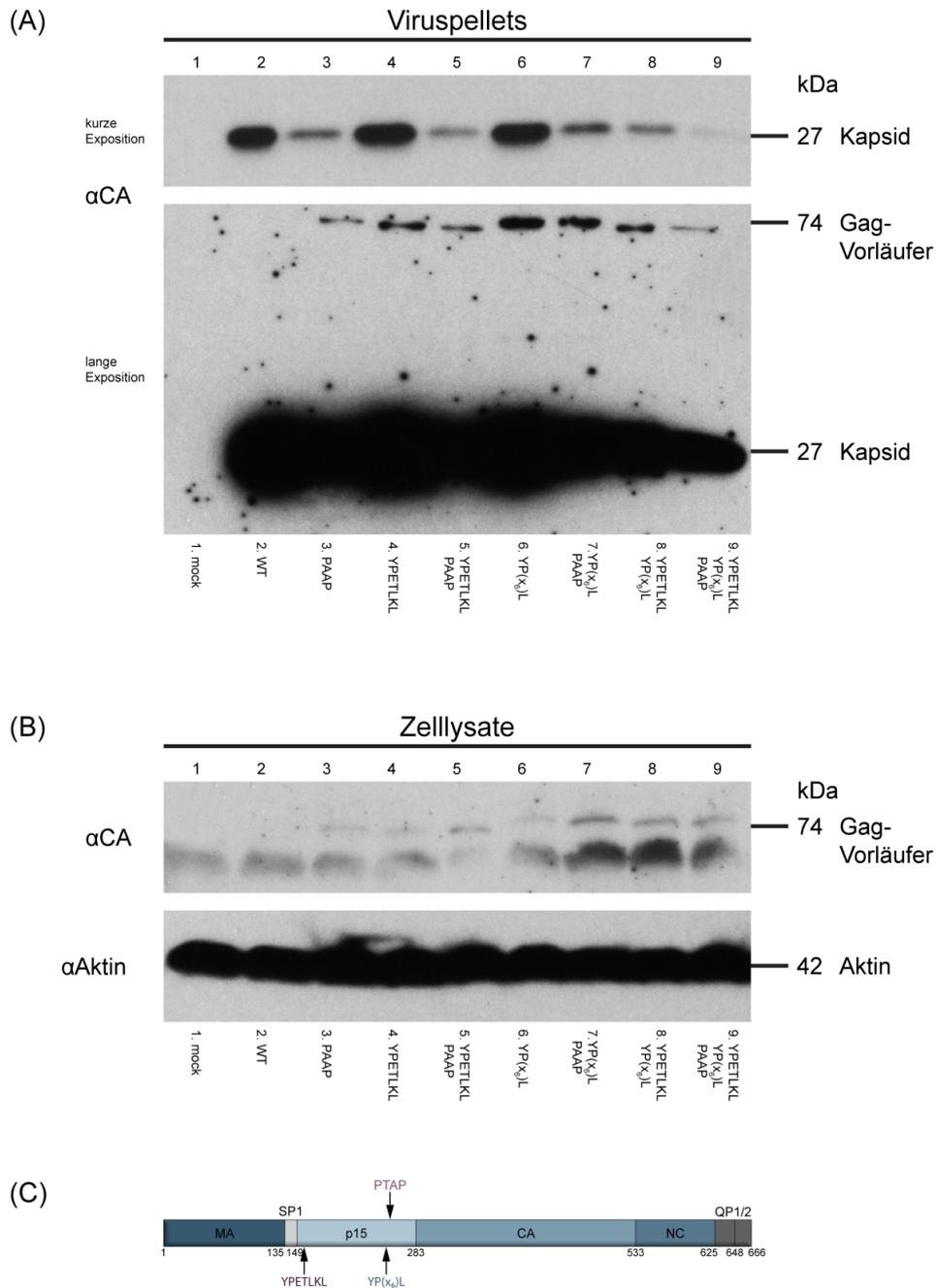
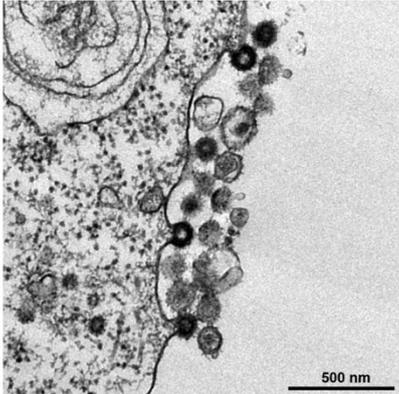
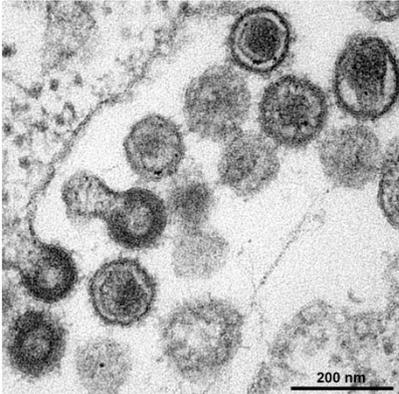


Abbildung 31: Effekt der verschiedenen YPx_nL -Mutationen auf die Virusfreisetzung. HEK-293T-Zellen wurden mit den verschiedenen L-Domänen-Mutanten sowie dem WT transient transfiziert. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen. A: Die pelletierten Viruspartikel sowie B: die Zelllysate wurden auf ein 12%iges SDS-Gel geladen und anschließend im Western Blot analysiert. Der Nachweis von Aktin erfolgte mittels α -Aktin-Maus / α -Maus-IgG-HRP-Antikörpern und die Gag-Expression wurde mit einem α -CA-Rattenserum und α -Ratten-IgG-HRPgekoppelten Antikörper (aus der Ziege) detektiert. C: Übersicht der putativen p15-Protein L-Domänen im Gag.

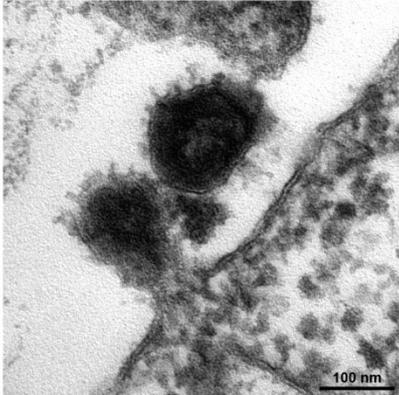
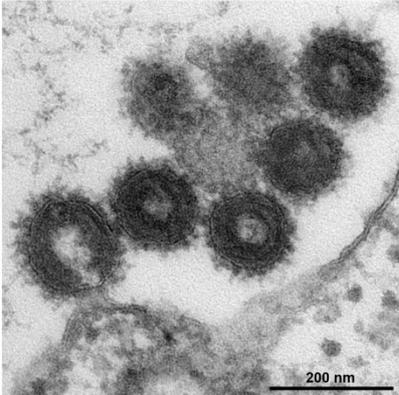
Zusammenfassend gesagt, zeigt die Analyse der pelletierten Virusüberstände und der Zellysate, dass die Inaktivierungen beider $YP_{x_n}L$ -Motive eine Veränderung der Gag-Protein-Konzentration hervorrufen. Allerdings beeinträchtigt die Mutation der $YP_{(x_6)}L$ -Sequenz eine Virusfreisetzung im Vergleich zur $YPETLKL$ -Mutation stärker. Somit führen die Mutationen aller im p15-Protein vorhandenen L-Domänen-Sequenzen zu einem erheblichen Buddingdefekt.

Abschließend wurde der Einfluss der $YP_{x_n}L$ -Mutationen auf die Morphologie der Viruspartikel mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Wie in Abbildung 32 gezeigt, unterscheiden sich alle Mutanten in ihrem Phänotyp deutlich vom WT. So waren viele unreife Partikel, die oft noch mit der Plasmamembran verbunden sind, bei den Einzel-Mutanten $YPETLKL$ (Reihe 1) und $YP_{(x_6)}L$ (Reihe 3) nachweisbar. Allerdings wurden auch viele reife Partikel beobachtet. Die Doppelmutanten hingegen, die zusätzlich eine inaktivierte PTAP-Sequenz trugen, wiesen häufiger einen Arrest im spätem Buddingstadium und andere anormale Phänotypen wie Buddingketten auf (Abbildung 32, Reihe 2 und 4).

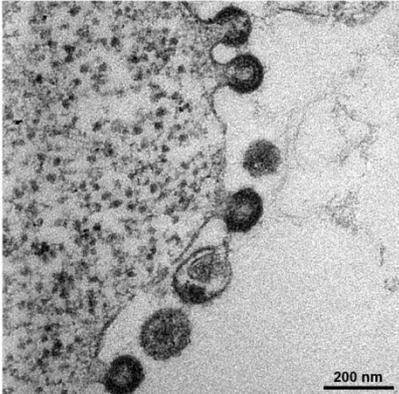
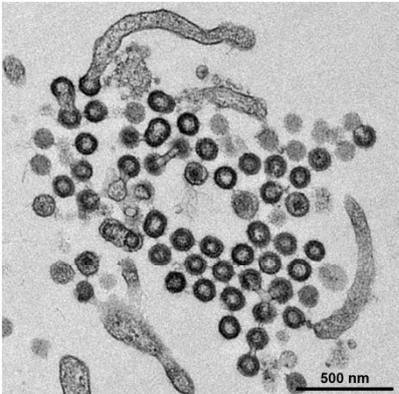
YPETLKL



YPETLKL
_PAAP



YP(x₆)L



YP(x₆)L
_PAAP

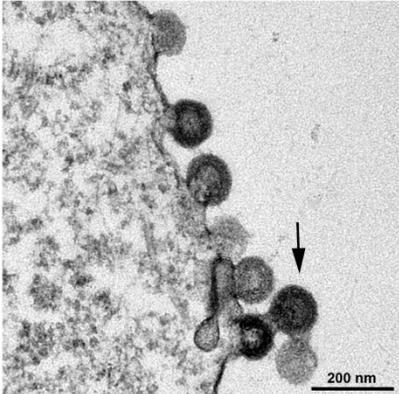
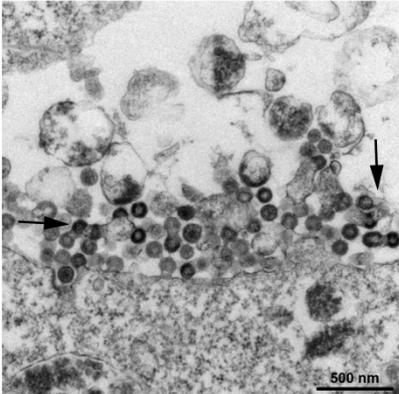


Abbildung 32: Morphologie der YP_{x_n}L-Mutanten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von den YP_{x_n}L-Mutanten in HEK-293T-Zellen. Zur Untersuchung der Viren wurden die Zellen fünf Tage nach transienter Transfektion fixiert und eingebettet.

Um die L-Domänen-Aktivität der verschiedenen Motive besser einordnen zu können, wurden die beobachteten Viren quantifiziert. Die unterschiedlichen Virionen wurden in reife und bereits freigesetzte unreife Partikel unterteilt, die unreifen Partikel außerdem in früh und spät buddende Virionen sowie in Buddingketten. Die Ergebnisse der Klassifizierung sind in Abbildung 33 dargestellt. Als Kontrollen wurden außerdem die Werte des WT und der PTAP-Mutante abgebildet.

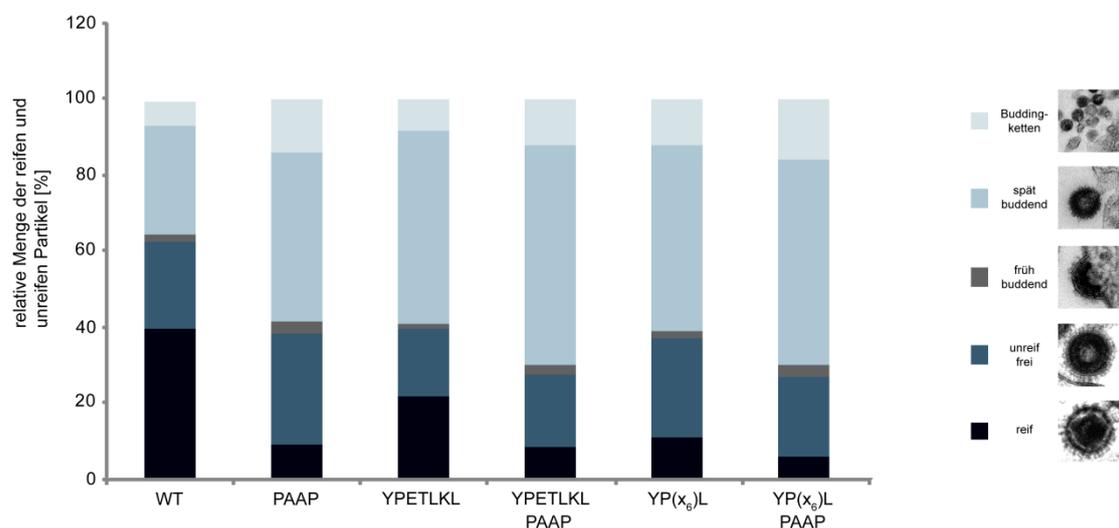


Abbildung 33: Quantifizierung der reifen und unreifen Partikel sowie der Buddingstrukturen der YPX_nL-Mutanten. Die verschiedenen Partikel der Mutanten wurden in reife und unreife Partikel unterteilt. Um die Buddingdefekte der einzelnen L-Domänen besser zu charakterisieren, wurden die unreifen Partikel zusätzlich in unreife freie, früh buddende und spät buddende Partikel sowie in Buddingketten klassifiziert. Bei der Zählung wurden 191 WT, 232 PAAP, 91 YPETLKL, 152 YPETLKL_PAAP, 85 YP(x₆)L und 235 YP(x₆)L_PAAP Partikel einbezogen.

Die Resultate der Auszählungen korrelieren gut mit den Ergebnissen der Western Blot-Analyse sowie der RT-Aktivitäts-Messung. Insofern verursachte die Mutation des YPETLKL einen defekten L-Domänen-Phänotyp, allerdings war dieser weit weniger stark ausgeprägt als die Phänotypen der anderen beiden inaktivierten Motive. Bei dieser Mutante wurden weniger reife und mehr spät buddende

Partikel gezählt, jedoch war der Effekt erst durch eine zusätzliche PTAP-Mutation deutlich vom WT unterscheidbar. Wie schon in den vorangegangenen Experimenten festgestellt werden konnte, hat die Mutation des YP(x₆)L-Motivs einen weit größeren Effekt auf die Morphologie der Virionen als die Mutationen der YPETLKL-Sequenz. Neben dem etwa dreifachen Anstieg der Bildung von Buddingketten wurden nur 10% aller Partikel in einem reifen Stadium beobachtet. Dieser Defekt im Freisetzungsprozess konnte durch eine zusätzliche Mutation im PTAP-Motiv deutlich verstärkt werden. Die Virionen, die eine solche Mutation trugen, befanden sich nur äußerst selten in einem reifen Stadium. Fast alle Virionen verharrten in einem knospenden Zustand und häufig war dieser schon weit vorangeschritten. Weiterhin bildeten viele Prokapside Buddingketten, indem diese über Membranbrücken miteinander verbunden waren (Abbildung 32, Reihe 4, schwarze Pfeile).

Somit konnten zwei weitere im p15-Protein lokalisierte L-Domänen identifiziert werden. Während die Zerstörung des Motivs am p15-N-Terminus lediglich einen milden L-Domänen-Defekt der Virionen hervorruft, hat die Inaktivierung der in unmittelbarer Nähe zum PTAP-Motiv lokalisierten YP_{x_n}L-Sequenz weit größere Auswirkungen auf die Morphologie der Viren. Trotzdem führt die Inaktivierung beider Motive zu dem typischen L-Domänen-Defekt, bei dem das Budding und die Freisetzung der Viren arretiert sind. In beiden Fällen verstärkte eine zusätzliche Zerstörung des PTAP-Motivs diesen Effekt. Außerdem war ein sehr starker L-Domänen-Defekt bei der Inaktivierung beider YP_{x_n}L-Motive erkennbar. Da die Triple-Mutation aller im p15-Protein vorhandenen Motive fast zu einem kompletten Stopp der Virusfreisetzung führt, bestätigt sich die Annahme, dass alle an der Entlassung der Viren aus der Wirtszelle beteiligten L-Domänen im Gag-Protein identifiziert wurden. In dem Buddingprozess von HERV-K in HEK-293T-Zellen übernimmt die PTAP-Domäne einen dominanten Part, während die beiden weiteren YP_{x_n}L-Motive eher untergeordnete Rollen spielen.

3.1.5 L-Domänen-Aktivität der Motive in anderen Zelllinien

Durch die verschiedenen Untersuchungen in HEK-293T-Zellen konnten drei L-Domänen im Gag-Protein von HERV-K identifiziert werden. Für eine weitere Charakterisierung sollten die Motive nun auch in anderen Zelllinien experimentell erforscht werden. Es ist zum Beispiel bekannt, dass die Auswirkungen einer HIV-1 PTAP-Mutation stark zelltypabhängig ist. So kommt es in einigen Zelllinien durch die Inaktivierung des PTAP-Motivs zu einer vollständigen Blockierung des Buddings, während in anderen Zellsystemen ein sehr moderater Phänotyp beobachtet werden kann [Demirov *et al.*, 2002]. Des Weiteren zeigte die Erforschung der HTLV-1 Knospung, dass die Freisetzung der Viruspartikel in HeLa-

Zellen verglichen mit der viralen Abschnürung in HEK-293T-Zellen weniger effizient vonstatten geht [Blot *et al.*, 2004]. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob der Effekt der HERV-K L-Domänen-Mutationen in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt ist. Die Suche nach weiteren Zelllinien gestaltete sich dabei durchaus schwierig. In mehreren Zellsystemen war die Expression der viralen oriHERV-K113-Proteine so gering, dass keine Detektion der RT-Aktivität oder von viralen Partikeln im Transmissionselektronenmikroskop möglich war. Dies ist vor allem auch auf den viruseigenen Promotor zurückzuführen, dessen schwache Aktivität Auswirkungen auf die Proteinproduktion hat. Weiterhin sind viele Zelllinien schwer transfizierbar, so dass zu wenig DNA in die Zellen gelangt. Beispielsweise wurden die RT-Aktivität des WT und der PTAP-Mutante in der menschlichen Melanomzelllinie SK-Mel13 bestimmt.

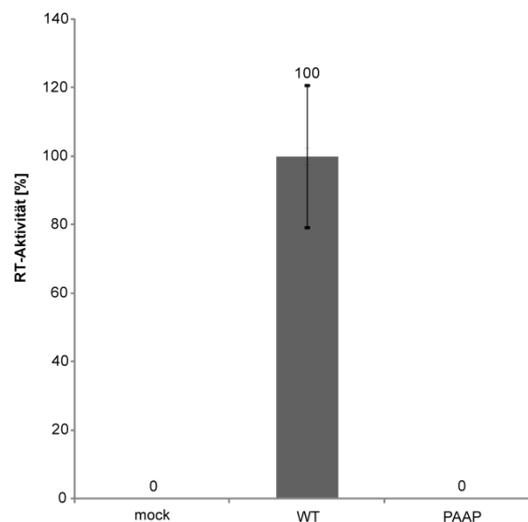


Abbildung 34: RT-Aktivität des WT und der PTAP-Mutante in den Überständen von SK-Mel13-Zellen. Die Reverse Transkriptase-Aktivität wurde zwei Tage nach der Transfektion in den Überständen detektiert. Alle Werte wurden als Duplikate ermittelt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem Leervektor pBSK transfiziert.

Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse dieses Experiments. Da in dieser Zelllinie die Messung der RT-Aktivität des WT an der Grenze zur Detektierbarkeit erfolgte, konnte nur wenig RT-Aktivität in pg/ml im Verhältnis zu den HEK-293T-Zellen ermittelt werden, so war die RT-Aktivität der PTAP-Mutante nicht mehr nachweisbar. Eine weitere Verwendung der SK-Mel13-Zelllinie war deshalb nicht zweckmäßig. Nach einigen Versuchen in verschiedenen Zelllinien erwies sich die humane Teratokarzinomzelllinie

Tera-1 als ein weiteres geeignetes Zellmodell. In dieser Zelllinie ist die LTR-Promotoraktivität der HERV-K(HML-2)-Proviren höher als in anderen Zellmodellen. Die Ergebnisse der Tera-1 RT-Aktivitätsmessung sind in Abbildung 35 dargestellt.

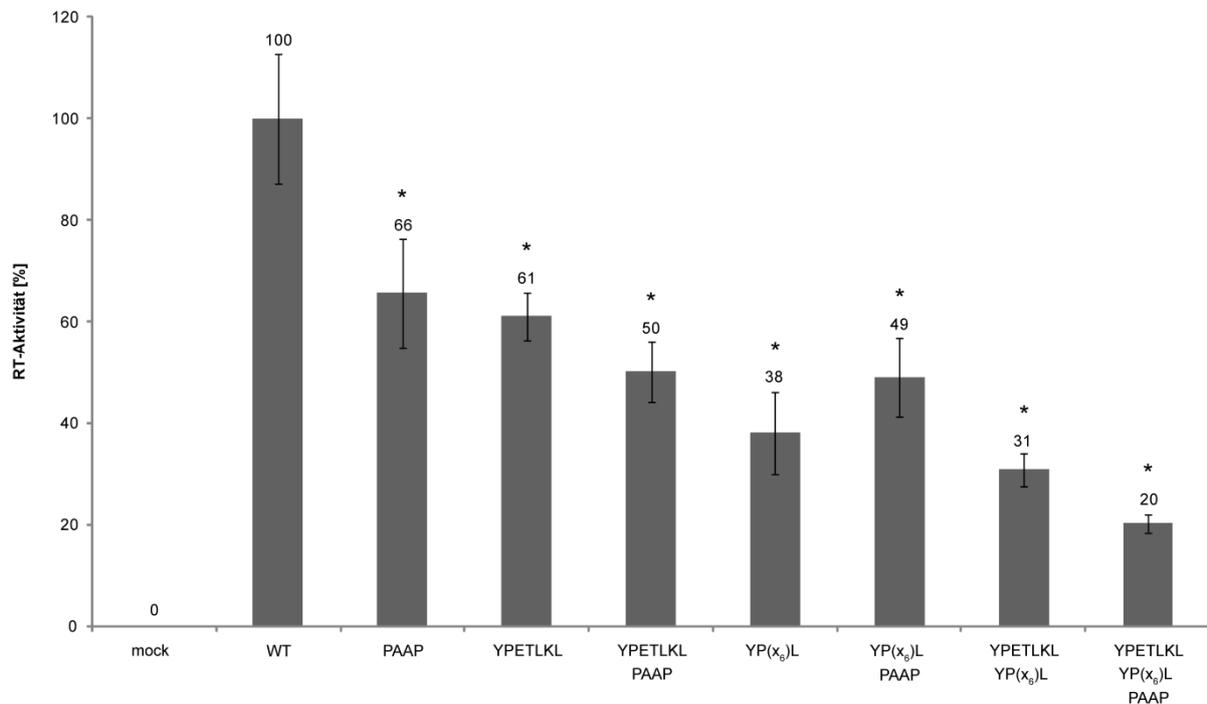


Abbildung 35: RT-Aktivität der L-Domänen-Mutanten in Überständen von Tera-1-Zellen. Zwei Tage nach der Transfektion wurde die RT-Aktivität in den Überständen ermittelt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem Leervektor pBSK transfiziert. Alle Werte sind Mittelwerte aus vier Einzelmessungen und wurden über den WT normalisiert. Signifikanztest: Mann-Whitney-U Test; (*: $p < 0,05$) zeigt die statistische Signifikanz verglichen mit den WT-Wert.

Interessanterweise war der Effekt der PTAP-Mutation in der humanen Teratokarzinomzelllinie Tera-1 weniger stark ausgeprägt als in der humanen HEK-293T-Zelllinie. Im Gegensatz dazu konnte durch die Inaktivierung beider YP_{x_n}L-Domänen eine deutliche Reduzierung der RT-Aktivität detektiert werden. Hierbei führte die Mutation der YP(x₆)L-Sequenz zum größten Abfall der gemessenen RT-Aktivität in den Tera-1-Zellkulturüberständen. Eine zusätzliche Inaktivierung der PTAP L-Domäne hatte kaum Auswirkungen auf die Virionen-Freisetzung. Lediglich die Mutation beider YP_{x_n}L-Domänen und die Mutation aller Motive im p15-Protein führten, wie in den HEK-293T-Zellen, zu einer Reduzierung der RT-Aktivitäts-Freisetzung (70-80% Rückgang). Allerdings resultierte selbst die Mutation aller

identifizierten L-Domänen nicht in einem völligen Stopp der RT-Aktivitäts-Freisetzung. Abschließend konnte gezeigt werden, dass alle drei Motive auch in der humanen Teratokarzinom-Zelllinie zu einer verringerten Freisetzung von Virionen führen. Allerdings hat die PTAP L-Domäne hier einen geringeren Einfluss auf die Virus-Freilassung. Um nachzuweisen, dass die PTAP L-Domäne tatsächlich in Tera-1-Zellen einen Effekt auf die Virus-Virus- bzw. Virus-Zell-Bindung besitzt, wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von PAAP Partikeln in Tera-1 Zellen erstellt.

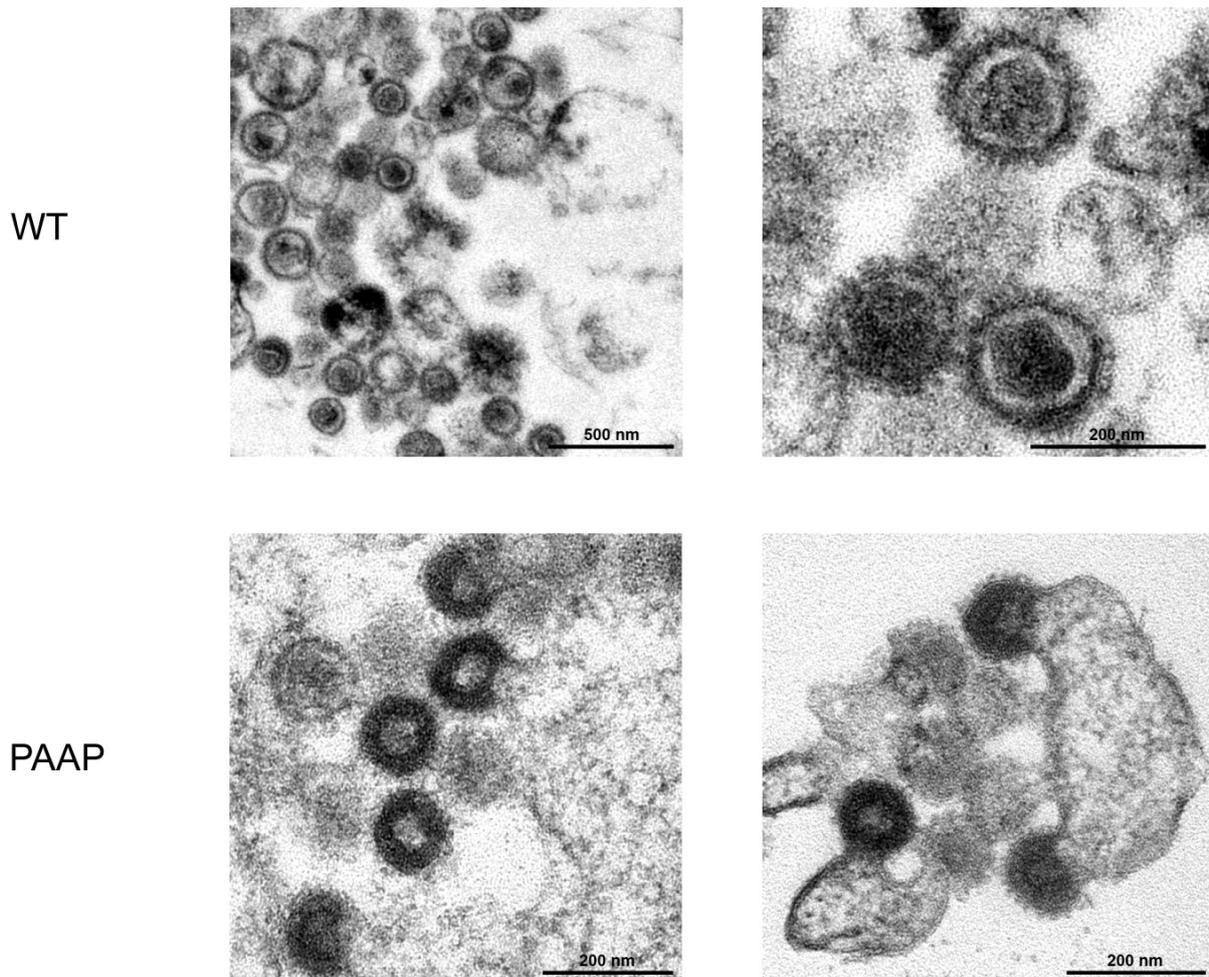


Abbildung 36: Phänotyp der WT und PAAP Partikel in Tera-1-Zellen. Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen von Zellen, die vier Tage nach der Transfektion mit dem WT und dem PAAP Konstrukt fixiert und eingebettet wurden.

Wie schon in HEK-293T-Zellen beobachtet, waren fast alle detektierten PAAP Partikel in einem unreifen Stadium (Abbildung 36, Reihe 2). Viele davon waren noch mit der Zellmembran verbunden und schienen in einem späten Knospungsstadium arretiert zu sein. Auch konnten weniger Prokapside

gezählt werden, die über Membranbrücken miteinander verbunden waren. Insgesamt unterscheidet sich der PAAP Phänotyp aber sehr deutlich vom WT (Reihe 1), so dass die Mutation der PTAP L-Domäne auch in den humanen Teratokarzinomzellen einen typischen Buddingdefekt der Partikel hervorruft.

3.2 Interaktion der L-Domänen mit ESCRT-Proteinen

Es ist wahrscheinlich, dass das Gag-Protein zur Ausübung seiner L-Domänen-Funktionen das ESCRT-System der Wirtszelle rekrutiert. Für viele Retroviren konnten bisher diverse ESCRT-Proteine identifiziert werden, die durch die Interaktionen mit den Gag-Proteinen den Buddingprozess steuern. Hierbei können je nach Sequenz der L-Domäne unterschiedliche Proteine eine Rolle spielen. In diesem Abschnitt der Arbeit werden zwei Proteine behandelt, deren Beteiligung an der Freisetzung umhüllter Viren schon häufig nachgewiesen wurde. Mit Hilfe von Kolokalisationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass das PTAP-Motiv Tsg101, ein ESCRT-I-Protein, an die Plasmamembran rekrutiert wird. Weiterhin konnte durch die Überexpression beider hier untersuchten ESCRT-Proteine in HEK-293-T-Zellen eine Beteiligung dieser an der HERV-K Knospung bestätigt werden. Die Untersuchung der Protein-L-Domänen-Interaktion kann helfen, den Prozess der Assemblierung und des Buddings in seiner Gesamtheit zu verstehen.

3.2.1 Kolokalisationsexperimente mit Tsg101

Für Tsg101, einer essentiellen Komponente des ESCRT-Systems, konnte gezeigt werden, dass es mit den PT/SAP-Motiven unterschiedlicher Retroviren interagieren kann. Eine zentrale Rolle bei der Bindung nimmt die E2-ähnliche Domäne ein, die strukturell den E2-Ubiquitin konjugierenden Enzymen ähnelt, durch das Fehlen eines Cysteins aber kein aktives Zentrum besitzt. Des Weiteren setzt sich Tsg101 aus einer prolinreichen, einer Coiled-Coil und einer C-terminalen Domäne zusammen. Der Aufbau des Proteins ist in Abbildung 37 dargestellt. Um die physiologische Rolle von Tsg101 in der Assemblierung und im Budding von HERV-K näher zu charakterisieren, wurde der Einfluss einer intrazellulären Konzentrationssteigerung von Tsg101 auf die Gag-Expression untersucht. Eine Analyse der Gag-Verteilung konnte anhand konfokaler Laserscanning-Mikroskopie vorgenommen werden.

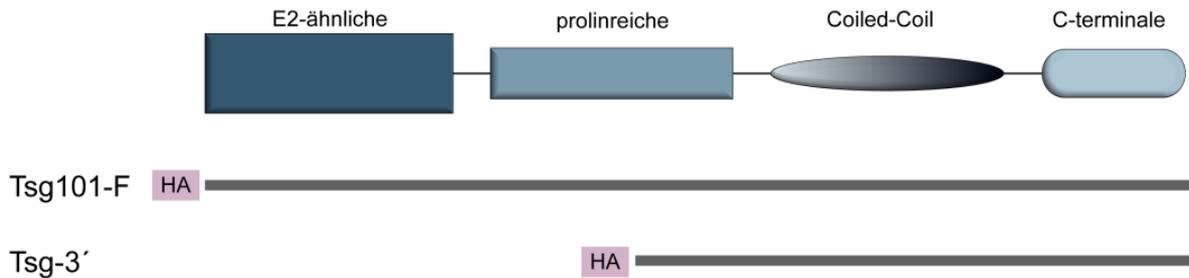


Abbildung 37: Schematische Darstellung von Tsg101 und der Deletionsmutante Tsg-3'. Das WT Tsg101 besteht aus einer Region, die sequenzielle und strukturelle Ähnlichkeit mit Ubiquitin-konjugierenden E2 Enzymen besitzt (E2-ähnliche). Zusätzlich weist es eine prolinreiche, eine Coiled-Coil sowie eine C-terminale Domäne auf. Die kodierenden Regionen des Vollängen Tsg101-F Expressionvektors sowie der N-terminal verkürzte Tsg-3' Expressionsvektor sind vermerkt. HA bezeichnet die am N-Terminus gelegenen HA-Epitop-Markierung. Abbildung aus Goila-Gaur *et al.*, 2003 [modifiziert].

Hierzu wurde auf ein fluoreszenzmarkiertes Konstrukt zurückgegriffen, bei dem eine codonoptimierte *gag*-Sequenz in einem pmCherry-N1 Fluoreszenzvektor inseriert ist [Promotionsarbeit Anja Zimmermann, Robert Koch-Institut]. Die inserierte *gag*-Sequenz leitet sich vom oriHERV-K113 ab, wobei zusätzlich eine signifikant verstärkte Proteinexpression durch eine Codonoptimierung erzielt werden konnte. Indem die Nukleotid-Sequenz des *gag* verändert wurde, konnte die Verwendung seltener Codons umgangen werden. Die Aminosäure-Sequenz blieb aber trotz der veränderten Nukleotid-Folge unverändert. Weiterhin ist die Virusprotein-Produktion deutlich verstärkt worden, indem am N-terminalen Ende des Proteins ein Promotor des Cytomegalovirus (CMV) vorgeschaltet wurde. Tsg101-F, und Tsg-3' wurden freundlicherweise von Eric Freed vom National Cancer Institute (USA) zur Verfügung gestellt. Während Tsg101-F als Vollängenkonstrukt alle vier Domänen besitzt, zeichnet sich Tsg-3' durch das Fehlen der für die Bindung mit PT/SAP-Motiven wichtigen E2-ähnlichen Domäne aus (Abbildung 37). Für die Untersuchungen wurden HEK-293T-Zellen entweder einzeln mit oricoGagCherry (GagCherry_{WT}) oder dem Tsg101-F Expressionvektor (pcGNM2/Tsg-F) transfiziert beziehungsweise beide Konstrukte kotransfiziert. In Abbildung 38 (obere Reihe) ist das Expressionsmuster von Tsg101 bei einer alleinigen Expression dargestellt.

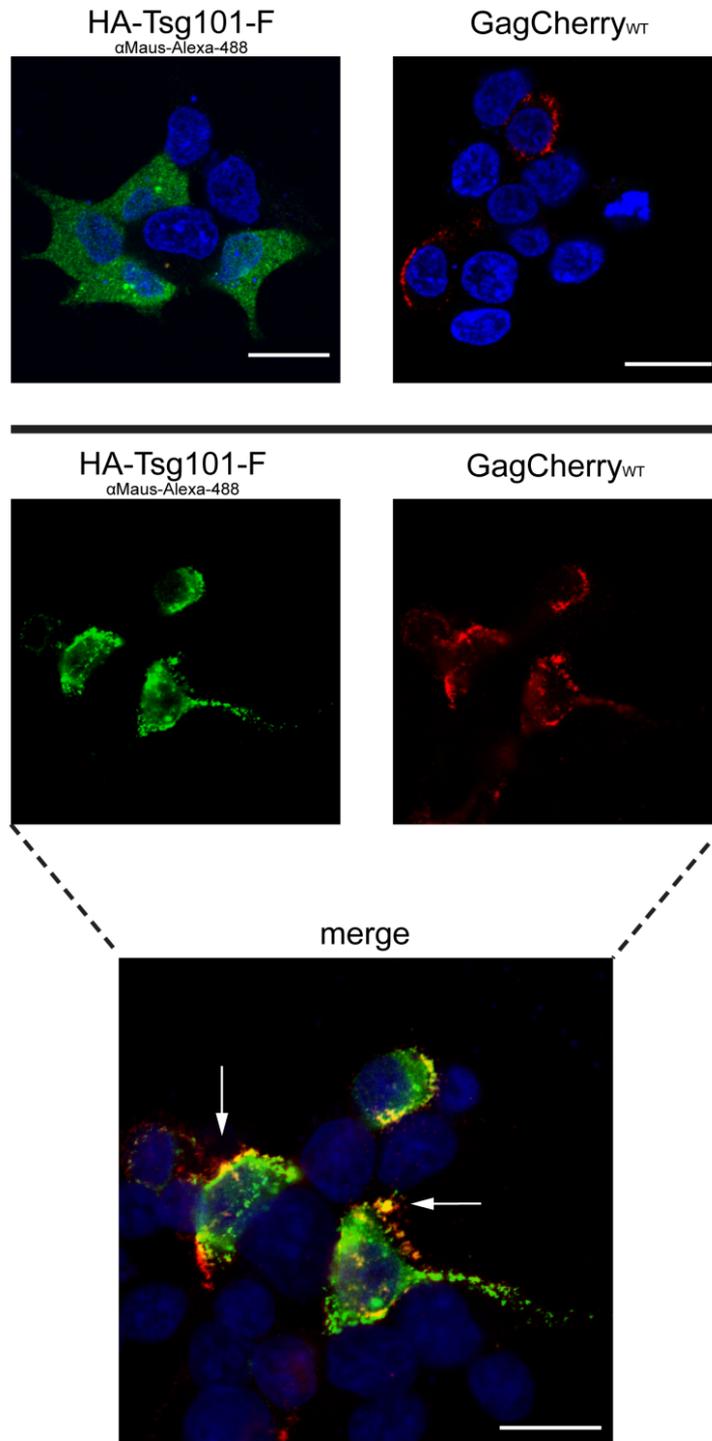


Abbildung 38: Gag und Tsg-F kolokalisieren an der Zellmembran. oricoGagCherry (GagCherry_{WT}) und HA-Tsg101-F wurden in HEK-293T-Zellen transfiziert und 16 Stunden später fixiert. Eine Färbung von HA-Tsg101-F erfolgte mit einem α-HA-Maus-Antikörper und einem Alexa-488-Antikörper gegen Maus-IgG. Die Zellkerne wurden mit DAPI nachgewiesen. Eine Kolokalisierung von Tsg101-F mit typischen Gag-Anhäufungen an der Zellmembran wird durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Die Maßeinheit des weißen Balkens ist 20 µm.

Übereinstimmend mit vorhergehenden Studien zeigte das HA-markierte Tsg101-F-Protein eine diffuse Verteilung im Zytoplasma [Dolnik *et al.*, 2010]. Zusätzlich konnten punktförmige Strukturen beobachtet werden, die den Nukleus umrandeten. Interessanterweise änderte sich das Expressionsmuster von Tsg101-F, sobald zusätzlich GagCherry_{WT} in den Zellen expremiert wurde. Hier konnte Tsg101-F in diversen Gag-Akkumulationen an der Plasmamembran detektiert werden (Abbildung 38, unten weiße Pfeile).

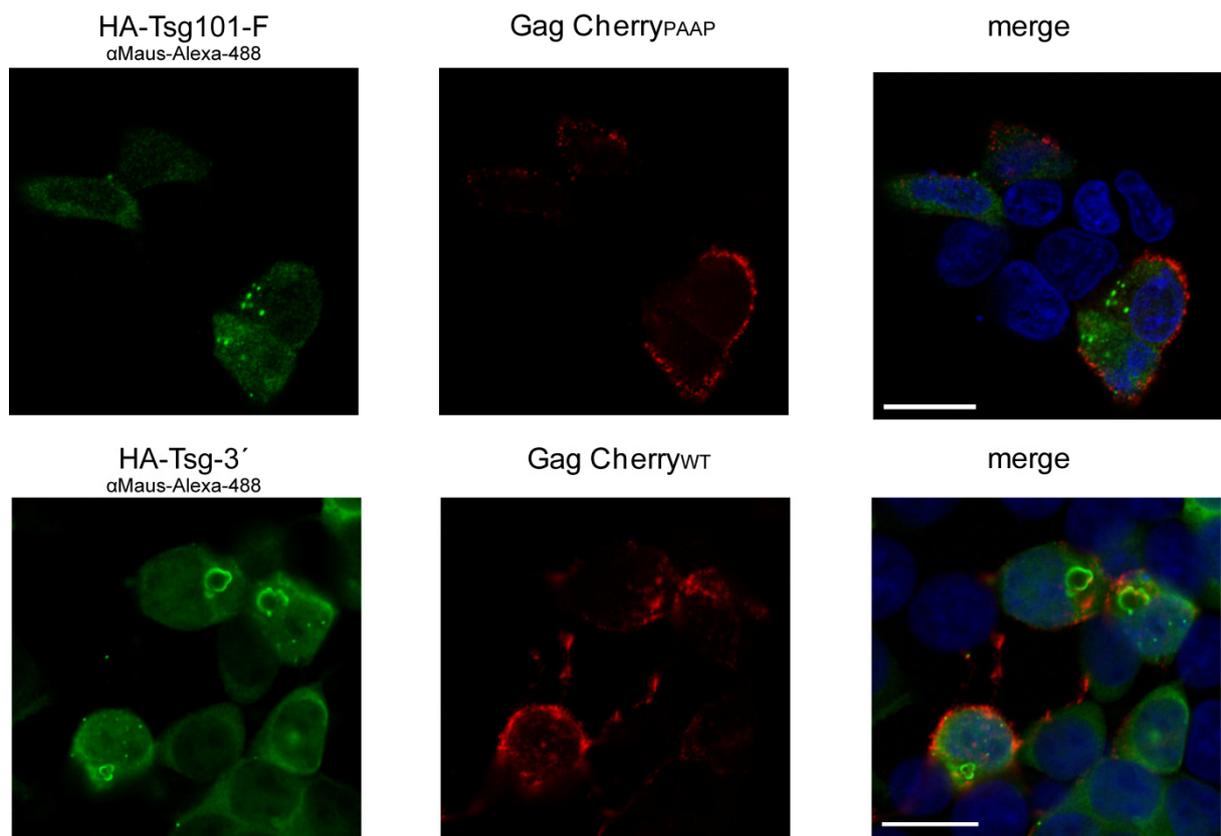


Abbildung 39: Keine Kofokalisation durch Mutationen im GagCherry und Tsg101 Konstrukt . HEK-293T-Zellen kotransfiziert mit HA-Tsg101-F bzw. seinem Derivat HA-Tsg-3' und GagCherry_{WT}/GagCherry_{PAAP}. Die Färbung von den Tsg101-Proteinen erfolgte mit einem α -HA-Maus-Antikörper und einem α Maus-Alexa-488-Antikörper. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet. Der Längenmarker entspricht 20 μ m.

Um zu überprüfen, ob die PTAP L-Domäne die Interaktion von Tsg101-F und dem Gag-Protein von HERV-K induziert, wurde eine PTAP-Mutante (GagCherry_{PAAP}) konstruiert. Hierzu wurde, wie bereits

zuvor für oriPAAPHERV-K113 beschrieben, ein Aminosäure-Austausch an der Position T254A vorgenommen. Wie in Abbildung 39 gezeigt, kam keine Kollokalisierung von Tsg101-F und GagCherry_{PAAP} zustande. Während Tsg101-F sein typisches Verteilungsmuster im Zytoplasma aufwies, akkumulierte mit Cherry markiertes Gag-Protein an der Zellmembran (Abbildung 39, Reihe 1). Daher ist ein intaktes PTAP-Motiv zwingend erforderlich, um eine Interaktion zwischen beiden Proteinen zu gewährleisten.

In der Literatur ist beschrieben, dass die PTAP L-Domäne im p6-Protein von HIV-1 an der E2-ähnlichen-N-terminalen Domäne von Tsg101 bindet [VerPlank *et al.*, 2001]. Ob eine Bindung zwischen der PTAP L-Domäne von HERV-K und Tsg101 ebenso über die E2-ähnliche-Domäne des ESCRT-Proteins erfolgt, sollte in einem weiteren Experiment geklärt werden. Hierzu wurde die Tsg101-Deletionsmutante Tsg-3', die sich durch eine fehlende E2-ähnliche Domäne auszeichnet, additional mit GagCherry_{WT} in HEK 293T Zellen transfiziert. (Abbildung 39, Reihe 2). Das Verteilungsmuster von Tsg-3' unterscheidet sich durch die Formation großer vakuoler Strukturen vom Volllängen-Konstrukt, die nicht mit dem Membran-assoziierten GagCherry_{WT} kollokalisieren. Es konnte anhand von konfokaler-Laserscanning-Mikroskopie bestätigt werden, dass das ESCRT-I-Protein Tsg101 in HERV-K Gag-Akkumulationen an der Plasmamembran lokalisiert. Diese Interaktion wird durch die Bindung des PTAP-Motivs mit der E2-ähnlichen Domäne von Tsg101 gesteuert.

3.2.2 Tsg101 stimuliert die Freisetzung der YP_{x_n}L-Mutanten

Da das Volllängenprotein Tsg101-F ausschließlich mit einer intakten HERV-K113 PTAP L-Domäne kollokalisiert, stellte sich die Frage, ob diese Interaktion eine stimulierende Wirkung auf den Budding- und Freisetzungsprozess der YP_{x_n}L-Mutanten ausüben kann. Denn, wenn die YP_{x_n}L L-Domänen durch Mutationen zerstört sind, können diese selbst nämlich keine ESCRT-Proteine mehr rekrutieren und somit ihre L-Domänen-Funktion nicht ausüben. Eine erhöhte Tsg101-Konzentration könnte aber dazu führen, dass vermehrt Tsg101-Proteine an den PTAP-Motiven binden und dadurch eine erhöhte Anzahl ESCRT-Proteine gebunden werden. Als Folge ist eine Steigerung der Freisetzung der YP_{x_n}L-mutierten Partikel denkbar.

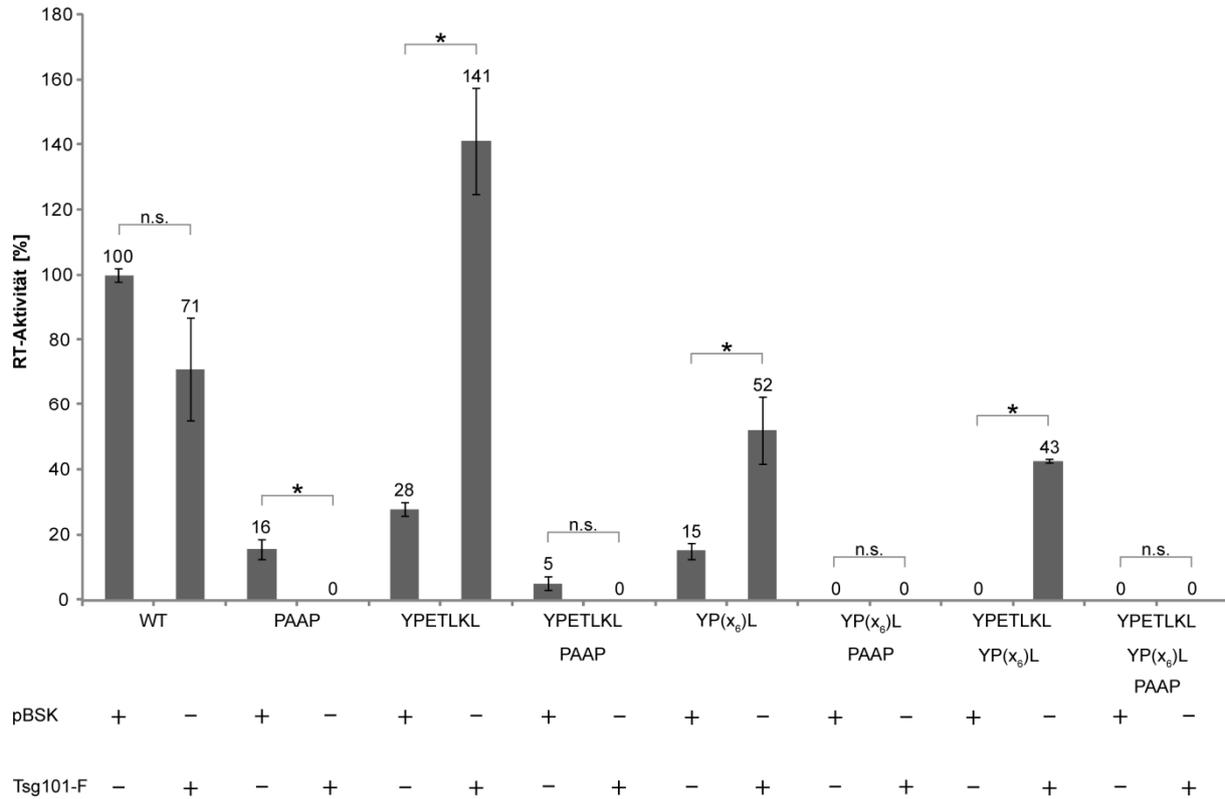


Abbildung 40: Eine Überexpression von Tsg101 stimuliert das Budding der HERV-K113 YP_x_nL-Mutanten. HEK-293T-Zellen wurden zu gleichen Teilen mit dem WT oder mit den diversen L-Domänen-Mutanten und Tsg101-F bzw. dem Leervektor pBSK transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Messung der RT-Aktivität in den Überständen der Zellen. Der ermittelte Wert für WT/pBSK wurde auf 100% gesetzt. Jeder der dargestellten Mittelwerte setzt sich aus vier Einzelmessungen zusammen. Zur Normalisierung der Werte wurde ein pGL3-Promotor Plasmid in die Zellen transfiziert, um anschließend die Lumineszenz der firefly-Luziferase in den lysierten Zellen zu bestimmen. Signifikanztest: Mann-Whitney-U Test; n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05

Um diese Vermutung experimentell zu bestätigen, wurden HEK-293T-Zellen mit jeweils 0,975 µg WT oder L-Domänen-Mutanten und je 0,975 µg Tsg101-F kotransfiziert. Zur Vermeidung von Unterschieden in der Transfektionseffizienz, wurde den Kontrollen anstelle des Volllängen-Tsg101 ein pBSK-Leervektor zugesetzt. Da bei einer Überexpression von Tsg101-F ein leichter zytotoxischer Effekt beobachtet werden konnte, wurden die Zellen zusätzlich mit 50 ng DNA des pGL3-Promotor Plasmids transfiziert. Durch die Messung der Lumineszenz in den lysierten Zellen konnten alle Werte auf die gleiche Zellzahl relativiert werden. Wie in Abbildung 40 dargestellt, war bei Zugabe von Tsg-101 eine

leichte Abnahme der RT-Aktivität messbar, wenn das PTAP-Motiv inaktiviert vorlag oder wenn alle drei p15-Motive intakt waren (WT). Im Gegensatz dazu wurde durch die Überexpression von Tsg101-F die Freisetzung von Viruspartikeln der YPETLKL- und YP(x₆)L-Mutanten mit einer intakten PTAP L-Domäne stimuliert. Infolgedessen war ein vierfach erhöhter Wert für YPETLKL/Tsg101-F (141% RT-Aktivität im Vergleich zu 28% RT-Aktivität bei YPETLKL/pBSK) und ein etwa dreifach erhöhter Wert für YP(x₆)L/Tsg101-F (52% RT-Aktivität im Vergleich zu 15% RT-Aktivität bei YP(x₆)L/pBSK) messbar. Auch die Freisetzung von Virionen der YP_{x_n}L-Doppelmutante konnte durch Zugabe von Tsg101 deutlich gesteigert werden. Um auszuschließen, dass Tsg101-F einen inhibitorischen Effekt auf das HERV-K Budding ausübt, wurde eine Transmissionselektronenmikroskopie-Analyse vorgenommen. Wie Abbildung 41 zeigt, waren Partikel in den HEK-293T-Zellen beobachtbar.

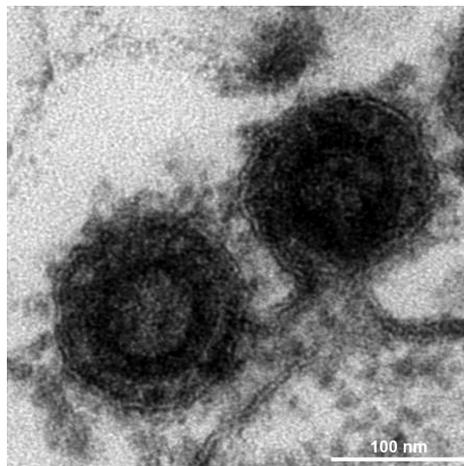


Abbildung 41: TEM-Aufnahme von WT Partikeln bei erhöhter Tsg101-Expression in HEK-293T-Zellen. Die Zellen wurden zu gleichen Teilen mit oriHERV-K113 und Tsg101 transfiziert. Nach vier Tagen wurden diese fixiert und eingebettet, um anschließend elektronenmikroskopisch untersucht zu werden.

Es konnte gezeigt werden, dass das Gag-Protein von HERV-K Tsg101 rekrutiert, um an der Membran der Wirtszelle zu assemblieren und zu budden. Eine Inaktivierung der YP_{x_n}L-Motive im p15-Protein ist für die Virusfreisetzung vernachlässigbar, solange genug Tsg101 in den Zellen bereitgestellt wird. Somit spielen diese beiden L-Domänen in HEK-293T-Zellen eine untergeordnete Rolle im Replikationszyklus von HERV-K113. In Übereinstimmung mit den Koloaliationstudien zeigte sich, dass die Bindung vom p15-Protein und Tsg101 durch das Fehlen eines funktionellen PTAP-Motivs unterbrochen wird.

3.2.3 Alix stimuliert die Freisetzung der PTAP-Mutanten

Ein weiterer Kandidat, der im HERV-K Budding eine entscheidende Rolle übernehmen kann, ist das zelluläre Protein Alix. Als Bindeglied zwischen dem ESCRT-I- und ESCRT-III-Komplexen interagiert Alix mit Tsg101 und wird als eines der ersten Proteine in der ESCRT-Protein-Kaskade aktiv [Strack *et al.*, 2003; von Schwedler *et al.*, 2003]. Vorangegangene Studien haben belegt, dass, sofern eine Interaktion mit Tsg101 nicht möglich ist, eine Überexpression von Alix den Buddingdefekt von HIV-1 PTAP-Mutanten aufhebt [Fisher *et al.*, 2007; Usami *et al.*, 2007]. Neben HIV-1 stimuliert Alix, wenn es überexprimiert wird, auch das Budding von MLV Gag sowie von RSV PPPY-Mutanten [Segura-Morales *et al.*, 2005; Dilley *et al.*, 2010]. Dabei bindet es mit seiner zentralen V-förmigen Domäne an die retroviralen YP_xL-Motive. Des Weiteren besitzt das Protein eine Bro1- und eine prolinreiche Domäne, über die es zusätzliche ESCRT-Proteine rekrutiert (Abbildung 42). Können die Viren nicht mehr über die Tsg101-induzierten-ESCRT-Proteinkaskade budden, erlauben Erhöhungen der intrazellulären Alix-Konzentrationen die Freilassung der Partikel. Um zu testen, ob eine erhöhte Alix-Konzentration sich auch auf den Freisetzungsdefekt der HERV-K PTAP-Mutanten auswirkt, wurden RT-Aktivitätsmessungen durchgeführt. Hierzu wurden HEK-293T-Zellen mit dem WT bzw. den L-Domänen-Mutanten (PAAP, YPETLKL, YPETLKL_PAAP, YP(x₆)L, YP(x₆)L_PAAP, YPETLKL_YP(x₆)L und YPETLKL_YP(x₆)L_PAAP) sowie mit einem Flag-Alix Konstrukt bzw. als Negativkontrolle, mit dem Leervektor pBSK kotransfiziert. Das mit einem Flag-Tag versehene Alix-Plasmid wurde freundlicherweise von Jörg Votteler zur Verfügung gestellt [Votteler *et al.*, 2009].



Abbildung 42: Schematische Darstellung des Alix-Proteins: Das humane Alix setzt sich aus einer N-terminalen Bro1-Domäne, einer mit YP_xL L-Domänen interagierenden V-Domäne sowie einer an Tsg101-bindenden, prolinreichen (PRR) Region zusammen. Abbildung nach Fisher *et al.*, 2007 (modifiziert).

Es stellte sich heraus, dass eine intrazelluläre Erhöhung der Alix-Konzentration den PTAP-Buddingdefekt teilweise überwinden kann (Abbildung 43). Einen besonders hohen Anstieg der gemessenen RT-Aktivität wurde für das PAAP Konstrukt in Anwesenheit von Alix beobachtet. So

erhöhte sich die RT-Aktivität etwa um das vierfache, von 19% (PAAP/pBSK) auf 70% (PAAP/Alix). Interessanterweise konnte die Überexpression von Alix jedoch nicht den WT stimulieren. Hier reduzierte sich die gemessene enzymale Aktivität um 20 %. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Studien anderer Gruppen, bei denen eine Überexpression von Alix die Freisetzung von HIV-1 WT Partikeln verhindert [Dussupt *et al.*, 2009]. Überraschenderweise stieg die detektierte Aktivität der Reversen Transkriptase in den Zellkulturüberständen der YPETLKL- und YP(x₆)L-Mutanten an. Selbst wenn beide YPx_nL-Motive nicht mehr funktionell aktiv sind, war eine gesteigerte RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen beobachtbar.

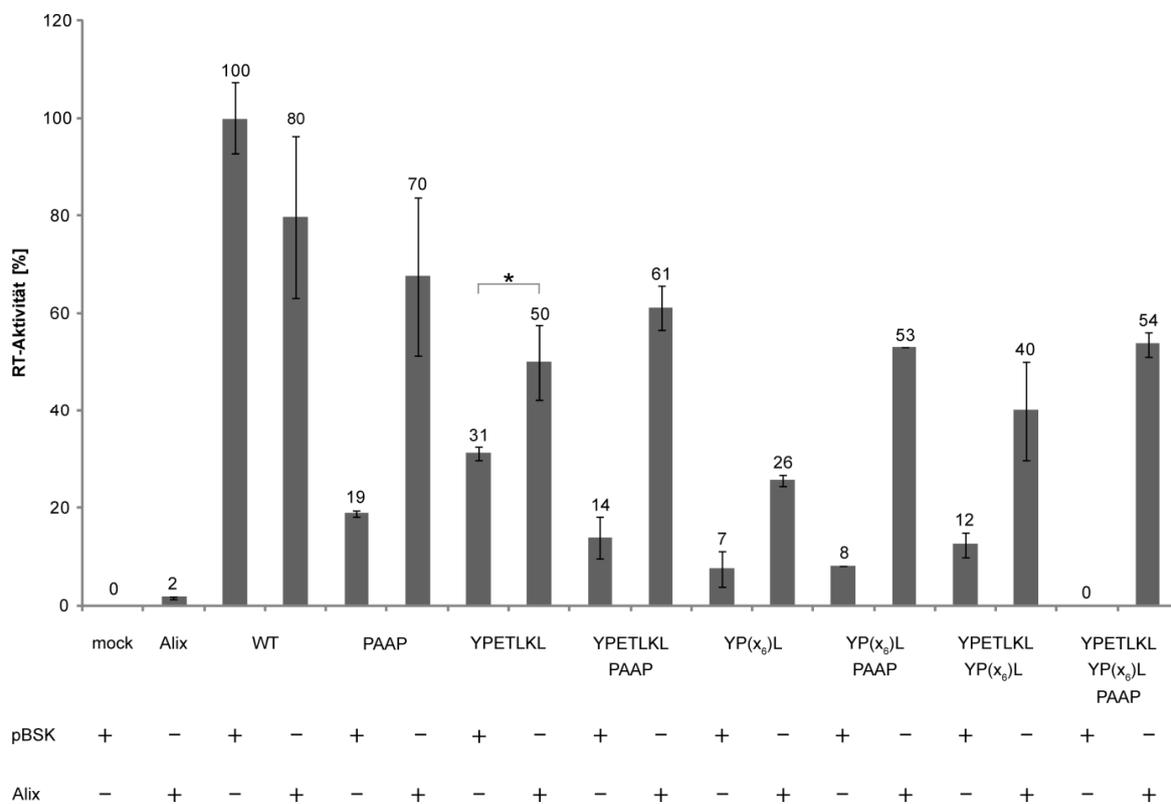


Abbildung 43: Die Überexpression von Alix stimuliert die Freisetzung der verschiedenen PTAP-Mutanten aus den Zellen. Die RT-Aktivität wurde in den Überständen der HEK-293T-Zellen zwei Tage nach der Transfektion ermittelt. Als Negativkontrolle wurden der Leervektor pBSK und Alix jeweils allein in die Zellen transfiziert. Alle hier ermittelten Mittelwerte sind aus drei Einzelmessungen hervorgegangen. Mit Hilfe eines Luziferase-Assays, wurde die Zellzahl der verschiedenen Messungen normalisiert. Zur besseren Übersicht der Daten wurde der WT/Alix-Wert auf 100% gesetzt. Signifikanztest: Mann-Whitney-U Test; *: p<0,05. Alle L-Domänen-Mutante/pBSK Werte (außer YPETLKL) sind statistisch nicht signifikant im Vergleich zu den L-Domänen-Mutante/Alix Werten.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass der PTAP L-Domänen-Defekt durch eine intrazelluläre Erhöhung der Alix-Konzentration teilweise überwunden wird. Außerdem fördert Alix das Budding der YP_nL-Mutanten. Lediglich wenn alle L-Domänen-Motive funktionell aktiv sind, hat eine Alix-Überexpression keinen stimulierenden Effekt auf das virale Budding, im Gegenteil, die virale Freisetzung wird dann sogar leicht supprimiert.

4 Diskussion

Der Austritt von Retroviren aus infizierten Wirtszellen ist ein sehr komplexer Vorgang, bei dem die Virionen zelluläre Proteine des ESCRT-Systems rekrutieren, um von der Zellmembran zu knospen. Zur Interaktion mit den zellulären Proteinen verfügen sie über Motive in ihren Hauptstrukturproteinen, die ubiquitär bei umhüllten Viren zu finden sind, die sogenannten L-Domänen. Als L-Domänen werden Motive bezeichnet, die den Buddingprozess von Viren steuern. Mutationen führen zu Assemblierungsphänotypen mit charakteristischen Defekten, wodurch sich Virionen nicht mehr von der Plasmamembran trennen können. Drei verschiedene Konsensussequenzen können bei der Regulation des retroviralen Buddings eine Rolle spielen. In dieser Arbeit sollen die L-Domänen in den Gag-Proteinen humaner endogener Retroviren der Familie K identifiziert und charakterisiert werden. Einige Mitglieder dieser evolutionär jungen HERV-Familie zeichnen sich im Gegensatz zu anderen HERV's durch vollständige Leserahmen aus und stellen die biologisch aktivste Gruppe dar. Unter diesen zählt das HERV-K113 Provirus zu den am intensivsten erforschten Mitgliedern. Aufgrund seiner intakten offenen Leserahmen für alle Gene eignet sich dieses Retrovirus besonders gut zur funktionellen Untersuchung der Gag-Proteine. Obwohl HERV-K113 sehr gut konserviert ist, besitzt es wie andere endogene retrovirale Elemente postinsertionelle Mutationen, die das Provirus im Laufe der Evolution verändert haben. Eine Folge ist der Verlust der Replikationsfähigkeit [Turner *et al.*, 2001; Beimforde *et al.*, 2008; Heslin *et al.*, 2009]. Anhand von Sequenzvergleichen mit anderen hochkonservierten, humanspezifischen HERV-K(HML-2)-Elementen wurde eine Sequenz rekonstruiert, welche dem ursprünglichen HERV-K113 zum Zeitpunkt der Integration in das menschliche Genom entsprechen soll. Mit Hilfe dieses wiederhergestellten Konstrukts wurde es möglich, die funktionellen Domänen in den Gag-Proteinen und deren Implikationen in Assemblierungs- und Buddingprozesse zu untersuchen.

4.1 Identifizierung und Charakterisierung der HERV-K L-Domänen

4.1.2 Ein PTAP-Motiv fungiert als L-Domäne

In Übereinstimmung mit vielen anderen Retroviren und umhüllten Viren konnte ein hoch konserviertes PTAP-Motiv zwischen der SP1- und der CA-Domäne des Gag-Proteins identifiziert und dessen L-Domänen-Aktivität bestätigt werden. Eine Aminosäure-Substitution des Threonin gegen ein Alanin an der Position T254A reduzierte signifikant die Freisetzung viraler Partikel aus HEK-293T-Zellen. Dies äußerte sich bei RT-Aktivitäts-Messungen in den Überständen von HEK-293T-Zellen durch eine Reduktion des viralen Enzyms auf ein Sechstel im Vergleich zum WT. Des Weiteren war der Freisetzungsdefekt mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie nachweisbar. Bei dieser Untersuchung waren die meisten Virionen in einem späten Buddingstadium arretiert. Somit lagen die detektierten Prokapside vorwiegend als unreife Buddingstrukturen vor oder waren in Ketten über Membranbrücken miteinander verbunden. Letztere kamen dreimal häufiger als beim WT vor. Die Bildung von Buddingketten legt nahe, dass Virionen nacheinander an derselben Stelle der Wirtsmembran freigesetzt werden. Eine zufällige Virusfreisetzung an beliebigen Stellen der Zelle findet daher nicht statt, vielmehr konzentriert sich die Virusabschnürung auf bestimmte „Austrittsorte“ an der Plasmamembran. Vorstellbar ist auch, dass der Austritt eines Virus an einer bestimmten Stelle die Freisetzung weiterer Viren an diesem Ort begünstigt. Dies lässt sich mit der Rekrutierung von ESCRT-Proteinen erklären, durch die weitere zelluläre Proteine an den Ort des Buddings gelangen. Da die ESCRT-Proteine mit den Gag-Vorläufern interagieren, könnten so zusätzliche Gag-Moleküle die Buddingstelle erreichen. Eine Mutation des PTAP-Motivs verhindert nun den letzten Schritt zur Abschnürung eines Prokapsids von der Membran, was zur Folge hat, dass mehrere Prokapside in einer Reihe über kleine Membranreste miteinander verknüpft sind. Identische Phänotypen konnten auch für andere Retroviren beschrieben werden, deren PT/SAP-Motiv verändert waren. Beispielsweise erhöht sich ebenfalls die Anzahl der in Buddingketten vorliegenden Prokapside um das vierfache bei einer Inaktivierung des PSAP-Motivs von MPMV. Des Weiteren stieg die Menge an gezählten Virionen, die noch einzeln mit der Plasmamembran verbunden waren und sich häufig in einem späten Knospungsstadium befanden. Dagegen wurden deutlich weniger freie Partikel außerhalb der Zelle detektiert [Gottwein *et al.*, 2003].

Eine Bestätigung des Freisetzungsdefekts der PTAP-Mutante erbrachten auch die Western Blot-Analysen. In den ultrazentrifugierten Viruspellets war die Menge des prozessierten Kapsidproteins im

Verhältnis zum WT stark vermindert. Dafür konnte in den HEK-293T-Zelllysaten eine Erhöhung des unprozessierten Gag-Vorläuferproteins detektiert werden. Die Ursache hierfür ist, dass viele unreife PAAP-Partikel noch mit der Zellmembran verbunden sind. Eine Prozessierung durch die virale Protease erfolgt in der Regel erst nach dem Ablösen der Viren von der Zelle. Dies wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Maja George bestätigt, da in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von ultrazentrifugierten Zelllysate-Pellets ausschließlich reife Partikel vorlagen [George *et al.*, 2011]. Auch in der hier vorliegenden Untersuchung konnte nur prozessiertes Kapsidprotein in den pelletierten Zelllysaten nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigen TEM-Analysen, dass die zellassoziierten HERV-K113 Buddingstrukturen immer unreif sind. Ein identisches Bild liefert das β -Retrovirus MPMV, bei dem die Gag-Prozessierung simultan mit der Freisetzung der Partikel einhergeht [Parker und Hunter, 2001]. Dass prozessiertes Kapsidprotein in Zelllysaten vorhanden ist, könnte durch die Spaltung der Vorläufer von zellulären Proteasen erklärt werden. Allerdings wäre nur ein sehr kleiner Teil der Gag-Proteine von dieser Form der Prozessierung betroffen. Vorstellbar ist weiterhin, dass die virale Protease schon während des Buddings mit der Prozessierung beginnt und nur einen kleinen Anteil der Gag-Vorläufer spaltet. Beispielsweise wird die Protease des β -Retrovirus MMTV unabhängig vom viralen Budding aktiviert, welches zu einer intrazellulären Spaltung der Proteine führt [Zábranský *et al.*, 2009]. Dennoch sind die genauen Aktivierungsmechanismen der retroviralen Proteasen noch weitgehend unbekannt.

Zusammenfassend konnten alle drei Methoden die L-Domänen-Aktivität des PTAP-Motivs bestätigen. Trotzdem führte die Inaktivierung des PTAP-Motivs nicht zu einer vollständigen Inhibition der Virusfreisetzung, so konnten auch reife Partikel detektiert werden. Zwar war die Zahl im Vergleich zum WT stark reduziert, dennoch spricht diese Tatsache für das Vorhandensein weiterer L-Domänen.

4.1.3 Zwei weitere L-Domänen des Typs YP_x_nL im p15-Protein agieren als L-Domänen

Sequenzanalysen des p15-Proteins deckten das Vorhandensein von zwei weiteren putativen L-Domänen auf. In drei voneinander unabhängigen Methoden wurde deren Einfluss auf das Buddingverhalten von HERV-K113 bestätigt. Beide Sequenzen wurden mutiert und im Cavid-Assay untersucht. Dabei zeigte sich, dass beide Mutationen eine Reduktion der RT-Aktivität in Überständen von transfizierten HEK-293T-Zellen bewirken. Interessanterweise wurde ein stärkerer Rückgang im Zusammenhang mit der Inaktivierung der in unmittelbar zum PTAP-Motiv liegenden YP_(x₆)L-Sequenz detektiert. Dieser Effekt wurde durch die Inaktivierung beider im p15-Protein liegenden YP_x_nL-Motive gesteigert. Dass trotzdem RT-Aktivität messbar war, lässt sich mit einer intakten L-Domänen-Aktivität

des PTAP-Motivs erklären, denn wenn das PTAP-Motiv ebenfalls ausgeschaltet wurde, war kaum RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen nachweisbar. Dieser Umstand konnte in den Western Blot-Analysen bestätigt werden. Während die 27 kDa Kapsidproteine aller Mutanten und des Wildtyps auch bei einer kurzen Exposition des Filmes in den ultrazentrifugierten Zelllysaten gut nachweisbar waren, wurde lediglich ein sehr schwach expremiertes Protein der Triplemutante detektiert. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass keine weiteren L-Domänen am Budding von HERV-K113 beteiligt sind, denn die Inaktivierung aller im p15-Protein identifizierten Motive verhindert die Viruspartikel Freilassung in HEK-293T-Zellen.

Des Weiteren wurde der im Cavid-Assay beobachtete Effekt der YP(x₆)L-Mutation in den Western Blot-Analysen der ultrazentrifugierten HEK-293T-Zellkulturüberstände bestätigt. Zwar ist eine Messung der RT-Aktivität sensitiver, aber auch bei der Western Blot-Untersuchung zeigte sich, dass weniger virale Partikel der YPETLKL-Mutante im Vergleich zur YP(x₆)L-Mutante freigesetzt werden. Bei der Inaktivierung beider YP_{x_n}L-Motive verstärkte sich dieser Effekt. Dabei zeichnen sich die YP(x₆)L- und die YP(x₆)L_PAAP-Mutanten durch erhöhte Konzentrationen an Gag-Vorläuferproteinen aus. Diese Beobachtung impliziert, dass die Mutation die Aktivität der viralen Protease beeinträchtigen könnte. Dass überhaupt Vorläuferprotein in den ultrazentrifugierten Viruspellets nachweisbar war, lässt sich durch das Vorhandensein von Mikrosomen erklären. Mikrosomen sind kleine membranbegrenzte Vesikel innerhalb der Zellen. Sie bestehen weitgehend aus Fragmenten des endoplasmatischen Retikulums oder zum Teil aus Plasmamembranbläschen, die sich während der Zellzerstörung gebildet haben. Bei der Ultrazentrifugation der transfizierten Zellkulturüberstände können Mikrosomen von apoptotischen Zellen in die Viruspellets gelangen. Zwar wurden die Überstände vorher mit 0,40 µm Filtern steril filtriert, Mikrosomen können aber aufgrund ihres geringen (0,02-0,2 µm) Durchmessers ungehindert hindurch dringen. Als membranumhüllte Fraktionen können die submikroskopischen zellulären Vesikel buddende HERV-K113 Virionen enthalten, deren Vorläuferproteine hauptsächlich unprozessiert sind. Weiterhin ist das Vorhandensein der Gag-Vorläuferproteine in den Viruspellets auch mit der Reifung der Partikel nach erfolgter Abschnürung von der Plasmamembran erklärbar. So zeigen die Transmissionselektronenmikroskopie-Analysen, dass die Protease hauptsächlich erst nach der Knospung die Prozessierung der Gag-Vorläuferproteine vornimmt. Dieses Experiment bestätigt also die Ergebnisse des Cavid-Assays und zeigt auf, dass durch die Mutationen der YP_{x_n}L-Motive weniger Viren in die Zellkulturüberstände gelangen.

Zur weiteren Untersuchung der Motive und deren Auswirkungen auf das Budding- und Reifungsverhalten wurde die Morphologie der mutierten Partikel überprüft. Alle untersuchten Mutanten

wiesen hierbei typische L-Domänen-Defekte auf. Eine Folge der Mutationen war die reduzierte Anzahl reifer Partikel, was auf einen Freisetzungsdefekt hindeutet. Wie bereits erläutert, findet die Reifung der viralen Partikel zum größten Teil erst nach dem Ablösen von der Zellmembran statt. Zusätzlich erhöhte sich die Menge der gezählten spät buddenden Prokapside und die Menge der Buddingketten. Auch hier wiesen die YPETLKL-Mutanten den deutlich schwächer ausgeprägten Phänotyp im Vergleich zu den YP(x₆)L-Mutanten auf. Über die Ursache hierfür kann nur spekuliert werden. Zwar wurden beide Motive durch die Substitutionen der gleichen Aminosäuren inaktiviert, bei der in unmittelbar zum PTAP-Motiv gelegenen YP(x₆)L-Sequenz haben diese aber größere Auswirkungen. Zum einen kann dies darauf zurückgeführt werden, dass andere Aminosäuren des YPETLKL-Motiv eine tragendere Rolle bei der L-Domänen-Aktivität spielen. Zum anderen könnten die variierenden Aminosäure-Sequenzen der YP_{x_n}L auch die Bindungsaffinität zu den ESCRT-Proteinen unterschiedlich stark beeinflussen. Diese Möglichkeit wird im zweiten Teil der Diskussion noch ausführlich erörtert (Diskussion, Abschnitt 4.2.3 und 4.2.5). Generell implizieren die Ergebnisse, dass die verschiedenen Motive einen unterschiedlichen Einfluss auf die Knospung der humanen endogenen Retroviren K haben.

4.1.4 Die identifizierten L-Domänen üben unterschiedlichen Einfluss auf das Budding aus

Aus den Versuchen in HEK-293T-Zellen wird geschlossen, dass das PTAP-Motiv eine dominante Rolle im Budding von HERV-K113 einnimmt. In den Western Blot-Analysen und den RT-Aktivitäts-Messungen beeinflusste die PTAP-Mutation das Budding- und Reifungsverhalten von HERV-K113 verglichen mit den Einzelmutationen der YP_{x_n}L-Motive des p15-Proteins am stärksten. Interessanterweise glichen sich die RT- und Kapsidprotein-Konzentrationen der YP_{x_n}L-Mutanten an, sobald das PTAP-Motiv zusätzlich defekt war. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Transmissionselektronenmikroskopie-Analyse. Obwohl beide YP_{x_n}L-Mutationen deutliche Effekte auf die Virionenmorphologie hatten, sind diese dennoch nicht so stark ausgeprägt wie der PAAP-Phänotyp. Dagegen weisen die Doppelmutanten mit einem zusätzlich mutierten PTAP-Motiv ähnliche Raten von reifen, freien Partikeln, Prokapsidketten und früh buddenden Virionen auf. Somit dominiert die PTAP-Inaktivierung über die Mutationen der YP_{x_n}L-Motive, welches auf die essentiellere Rolle des PTAP-Motivs im Budding von HERV-K113 schließen lässt.

Dies steht im Einklang mit Beobachtungen des Buddings von HIV-1, welches als einziges bekanntes Retrovirus ebenfalls ein PTAP-Motiv, ein YP_{x_n}L-Motiv und eine PTAP abhängige „L-Domänen ähnliche Region“ in seinem Hauptstrukturprotein enthält [Huang *et al.*, 1995; Strack *et al.*, 2003; Dussupt *et al.*, 2010]. Als primäre L-Domäne dient die PTAP-Sequenz im HIV-1 Budding, da dessen Inaktivierung

größere Auswirkungen auf die Knospung der Viren hervorruft. So reduziert sich die Virusfreisetzung in HEK-293T-Zellen im Verhältnis zum WT drastischer bei einer PTAP-Mutation (auf 3,4 %) als bei der Mutation des YP_{x_n}L-Motivs (auf 51%) [Dussupt *et al.*, 2010]. Solange das PTAP-Motiv aktiv ist, hat die sekundäre YP_{x_n}L L-Domäne also nur einen geringen Einfluss auf die HIV-1 Freisetzung [Strack *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2007]. Auch andere Retroviren mit diversen L-Domänen-Konstellationen besitzen primäre Motive, deren Aktivität häufig von einem zusätzlichen Motiv unterstützt wird. Beispielsweise fungiert das MPMV PSAP-Motiv als sekundäre L-Domäne und das nur in Kontext mit einem intakten PPPY-Motiv. Der Phänotyp der PSAP-Mutation ist weniger deutlich als der der PPPY-Mutation, da sich die Freisetzung der PSAP-Mutanten aus den Zellen nur um etwa die Hälfte verringerte [Gottwein *et al.*, 2003]. Es kann daher vermutet werden, dass wie bei anderen Retroviren üblich, das PTAP-Motiv von HERV-K113 als Hauptdomäne agiert, während die zwei YP_{x_n}L-Motive nur als Ergänzung am Budding beteiligt sind.

Einen weiteren Hinweis auf die Dominanz des PTAP-Motivs im HERV-K Budding erbrachten die Sequenzvergleiche verschiedener HERV-K(HML-2)-Elemente. Es zeigte sich, dass beide YP_{x_n}L-Motive weit konservierter als das PTAP-Motiv vorliegen. Infolgedessen besitzen drei von 13 HERV-K(HML-2)-Typen veränderte PTAP-Sequenzen, während alle Elemente eine unveränderte Konsensussequenz YPETLKL aufweisen beziehungsweise 12 ein intaktes YP(x₆)L-Motiv tragen. Eine mögliche Erklärung ist der ständige Selektionsdruck durch das Wirtsimmunsystem, dem die endogenen viralen DNAs, RNAs und Proteinsequenzen ausgesetzt sind. Dabei findet ein höherer Selektionsdruck eher in Regionen statt, die essentiell für die virale Replikation sind. Demzufolge schützt sich der Wirtsorganismus vor potentiellen Erkrankungen durch die Freisetzung viraler Partikel. Somit sind Mutationen im PTAP-Motiv für den Wirt von Vorteil, da dieses eine bedeutendere Rolle bei der Virusknospung spielt. Die beiden YP_{x_n}L-Motive könnten demnach eher untergeordnete Funktionen übernehmen. Sollten die Mutationen bereits vor der Integration stattgefunden haben, ist das ein Indiz dafür, dass Retroviren durch das Vorhandensein mehrerer L-Domänen abgesichert sind, so dass auch bei dem Ausfall einer wichtigen Domäne eine Verbreitung dieser ermöglicht wird.

Wie bereits erwähnt, verursacht die YPETLKL-Mutation den moderatsten Budding-defekten-Phänotyp. Da in dieser Region alle untersuchten HERV-K(HML-2)-Sequenzen unverändert waren, spricht dies zusätzlich für den schwachen Einfluss auf das HERV-K Budding. Zudem kann aus den in Experimenten ermittelten Daten geschlossen werden, dass Mutationen dieses Motivs die geringsten Auswirkungen auf die HERV-K113 Virusfreisetzung haben. Über den Grund, weshalb überhaupt zwei L-Domänen des gleichen Typs im Gag-Protein vorhanden sind, kann nur spekuliert werden. Vorstellbar ist, dass beide

YP_x_nL-Motive miteinander interagieren und sich so beim Buddingprozess ergänzen. Erst in dem Zusammenspiel beider könnten vielleicht genug ESCRT-Proteine rekrutiert werden, um das HERV-K Budding zu steuern. Ein Indiz für die These ist die Tatsache, dass mit der Inaktivierung beider YP_x_nL-Sequenzen eine starke Reduktion sowohl der RT-Aktivität (um 94% im Vergleich zum Wildtyp) als auch der Kapsidproteine in HEK-293T-Zellkulturüberständen einhergeht. Diese Effekte sind ähnlich stark wie bei einem PTAP-Defekt ausgeprägt. Hingegen haben die einzelnen Mutationen der YP_x_nL-Motive vergleichsweise wenig Auswirkung auf die Freisetzung viraler Partikel. Eine ähnliche Situation ist in der Literatur für HIV-1 beschrieben, bei der das PTAP-Motiv mit einer im NC-Protein liegenden Region interagiert. Nur durch diese funktionelle Verbindung kann die PTAP L-Domäne ihre Aktivität entfalten [Dussupt *et al.*, 2011]. Generell zeigen diverse wissenschaftliche Studien, dass obwohl L-Domänen autonom agieren, ihre Wirkung doch stark geschwächt wird, wenn diese aus ihrer nativen Umgebung entfernt werden [Parent *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Martin-Serrano *et al.*, 2004; Ott *et al.*, 2005]. Ein Zusammenspiel beider YP_x_nL-Motive ist daher wahrscheinlich. Dies sind jedoch lediglich Vermutungen, die durch weitere Analysen bestätigt werden müssten.

4.1.5 Die HERV-K L-Domänen begünstigen die Virusfreisetzung zelltypabhängig

In der Teratokarzinomzelllinie Tera-1 veränderte sich das Buddingverhalten der L-Domänen-Mutanten. Zwar konnte bei allen untersuchten Mutanten eine Reduktion der gemessenen RT-Aktivität im Cavid-Assay im Vergleich zum WT festgestellt werden, diese waren jedoch weitaus schwächer ausgeprägt als in HEK-293T-Zellen. Besonders auffällig ist der Effekt der PTAP-Mutation. In den Tera-1-Zellen ist die detektierte RT-Aktivität im Verhältnis zum Wildtyp um weniger als die Hälfte verringert. Zwar belegen TEM-Aufnahmen eindeutig einen charakteristisch defekten L-Domänen-Phänotyp, dennoch wird auch bei dieser Methode die schwächere Ausprägung erkennbar. So wurden weniger Buddingketten als in HEK-293T-Zellen beobachtet.

Ein zelltypabhängiger Einfluss der L-Domänen auf das Budding ist auch für andere Retroviren postuliert. Beispielsweise inhibiert die Inaktivierung des HIV-1 PTAP-Motivs die Partikelfreisetzung in HEK-293T- oder HeLa-Zellen fast vollständig. Andererseits hat die Mutation in einigen T-Zelllinien keine bzw. nur eine schwache Auswirkung auf die Virusproduktion. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das PTAP-Motiv in T-Zelllinien oder primären Lymphozyten vor allem für die Virionen-Virionen-Trennung verantwortlich ist, während es in adhärennten Zellen wie Makrophagen eher die Virionen-Zell-Ablösung verursacht [Demirov *et al.*, 2002]. Es ist möglich, dass auch das HERV-K113 PTAP-Motiv

unterschiedliche Effekte auf die Abschnürung der Virionen in verschiedenen Zelllinien ausübt. Somit lassen sich die vermehrt vorkommenden PAAP Buddingketten in HEK-293T-Zellen erklären.

Weiter wurde beobachtet, dass die einzelnen Mutationen in den YP_x_nL-Motiven ähnliche Auswirkungen auf die Partikelfreisetzung in Tera-1-Zellen haben. Trotzdem reduziert sich die gemessene RT-Aktivität anders als in HEK-293T bei den Doppelmutanten nur um 70%. Und selbst wenn alle identifizierten L-Domänen mutiert sind, können im Vergleich zum WT noch 20% der Viren aus der Zelle knospen. Für diesen Umstand gibt es mehrere Erklärungen. Eine Ursache könnte sein, dass sich Substitutionen anderer Aminosäuren in den L-Domänen-Sequenzen effizienter auf die Virusfreisetzung auswirken. Es wurden zwar Mutationen in den HERV-K113 L-Domänen eingeführt, von denen bereits in Studien nachgewiesen wurde, dass sie eine Inaktivierung der Motive hervorrufen, doch könnten andere Aminosäure-Substitutionen einen größeren Effekt beispielsweise auf die Interaktion mit den ESCRT-Proteinen haben. Schon im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte nachgewiesen werden, dass andersartige Austausche der Aminosäuren im PTAP-Motiv das HERV-K113 Budding unterschiedlich beeinflussen. Beispielsweise führte die Substitution der Proline in Alanine in kodonoptimierten oricoHERV-K113 Konstrukten zu einem schwachen L-Domänen negativen Phänotyp. Die Mutation an Position T254A hingegen beeinflusste die Virusproduktion im hohem Maße und auch die Gag-Gag-Bindung schien beeinträchtigt zu sein. Allerdings konnte eine Behinderung der Gag-Dimerisierung im nicht-kodonoptimierten Konstrukt widerlegt werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Tera-1-Zellen HERV-K exprimierende Zellen sind, könnten sich zudem Mischviren bilden, die sich aus mutierten und nichtmutierten Gag-Proteinen zusammensetzen. Dies dürfte erklären, dass selbst bei der Inaktivierung aller im p15-Protein lokalisierten L-Domänen noch 20% der Viren aus der Zelle freigesetzt werden.

Als weitere Ursache kommen unterschiedliche Proteinverhältnisse in den Zellen in Frage. Daher könnten je nach Zelltyp die Bedeutung der diversen L-Domänen-Motive in Abhängigkeit von den ESCRT-Protein-Konzentrationen in den Zellen variieren, denn die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eindeutig, dass die HERV-K113 L-Domänen-Aktivität abhängig von der ESCRT-Maschinerie der Wirtszelle ist (Diskussion, Abschnitt 4.2).

Weiterhin sollte Ubiquitin eine wichtige Rolle für die Viruspartikel-Freisetzung trotz Inaktivierung aller im p15-Protein lokalisierten L-Domänen spielen. Ubiquitin ist ein kleines, aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein, welches ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Als posttranslationale Modifikation kann es kovalent an ein Lysin des Zielproteins gebunden werden. Anzahl

und Art der Ubiquitinierung sind entscheidend für die zelluläre Reaktion. Eine Polyubiquitinierung mit mindestens vier Molekülen ist ein Signal zum Abbau des Zielproteins durch das Proteasom. Hingegen werden monoubiquitinierte Proteine häufig sortiert und für den endosomalen Signalweg in multivesikuläre Abschnürungen internalisiert.

Verschiedene Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen einer Ubiquitinierung und der Freisetzung von Retroviren auf. Besonders interessant ist die bis zu fünffach höhere Konzentration von Ubiquitin in Virionen im Vergleich zu den Konzentrationen in der Wirtszelle [Putterman *et al.*, 1990]. Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass ein kleiner Anteil der Gag-Proteine verschiedener Retroviren ubiquitiniert vorliegt [Ott *et al.*, 1998]. Eine Ubiquitinierung von HIV-1 Gag scheint mit dessen Multimerisierung und Anheftung an der Plasmamembran assoziiert zu sein [Jäger *et al.*, 2007]. Der Buddingdefekt von EIAV Δ YPX_nL-Mutanten konnte sogar durch die Fusion eines Monoubiquitins an das Gag-Protein überwunden werden. Verschiedene Studien zeigen zudem, dass L-Domänen die Gag-Ubiquitinierung positiv oder negativ regulieren können [Strack *et al.*, 2000; Martin-Serrano *et al.*, 2004; Gottwein *et al.*, 2005]. Alle diese Indizien sprechen für eine Beteiligung von Ubiquitin an der Freisetzung von Retroviren. Vorstellbar ist daher auch die potenzielle Mitwirkung von Ubiquitin am HERV-K Budding. Somit könnten die Virionen erklärt werden, die trotz Defekt aller L-Domänen-Motive in die Überstände der HEK-293T- und Tera-1-Zellen freigesetzt werden. Zwar sind es nur sehr wenige Viren, diese könnten aber durch die unterstützende Funktion des Ubiquitins budden. Denkbar ist zudem, dass die Tera-1-Zellen geringere Mengen an zellulären Proteinen, die an den Assemblierungs- und Knospungsprozessen beteiligt sind, aufweisen, als HEK-293T-Zellen und so Ubiquitin in dieser Zelllinie eine bedeutende Rolle beim HERV-K113 Budding einnimmt. Aus diesem Grund könnten L-Domänen-Defekte in den Tera-1-Zellen durch Ubiquitin oder Monoubiquitinierung der Gag-Proteine eher überwunden werden. So lassen sich die weniger stark ausgeprägten L-Domänen-Defekte in dieser Zelllinie erklären. Um diese These zu überprüfen, sollten ultrazentrifugierte Viruspellets aus unterschiedlichen Zelltypen auf deren Ubiquitin-Konzentrationen untersucht werden. Zusätzlich ist der Einfluss eines an das Gag-Protein angehängten Monoubiquitins auf die L-Domänen-Mutanten in verschiedenen Zelllinien zu überprüfen. Von Interesse ist auch die Auswirkungen einer Blockierung des Proteasoms auf den Lebenszyklus von HERV-K. Bei HIV-1 beispielsweise bewirkt die Hemmung des Proteasoms neben der Inhibition der Freisetzung viraler Partikel den von viralen Proteinen induzierten Abbau der antiviral wirkenden Faktoren APOBEC3G und CD-317 (Tetherin) [Vötteler, *Retrovirus Bulletin* 4, 2009].

Um die hier diskutierten unterschiedlichen Effekte der L-Domänen-Mutationen besser einordnen zu können, ist die Untersuchung der Funktionalität der L-Domänen in weiteren Zelllinien in Erwägung zu ziehen.

4.1.6 Mutationen eines putativen L-Domänen-Motivs im Kapsidprotein inhibiert die Virusproduktion

Neben den beiden YP_x_nL L-Domänen konnte ein Motiv mit einer ähnlichen Sequenz im CA-Protein ausgemacht werden. Durch den Austausch von Tyrosin gegen Serin (Y451S), eines Prolins gegen Arginin (P452R) und eines Leucins gegen Alanin (L458A) sollte das putative L-Domänen-Motiv inaktiviert werden. Tatsächlich führen die Mutationen zu einer kompletten Inhibition der Virusproduktion. Weder mit der Western Blot-Analyse noch mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie waren virale Partikel detektierbar. Auch im hoch sensitiven Cavid-Versuch konnte für die YPD(x₄)L-Mutante kaum und für die YPD(x₄)L_PAAP Mutante überhaupt keine enzymatische Aktivität gemessen werden.

Diese Ergebnisse decken sich mit früheren genetischen Analysen, wobei partielle Deletionen oder Substitutionen in hoch konservierten, 20 Aminosäure umfassenden Sequenzen in den retroviralen Kapsidproteinen, signifikante Auswirkungen auf die Virus-Produktion haben (Strambio-de-Castillia and Eric Hunter, 1992, Mammano *et al.*, 1994, Chang *et al.*, 2007). Interessanterweise konnte anhand eines Sequenzvergleichs mit zwölf anderen Retroviren festgestellt werden, dass das YPD(x₄)L-Motiv sich in einem solchen, als MHR („major homology region“)-Region deklarierten Bereich von HERV-K113, befindet (Abbildung 44). Schon 1985 gelang es der Arbeitsgruppe um Patarca, die MHR-Domänen als am stärksten konservierte Sequenzen in den Gag-Proteinen der Orthoretroviren zu identifizieren [Patarca *et al.*, 1985]. Auch in einer Kollektion aus diversen anderen revers transkribierenden Elementen wie z.B. Hepadnaviren, dem Hefe Retrotransposon Ty₃, Line-Elementen und in telomerischen Transposons von *Drosophila* wurden MHR-Regionen gefunden [McClure, 1991; Orlinky *et al.*, 1996; Pardue *et al.*, 2005; Zlotnick *et al.*, 1998]. Zwar variieren die Übereinstimmungen der Aminosäure-Sequenzen von Retrovirus zu Retrovirus, aber 6 von 20 AS sind vollständig konserviert oder unterscheiden sich in nur einer Substitution [Wills *et al.*, 1991].

	h	h	h	h	Übereinstimmung
HERV-K113	V R Q G S K E P Y P D F V A R L Q D V A				
JSRV	V R Q G P D E P Y Q D F V A R L L D T I				70%
MPMV	V K Q G P D E P F A D F V H R L I T T A				55%
SIV	V K Q G P D E P F A D F V H R L I T T A				55%
SFV	V K Q G P D E P F S E F V H R L M T T A				50%
MVV	V K Q K N T E S Y E D F I A R L L E A I				45%
HIV-1	I R Q G P K E P F R D Y V D R F Y K T L				45%
HTLV-1	I L Q G L E E P Y H A F V E R L N I A L				45%
MMTV	L K Q G N E E S Y E T F I S R L E E A V				35%
RSV	I M Q G P S E S F V D F A N R L I K A V				35%
FeLV	V V Q G K E E T P A A F L E R L K E A Y				35%
BaEV	I T Q G K D E S P A A F M E R L L E G F				30%
MoMuLV	I T Q G P N E S P S A F L E R L K E A Y				30%

Abbildung 44: Sequenzhomologie von 13 verschiedenen retroviralen MHR-Regionen. Positionen mit absoluten Übereinstimmungen sind schwarz, Positionen mit fast identischen Sequenzen (mit je einer Abweichung) lila umrandet. Der Buchstabe h deklariert konservierte hydrophobe Aminosäuren in den MHR-Regionen. Die Übereinstimmung der Sequenzen mit der HERV-K113 Sequenz ist in Prozent dargestellt. Abbildung teilweise verändert nach Strambio-de-Castillia und Hunter.

Diese evolutionäre Konservierung der MHR-Domänen lässt eine bedeutende Rolle im viralen Lebenszyklus vermuten. So führen Mutationen im Leucin (L163H) der MHR-Domäne bei MPMV zu einem vollständigen Stopp der Virusfreisetzung [Strambio-de-Castillia und Hunter, 1992]. Ähnliche assemblierungsdefekte Phänotypen treten bei dem Austausch der korrespondierenden Aminosäuren in HIV-1 (F168A) und RSV (L171F) auf [Craven *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2007]. Dieser Effekt kann nun auch bei HERV-K113 beobachtet werden, da eine Substitution des Leucins im MHR-Bereich vorgenommen wurde. Aufgrund dieser Tatsachen wird ein Zusammenhang zwischen der Inhibition der Virusproduktion durch Mutationen des YPD(x₄)L als L-Domänen-Defekt bezweifelt, vielmehr ist anzunehmen, dass die Mutationen die essentielle Gag-Gag-Interaktion während der Virus Assemblierung verhindert. Normalerweise bildet die MHR-Domäne eine kompakte Strang-Turn-Helix-Struktur, bei denen die am konserviertesten Aminosäuren Wasserstoffbrückenbindung bilden, um stabile Konformationen zur Gag-Dimerisierung bereitzustellen [Gamble *et al.*, 1997; Ivanov *et al.*, 2007]. Ein weiteres Indiz gegen eine Funktion als L-Domäne der YPD(x₄)L-Sequenz ist die Tatsache, dass bisher keine L-Domänen in den Kapsidproteinen der Retroviren identifiziert wurden. Vielmehr beschränkt sich die Lokalisation solcher funktioneller Domänen auf die Bereiche zwischen dem Matrix-

und Kapsidprotein oder auf die C-terminal gelegenen Proteine der Gag-Vorläufer (Einleitung, Abschnitt 1.5.2.1). Des Weiteren spricht die Tatsache, dass die Inaktivierung aller im p15-Protein lokalisierten L-Domänen zu einer annähernd vollständigen Inhibition der Virusfreisetzung in HEK-293T-Zellen führt, gegen eine Beteiligung des YPD_(x4)L-Motivs am Budding von HERV-K113.

Der endgültige Beweis, dass dieses Motiv keine L-Domänen-Aktivität besitzt, konnte aber nicht erbracht werden. Die Mutationen stören den HERV-K-Lebenszyklus in einem früheren Stadium, so dass die Assemblierung und das Budding der Viren nicht mehr stattfinden kann. Zur Klärung dieser Frage empfiehlt es sich, Bindestudien mit den ESCRT-Proteinen durchzuführen, denn alle bisher identifizierten L-Domänen interagieren mit bestimmten ESCRT-Proteinen, damit das Budding der Viren gewährleistet ist (Diskussion, Abschnitt 4.2).

4.1.7 QP1 und QP2 sind nicht am Budding- und Assemblierungsprozess beteiligt

Erst 2011 fand unsere Arbeitsgruppe im Gag-Protein von HERV-K113 zwei C-terminal lokalisierte Peptide, deren Funktion bisher völlig ungeklärt ist [George *et al.*, 2011]. Auch einige andere Retroviren besitzen kleine C-terminale Peptide, die die Gag-Proteine flankieren. Dazu zählen die Lentiviren EIAV und HIV-1. Chen *et al.* zeigte, dass verschiedene Verkürzungen des C-terminalen p9-Proteins von EIAV zu replikations-defekten Phänotypen führen [Chen *et al.*, 2001]. So ist unter anderem die Virusproduktion der p9-Mutanten, die kein YPDL-Motiv tragen, supprimiert [Puffer *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001]. Ein solcher Phänotyp wird typischerweise mit L-Domänen negativen Mutanten in Verbindung gebracht. Ebenso ist das Linker-Protein von HIV-1 an den Abnabelungen der Viren von der Wirtszellmembran beteiligt [Huang *et al.*, 1995]. Die Untersuchung der QP1- und QP2-Peptide auf eine mögliche L-Domänen-Aktivität lag daher nahe. Im Cavidi-Assay wies die QP1/2 defiziente Mutante keinen Rückgang der RT-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp auf. Nur eine zusätzliche Einführung einer PTAP-Mutation (T254A) verringerte wie erwartet die in Zellkulturüberständen von HEK-293T-Zellen detektierte RT-Aktivität. Ebenso wenig beeinträchtigt die Deletion der QP1/2-Peptide die Gag-Expression der Mutanten. Überraschenderweise erhöhte die Verkürzung des Gag-Proteins die Virus-Freisetzung geringfügig. Eine Begründung könnte die schnellere Autoaktivierung der Protease in Abwesenheit der Peptide sein. Die Morphologie der Viruspartikel entsprach jedoch den des WT's beziehungsweise der PAAP Partikel. Somit kann eine Beteiligung der QP1/2-Proteine an der viralen Assemblierung und Knospung von der Plasmamembran ausgeschlossen werden. Damit kann QP1/2 mit dem p4-Protein des nahen Verwandten MPMV verglichen werden [Henderson *et al.*, 1985]. Neben

vergleichbarer molarer Masse besitzen sie auch teilweise Sequenzhomologien. Außerdem verfügen die Proteine über prolin- und glutaminreiche Abschnitte. Allerdings konnte bisher auch dem p4-Protein keine Funktion zugeordnet werden, so dass über die Aufgaben beider Proteine im retroviralen Replikationszyklus nur spekuliert werden kann.

4.2 Das HERV-K Budding ist von dem ESCRT-Protein-Signalweg abhängig

Neben der im ersten Teil der Arbeit beschriebenen Identifizierung und der Charakterisierung der L-Domänen von HERV-K113 soll nun auch deren Zusammenspiel mit zellulären Proteinen untersucht werden. Der Fokus der Analysen lag dabei auf bestimmten Proteinen des ESCRT-Systems, denen eine Mitwirkung am Budding anderer umhüllter Viren, insbesondere von Retroviren, nachgewiesen wurde. Die Proteine des ESCRT-Multiproteinkomplexes sind hoch konserviert und von *Archaea* bis zu den Säugetieren, zu finden. Mit ihrer Hilfe können sich Membraneinstülpungen abschnüren, die bei den letzten Schritten der Zytokinese und der Bildung intraluminärer Vesikel in Endosomen („multivesikuläre bodies“) entstehen. Um an der Plasmamembran zu knospen, sind Retroviren in der Lage, die Proteine des MVB-Signalweges zu rekrutieren.

4.2.1 Das PTAP-Motiv rekrutiert Tsg101 zur Wirtszellmembran

Tsg101 wurde 2001 als erster Faktor beschrieben, der das Budding von HIV-1 maßgeblich reguliert [Garrus *et al.*, 2001; Martin-Serrano *et al.*, 2001; VerPlank *et al.*, 2001]. Als Mitglied der ESCRT-I-Familie bindet Tsg101 an PSAP-ähnliche Motive der ESCRT-0-Komponenten. Das hat die Rekrutierung weiterer ESCRT-Proteine zur Folge. Über ihre PT/SAP-Motive sind diverse Retroviren aber auch andere umhüllte Viren nun in der Lage Tsg101 zu binden, um über diese Interaktion mit Hilfe der ESCRT-Maschinerie an der Plasmamembran der Wirtszelle zu buddieren [Bouamr *et al.*, 2003; Gottwein *et al.*, 2003; Pornillos *et al.*, 2003; Segura-Morales *et al.*, 2005; Dolnik *et al.*, 2010]. Wegen dieser in der Literatur beschriebenen Bindung viraler PT/SAP-Motive an das zelluläre Tsg101-Protein ergab sich die Frage, ob das HERV-K Gag-Protein ebenfalls mit Tsg101 interagiert.

Anhand von Kollaborations-Experimenten konnte bestätigt werden, dass beide Proteine in räumlicher Nähe zueinander liegen. Es zeigte sich, dass diese angehäuften an der Plasmamembran der HEK-293T-Zellen lokalisiert sind. Bei einer Inaktivierung des PTAP-Motivs änderte sich das. Zwar befanden sich

die Gag-Proteine an der Wirtszellmembran, Tsg101 lag jedoch diffus in der Zelle verteilt vor. Auch eine Deletion der Gag-bindenden Domäne von Tsg101 (Tsg-3') inhibierte eine Ansammlung beider Proteine an der Plasmamembran. Aus diesen Ergebnissen geht eindeutig hervor, dass nur ein intaktes PTAP-Motiv in der Lage ist, Tsg101 über seine N-terminale Domäne an die Stellen der viralen Abschnürung zu rekrutieren. Dabei wird das Gag-Protein unabhängig von einem aktiven PTAP-Motiv über einen Myristinsäurerest an der Zellmembran befestigt und aggregiert mit weiteren Gag-Proteinen. Tsg101 gelangt nun durch ein aktives PTAP-Motiv in die räumliche Nähe der Gag-Akkumulationen, wo es über eine, durch zwei Helices gebildete, Furche seiner E2-ähnlichen Region an das PTAP-Motiv bindet. Wie bereits beschrieben, rekrutiert normalerweise Hrs als ESCRT-0-Protein das ESCRT-I-System über seine PSAP-Sequenz. Somit imitieren HERV-K sowie andere umhüllte Viren Hrs, um über ihre PT/SAP-Motive Tsg und weitere Proteine „downstream“ des Signalweges zu rekrutieren. Dabei spielen Hrs beziehungsweise andere ESCRT-0-Komponenten keine Rolle mehr. Sind die ESCRT-I-Mitglieder an den Buddingstellen angekommen, werden Proteine der anderen ESCRT-Komplexe rekrutiert. Abschließend wird über diesen Signalweg die Membraneinstülpung und die Abschnürung der viralen Partikel katalysiert. Aus den Daten der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie geht hervor, dass HERV-K genau diesen Weg zum Budden benutzt.

Trotz der klaren Ergebnisse aus dem Kolo-kalisation-Experiment und die bereits in der Literatur für andere Viren bestätigte PT/SAP-Tsg101-Bindung, sollten weitere Versuche die Interaktion für HERV-K verifizieren. Insbesondere ein Koimmunpräzipitation-Versuch sollte in Betracht gezogen werden. Zusätzlich empfiehlt es sich, Biacore-Messungen als Protein-Protein Interaktions-Analyse durchzuführen. Mit dieser Methode kann neben der Spezifität der Interaktion auch die Bindungsaffinität bestimmt werden. Wie bereits erwähnt, könnten verschiedenartige Aminosäure-Substitutionen im PTAP-Motiv unterschiedlichen Einfluss auf den Phänotyp der L-Domänen-Mutanten haben. Dabei könnte besonders die Bindungsaffinität zu Tsg101 betroffen sein, weshalb eine Biacore-Messung mit verschiedenen PTAP-Mutanten interessant wäre. Außerdem könnte mit diesem Versuch geklärt werden, inwieweit die Mutationen in den PTAP-Sequenzen von HERV-K104, HERV-K107 und Q9HDB9 die Bindung zu Tsg101 und somit das Budding dieser HERV-K(HML-2)-Mitglieder beeinflussen.

4.2.2 Eine Überexpression des verkürzten Tsg-Proteins Tsg-3' beeinflusst die ESCRT-Maschinerie

Eine Mutante von Tsg101, Tsg-3', welches sich durch eine fehlende PT/SAP-Interaktions-Domäne auszeichnet, konnte in den Gag-Ansammlungen an den Plasmamembranen der HEK-293T-Zellen nicht lokalisiert werden. Neben diesem Effekt war die Bildung von sehr großen Vakuolen-ähnlichen Strukturen im Zytoplasma als Folge der Überexpression von Tsg-3' sichtbar. In der Literatur werden diese Strukturen als TICS („TSG-3'-induced cellular structures“) bezeichnet. Während RSV und MLV Gag selektiv in diese Strukturen rekrutiert werden, ist dies für HIV-1 Gag ausgeschlossen [Johnson *et al.*, 2005]. Ebenso wenig wird HERV-K Gag in diese Strukturen eingelagert, da die detektierten Gag-Proteine nicht in der räumlichen Nähe der TICS lokalisiert waren.

Räumlich sind die TICS nicht von einer limitierenden Membran umgeben, sondern stellen eine Ansammlung von Proteinen dar, die durch Protein-Protein-Interaktionen zusammengehalten werden [Johnson *et al.*, 2005]. Von besonderer Bedeutung für den zellulären MVB-Signalweg ist die Einlagerung endogener Tsg101-Proteine sowie freier Ubiquitinmoleküle in die TICS, während andere ESCRT-Proteine weiterhin frei im Zytoplasma verteilt sind.

Aufgrund der morphologischen Veränderung der Zelle, verursacht durch diese nichtendozytischen Strukturen, ist das HIV-1, RSV und MLV Budding gestört und auch das HERV-K Budding ist von dieser Beeinträchtigung durch Tsg-3' betroffen [Goila-Gaur *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2005]. Das belegten die Untersuchungen einer Überexpression von Tsg-3' im Cavid-Assay, bei der keine RT-Aktivität viraler Partikel in den transfizierten Zellkulturüberständen messbar war (Daten nicht gezeigt). Somit könnte eine Tsg-3'-Expression auch zu einer Inhibition des HERV-K Buddings führen. Dabei sind die Mechanismen unterschiedlich, über die Tsg-3' das retrovirale Budding behindert. Bei RSV und MLV konkurrieren das Budding und die Einlagerung der Gag-Proteine in die TICS miteinander. Inwieweit die HIV-1 und HERV-K Freisetzung dagegen beeinträchtigt wird, ist unklar. Zwar kann Tsg-3' nicht an den Gag-Proteinen binden, aber es müsste genug endogenes Vollängen-Tsg101 zur Verfügung stehen. Da intrazelluläres Tsg101 aber in den TICS eingelagert wird, könnte das Budding von HERV-K und HIV-1 deshalb unterbunden sein. Des Weiteren könnte auch eine starke Anreicherung von Ubiquitin in den TICS eine Rolle spielen, denn Untersuchungen zeigen, dass der Abbau freier Ubiquitin-Moleküle durch Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung vieler Retroviren blockiert [Patnaik *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2000; Shehu-Xhilaga *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005]. Somit könnte Tsg-3' den gleichen Effekt haben und indirekt zur Inhibition des Buddings beitragen. Das die Knospung von EIAV, dessen L-Domäne ein

YDDL-Motiv ist, nicht von Proteasom-Inhibitoren und auch nicht von Tsg-3' beeinflusst wird, erhärtet diese Hypothese [Ott *et al.*, 2002; Patnaik *et al.*, 2002; Shehu-Xhilaga *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005].

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der Kollokalisations-Versuche mit den Deletionsmutanten, dass das HERV-K Budding mit dem ESCRT-System und Tsg101 eng verknüpft ist.

4.2.3 Tsg101 fördert das Budding der YP_{x_n}L-Mutanten

Zur weiteren Aufklärung der Tsg101-Funktion im HERV-K Replikationszyklus wurden RT-Aktivitäts-Messungen mit den verschiedenen L-Domänen-Mutanten durchgeführt, bei denen die Auswirkungen einer Tsg101-Überexpression auf deren Budding analysiert wurden. Mutationen in den YP_{x_n}L-Motiven inhibieren die Bindung dieser Sequenzen an die ESCRT-Proteine. Aufgrund der intrazellulären Steigerung der Tsg101-Konzentrationen könnten aber vermehrt Tsg101-Proteine an die PTAP-Motive binden, wodurch eine erhöhte Anzahl an ESCRT-Proteinen zum Ort der Virenknospung rekrutiert werden sollten. Als Folge könnten auch Viren mit einer mutierten YP_{x_n}L L-Domäne aus der Wirtszelle freigesetzt werden. Die Ergebnisse des Cavid-Assays bestätigten diese Vermutung. Durch die Zunahme der intrazellulären Tsg101-Level steigerte sich die Virusfreisetzung der YP_{x_n}L-Mutanten um das drei- bis fünffache im Vergleich zu den Kontrollen, bei denen die YP_{x_n}L-Mutanten ohne zusätzlichen Tsg101-Konzentrationen exprimiert wurden. Die Erhöhung unterschied sich jedoch, je nachdem welches YP_{x_n}L-Motiv mutiert war. Besonders deutlich war der Effekt bei der YPETLKL-Mutante ausgeprägt, bei der eine intrazelluläre Steigerung der Tsg101-Konzentration zu einer fünffach vermehrten Partikelfreisetzung in die Zellkulturüberstände führte. Eine Ursache für die mildereren Effekte der Tsg101-Zugabe auf die Doppelmutante bzw. die YP(x₆)L-Mutante könnte die unmittelbare Nähe dieser Sequenz zum PTAP-Motiv sein, da diese L-Domäne durch nur eine Aminosäure „upstream“ vom PTAP-Motiv getrennt wird. Als Folge der Inaktivierung der YP(x₆)L-Sequenz, könnte die Bindungsaffinität des PTAP-Motivs an Tsg101 beeinträchtigt sein. Somit sollten auch erhöhte intrazelluläre Tsg101-Konzentrationen die YP(x₆)L-mutierten Partikel nur wenig beim Budding unterstützen. Da auch bei der YP_{x_n}L-Doppelmutante die Gag-Tsg101-Bindung leicht gehemmt wird, könnte auch hier die Stimulation durch Tsg101 eingeschränkt sein.

Zwingend notwendig für diese Stimulation der Virus Knosung war ein aktives PTAP-Motiv, da aus den Daten eindeutig hervorgeht, dass Mutationen dieser L-Domäne die Rettung der YP_{x_n}L-

Knospungsdefekte verhinderten. Im Gegenteil es wurde sogar eine Reduktion der gemessenen RT-Aktivität in den HEK-293T-Zellkulturüberständen beobachtet. Ebenfalls stellte sich eine Verringerung des HERV-K Buddings ein, wenn alle drei Motive aktiv (WT) vorlagen. Dieser Befund legt nahe, dass die L-Domänen-Defekte durch die Tsg101-Überexpression nur überwunden werden, wenn die YP_{x_n}L-Motive nicht mit ESCRT-Proteinen interagieren können und das PTAP-Motiv aktiv als Interaktionspartner vorliegt. Eine Beeinträchtigung des retroviralen Budding durch die extrazelluläre Zugabe von Tsg101 ist bereits in der Literatur beschrieben. Beispielsweise hemmt die erhöhte Konzentration des Proteins das HIV-1 und HTLV Budding. Der Effekt bei der MLV Partikel-Abschnürung ist dagegen nur sehr wenig ausgeprägt [Goila-Gaur *et al.*, 2003]. Auch das HERV-K Budding wird durch die erhöhten Proteinkonzentrationen beeinträchtigt. Anhand der Transmissionselektronenmikroskopie konnte festgestellt werden, dass die Störung der viralen Assemblierung und des Buddings nur moderat ausgeprägt war. Dass dennoch eine starke Stimulation der YP_{x_n}L-defizienten Virusfreisetzung stattfindet, ist deshalb erstaunlich. In Anbetracht dieser Tatsache kann nur spekuliert werden, warum die Tsg101-Überexpression das HERV-K Budding hemmt. Möglich wäre, dass die erhöhten Konzentrationen den „Multivesikulären Body“-Signalweg stören und somit die Funktionen der ESCRT-Proteine bei der viralen Abschnürung behindert werden. Dabei wird auch die ESCRT-Maschinerie in den YP_{x_n}L-Mutanten produzierenden Zellen gestört sein. Die gesteigerte RT-Aktivität in den Zellen überdeckt diesen Effekt. Zudem wurden leichte apoptotische Effekte durch die Erhöhung der Tsg101-Konzentration in HEK-293T-Zellen detektiert. Um den zellschädigenden Effekt bei der Auswertung der Daten zu kompensieren, wurden alle Werte zusätzlich über eine „firefly“-Luziferase normalisiert. Dadurch konnten Vergleiche anhand von identischen Zellzahlen vorgenommen werden.

4.2.4 Alix stimuliert das Budding der HERV-K PTAP-Mutanten

In der Literatur wird neben Tsg101 das Protein Alix als eine ESCRT-Komponente beschrieben, die das retrovirale Budding unterstützt. Als Bindeglied zwischen dem ESCRT-I- und dem ESCRT-III-System interagiert Alix mit den YP_{x_n}L-Motiven diverser Retroviren [Puffer *et al.*, 1997; Strack *et al.*, 2003; von Schwedler *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2007].

Drei verschiedene funktionelle Domänen konnten über strukturelle Analysen identifiziert werden (Abbildung 45). Die zentral gelegene V-förmige Domäne enthält die Bindungsstelle für die retroviralen YP_{x_n}L-Sequenzen und die C-terminal gelegene prolinreiche Region besitzt Motive zur Interaktion mit zellulären Partnern wie zum Beispiel Tsg101. Eine dritte Domäne bindet an die CHMP4-Proteine, die zu

dem ESCRT-III-Komplex gehören. Als Folge dieser Interaktion kommt es zur Rekrutierung der VPS4 ATPase. Dadurch kann die Teilung der Plasmamembran und die Abschnürung der viralen Partikel erfolgen [Hurley *et al.*, 2010; Peel *et al.*, 2011].

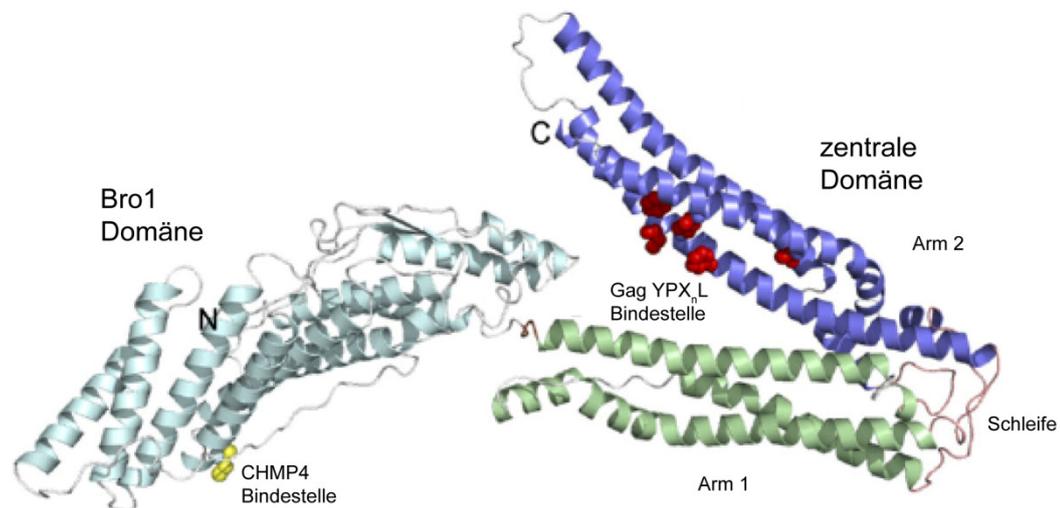


Abbildung 45: Struktur der Alix Bro1-V-Domänen. Dreidimensionale Darstellung der V-förmigen zentralen Domäne sowie der N-terminal gelegenen Bro-1-Domäne. Die gelb dargestellten Reste zeigen die CHMP4-Bindestelle, die roten Reste zeigen die YP_x_nL Bindestellen an den 2. Arm der V-Domäne auf. Abbildung modifiziert aus Fisher *et al.*, 2007.

Ob Alix auch für das Budding von HERV-K benötigt wird, wurde anhand von RT-Aktivitäts-Messungen untersucht. Dazu sind HEK-293T-Zellen mit dem WT bzw. L-Domänen-Mutanten transfiziert worden. Zusätzlich wurden gleiche Mengen an Alix bzw. einem Leervektor kotransfiziert. Es stellte sich heraus, dass eine Überexpression von Alix das HERV-K Budding stimulieren kann. Besonders deutlich war dieser Effekt, wenn den HERV-K-Mutanten ein intaktes PTAP-Motiv fehlte. Die gemessene RT-Aktivität erhöhte sich durch die extrazelluläre Alix-Zugabe um das vier- bis sechsfache verglichen mit den Werten, die bei einer regulären zellulären Alix-Konzentration gemessen wurden. Noch deutlicher konnte die erhöhte virale Freisetzung bei der Triplemutante beobachtet werden, bei der eine Steigerung um 54% gemessen wurde. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen, dass Alix zum Budding von humanen

endogenen Retroviren K rekrutiert wird, zum anderen, dass Alix besonders bei einem inaktiven PTAP-Motiv die Freisetzung von HERV-K-Mutanten stimuliert.

Dieses Phänomen ist in der Literatur auch für andere Retroviren beschrieben. So rettet eine Überexpression von Alix die schwerwiegenden Buddingdefekte von HIV-1-Mutanten, denen eine intakte PTAP L-Domäne fehlt [Fisher *et al.*, 2007; Usami *et al.*, 2007]. Allerdings interagiert Alix unterschiedlich stark mit den Gag-Proteinen von diversen Retroviren, so besitzt EIAV, das kein PTAP-Motiv trägt und somit nicht mit Tsg101 interagiert, eine hohe Bindungsaffinität zu Alix. Da das HIV-1 Budding hingegen primär auf Tsg101 angewiesen ist, bindet Alix das HIV-1 Gag mit einer geringeren Affinität. Die Arbeitsgruppe um Zhai *et al.* zeigte, dass die Bindungsaffinität von Alix zu dem YP_x_nL-Motiv des EIAV circa 60-fach stärker ist als zu dem HIV-1 p6-Protein [Zhai *et al.*, 2008]. Eine ähnlich schwache Affinität könnte auch zwischen dem HERV-K113 Gag und Alix möglich sein. Vorstellbar ist, dass die Interaktion mit Alix nur dann eine Rolle spielt, wenn bestimmte L-Domänen-Defekte überwunden werden müssen, da, wie aus den Daten der Tsg-Versuche hervorgeht, die Tsg-PTAP-Interaktion einen starken Einfluss auf das HERV-K Budding ausübt. Somit könnte, wie für HIV-1 gezeigt, die Alix-Gag-Bindung nur sekundäre Auswirkungen auf die Partikelfreisetzung haben. Dies bestätigen auch weitere Daten aus der HEK-293T-Zelllinie, bei der das PTAP-Motiv als primäre L-Domäne identifiziert wurde. Natürlich kann dieser Effekt, wie bereits im ersten Teil der Diskussion erwähnt, zelltypabhängig sein. In den Tera-1-Zellen könnte die gesteigerte zelluläre Alix-Konzentration deshalb einen weit geringeren Einfluss auf die PTAP defekten L-Domänen-Mutanten ausüben, weil in dieser Zelllinie das PTAP-Motiv und somit auch die über Tsg vermittelte Rekrutierung der ESCRT-Proteine eine geringere Bedeutung für das Budding von HERV-K hat. Daher sollte auch in weiteren Zelllinien getestet werden, inwieweit eine Alix-Überexpression die virale Freisetzung der L-Domänen Mutanten stimuliert.

4.2.5 Alix fördert auch das Budding der HERV-K YP_x_nL-Mutanten

Alix stimulierte auch die Freisetzung der L-Domänen-Mutanten, bei denen eine oder beide im p15-Protein lokalisierten YP_x_nL-Domänen durch Mutationen zerstört wurden. Besonders die in der YP(x₆)L-Sequenz mutierten Partikel sind durch erhöhte Alix-Level wieder vermehrt in die Zellkulturüberstände freigesetzt worden. Allerdings waren die Effekte verglichen mit denen der PTAP-Mutanten eher moderat. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass, wenn nur eine der beiden im p15-Protein lokalisierten YP_x_nL-Domänen mutiert ist, Alix noch an die andere Sequenz binden kann.

Trotzdem wird die Freisetzung der Viren auch dann stimuliert, wenn beide Alix-Bindestellen mutiert sind. Die Ursachen dafür sind unklar, wahrscheinlich ist aber, dass Alix an das im Kapsidprotein lokalisierte YP_{x_n}L-Motiv bindet. Durch diese Interaktion könnten weitere ESCRT-Proteine rekrutiert werden, um so den L-Domänen-Mutanten die Abschnürung an der Plasmamembran zu ermöglichen. Andererseits könnten die in den YP_{x_n}L-Motive eingeführten Mutationen nicht zu einer vollständigen Inaktivierung der L-Domänen-Aktivität beigetragen haben. Ob das eine Ursache ist, sollte über Biacore Biosensor Experimente mit rekombinanten Alix und den verschiedenen L-Domänen-Mutanten überprüft werden können. Des Weiteren könnte mit dieser Methode bestätigt werden, dass die YP(x₆)L L-Domäne die größere Bedeutung im HERV-K Replikationszyklus besitzt, da höchstwahrscheinlich Alix mit einer stärkeren Affinität an diese Sequenz binden kann, wie die Ergebnisse der Cavid-Assays und der Western Blot-Analysen in den untersuchten Zelllinien zeigen. Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Rolle von Alix im HERV-K Replikationszyklus ist der Einsatz von siRNAs (small interfering RNAs) gegen das Alix-Protein. Mit diesem siRNA-Silencing in humanen Zelllinien könnte ermittelt werden, wie stark der virale Buddingprozess von einer Alix-Genexpression abhängig ist.

4.2.6 Eine Überexpression von Alix beeinflusst die Wildtyp Partikelfreisetzung negativ

Eine Besonderheit dieser Versuchsreihe stellte der Einfluss der Alix-Überexpression auf die Wildtyp Partikel dar. Während Alix das Budding aller L-Domänen-Mutanten stimuliert, supprimiert es die Abschnürung von Viren, die über intakte L-Domänen verfügen. Diese Beobachtung konnte schon für eine Tsg101-Überexpression gemacht werden. Ursache hierfür könnte die multifunktionelle Wirkung von Alix im Zellstoffwechsel sein, da dieses Protein neben der Aufgabe im retroviralen Replikationszyklus weitere strukturelle und regulatorische Funktionen in den morphologischen Prozessen der Zelle ausübt. Beispielsweise bindet Alix Endophiline, die an Membranveränderungen während der Endozytose beteiligt sind, und CIN85/SETA, die an der Signaltransduktion und der Endozytose von ubiquitinierten Tyrosin-Kinase-Rezeptoren mitwirken [Borinstein et al., 2000; Chatellard-Causse et al., 2002]. Des Weiteren zeigen verschiedene Studien, dass Alix mit strukturellen Proteinen des Zytoskeletts, einschließlich Aktin und diversen Tubulinen, assoziiert ist [Schmidt *et al.*, 2003]. Aufgrund dieser Tatsache könnte eine Erhöhung der Alix-Konzentrationen schwerwiegende Folgen für die Zellmorphologie haben. Dies könnte auch das virale Budding beeinflussen, so dass weniger Viren an der Zellmembran freigesetzt werden. Sind aber Mutationen in den L-Domänen eingeführt, kann dieser Effekt durch die positive Stimulation der Partikelfreilassung kompensiert werden. Weiterhin stellten

funktionelle Studien von Alix auch einen direkten Zusammenhang zur Apoptose-Induktion her [Chen *et al.*, 2000; Trioulier *et al.*, 1994; Vito *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2002]. Dass bei einer extrazellulären Alix-Zugabe vermehrt Zellen in Apoptose gehen, war auch bei den RT-Aktivitäts-Messungen erkennbar. Anhand der Normalisierung der Zellzahlen durch die Messung der „firefly“-Luziferase konnte dieser Effekt verrechnet werden.

4.2.7 Klassifizierung der HERV-K113 Alix-Binde-Motive

Während das PTAP-Motiv von HERV-K identisch mit der PT/SAP L-Domänen-Konsensussequenz ist, unterscheiden sich die Alix-bindenden Motive teilweise stark in ihren Aminosäure-Sequenzen und auch die YP_{x_n}L-Motive anderer Retroviren weisen keine einheitliche Struktur auf. So besitzt HIV-1 eine LYPLASLRSL-Sequenz, EIAV eine LYPDL-Sequenz und RSV verfügt über eine LYPSL-Sequenz, die als L-Domänen fungieren. Kürzlich publizierten Zhai *et al.*, dass die für SIV_{mac239} KPYKEVTEDLLHL und die für SIVagm_{Tan-1} AYDPARKLLE beschriebenen Sequenzen ebenfalls als L-Domänen dienen, die Alix binden und die Knospung der Viren verursachen [Zhai *et al.*, 2011].

Obwohl diese Motive untereinander stark variieren, binden sie jedoch alle über den gleichen Mechanismus an das Alix-Protein. Im Zentrum der Interaktion stehen die Tyrosine der L-Domänen, die sich in eine tiefe hydrophobe Tasche von Alix verankern. Dabei gehen sie Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäure-Resten der Alix V-Domänen ein. Zusätzlich zum Tyrosin werden die hydrophoben Aminosäuren der Motive zum Kontakt mit Alix benötigt [Fisher *et al.*, 2007; Zhai *et al.*, 2011]. Der Bereich, in denen die YP_{x_n}L-Motive an das Alix-Protein binden, ist in Abbildung 46 dargestellt. Dieses Modell kann auch auf die HERV-K YP_{x_n}L L-Domänen übertragen werden. Beide im p15-Protein lokalisierten Motive besitzen die für die Verankerungen wichtigen Tyrosine. Diese werden von hydrophoben Aminosäuren flankiert, die in dem beschriebenen Mechanismus eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit Alix übernehmen.

Aufgrund von Kristallstruktur- und Interaktionsanalysen diverser YP_{x_n}L L-Domänen-Peptidsequenzen teilte die Gruppe um Zhai *et al.* die Familie der Alix-Binde-Motive in drei Untergruppen. Die EIAV und HIV-1 L-Domänen haben ein Prolin unmittelbar nach dem Tyrosin (Y+1 Position) und Leucine an Position Y+3 (EIAV) oder Y+5 (HIV-1), deswegen binden diese über unterschiedliche Konformationen an die Alix-V-Domäne. Deshalb werden das EIAV-Motiv als Typ-1 Alix-Binde-Sequenz und das HIV-1 Motiv als Typ-2 Alix-Binde-Sequenz bezeichnet. Die beiden SIV-Motive hingegen nehmen wiederum

eine andere Konformation ein und werden deshalb als Typ-3 Alix-Binde-Sequenzen bezeichnet [Zhai *et al.*, 2008; Zhai *et al.*, 2011]. Trotz dieser verschiedenen Aminosäure-Sequenzen lassen sich die Motive in einer Konsensussequenz zusammenfassen: $\Phi Yx_{0/2}\Phi x_{1/3}L$, mit den stark konservierten Tyrosin und Leucin, den variablen Aminosäuren (Φ) und die für die Bindung mit Alix unbedeutenden „Zwischen-Aminosäuren“ (x), wobei dessen variiert. Sequenzanalysen zeigen, dass nahezu alle in Primaten existierenden Lentiviren eines der drei Alix-Binde-Motive tragen [Zhai *et al.*, 2011]. In dieses Schemata können auch die beiden HERV-K113 YP_{x_n}L-Motive eingeordnet werden (Abbildung 46).

Gag-Protein	Alix-Binde-Motiv	Typ
	$\Phi Yx_{0/2}\Phi x_{1/3}L$	
SIV _{mac}	PYKEVTE ^L DL	3
SIV _{agm}	AYDPARKLL	3
HIV-1	LY..PLASL	2
EIAV	LY..PD..L	1
HERV-K113 ^{YPETLKL}	IY..PET.L	1,2
HERV-K113 ^{YP(x_n)L}	PYPQP ^P TRRL	3

Abbildung 46: Klassifizierung der HERV-K113 YP_{x_n}L L-Domänen. Das ESCRT-Protein Alix bindet an drei verschiedene YP_{x_n}L-Sequenzen, die in der Abbildung als Typ 1 bis 3 dargestellt sind. Zur Interaktion mit den Motiven gehen die Aminosäure-Reste der V-Domäne Wasserstoffbrückenbindungen mit den Tyrosinen der Motive ein. Die Tyrosine in den Motiven sind blau gekennzeichnet. Alle weiteren hydrophoben Aminosäuren der Alix-Binde-Motive, die zum Kontakt mit Alix benötigt werden, sind lila markiert. Die Einordnung der beiden im p15-Protein von HERV-K113 lokalisierten Motive erfolgte anhand von Sequenzvergleichen mit den anderen L-Domänen.

Anhand von Sequenzvergleichen kann das N-terminal gelegene YPETLKL-Motiv eher den Typ 1 oder 2 Alix-Binde-Motiven zugeordnet werden. In den Typ 3 Alix-Binde-Motiven lässt sich die in unmittelbar

zum PTAP-Motiv lokalisierte YP(x₆)L-Sequenz einordnen. Zwar besitzt dieses Motiv eine „Zwischen-Aminosäure“ mehr als die Konsensussequenz vorgibt, dies kann aber vernachlässigt werden, da ein Sequenzvergleich zwischen Lentiviren und β -Retroviren durchaus Variationen zulässt.

Insgesamt bestätigt die strukturelle Einordnung der Sequenzen die Tatsache, dass es sich bei den p15 YP_{x_n}L-Sequenzen um Motive handelt, die eine L-Domänen-Aktivität besitzen.

4.2.8 Modell des HERV-K Buddings

In dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zur Assemblierung und zum Budding humaner endogener Retroviren der Familie K gewonnen werden. Im Fokus der Untersuchungen standen die Gag-Proteine der Viren, die mit Hilfe funktioneller Domänen die Prozesse des Replikationszyklus maßgeblich regulieren. Insgesamt drei im Buddingprozess involvierte Motive konnten im Modellkonstrukt oriHERV-K113 identifiziert werden: PTAP, YPETLKL und YP(x₆)L. Sequenzanalysen zeigen, dass diese Motive weit verbreitet in den HERV-K(HML-2)-Elementen vorliegen. Um ihre Funktion ausüben zu können, interagieren die als L-Domänen bezeichneten Sequenzen mit Proteinen des ESCRT-Systems. Tsg101, ein ESCRT-I-Protein, interagiert über seine E2-ähnliche Domäne mit dem PTAP-Motiv der Viren. Als Folge dieser Bindung werden weitere ESCRT-Proteine an die viralen Assemblierungsstellen rekrutiert. Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass zwei zusätzliche, im p15-Protein lokalisierte YP_{x_n}L L-Domänen an der Rekrutierung der ESCRT-Maschinerie beteiligt sind. Über die Interaktion mit dem Alix-Protein sind auch diese Motive in der Lage, weitere ESCRT-Proteine, insbesondere Vps4 und die ESCRT-III-Proteine, für die finale Abschnürung der retroviralen Partikel von der Wirtszellmembran zu mobilisieren. ESCRT-III und VPS4 sind für die letzten Schritte des viralen Buddings notwendig, da sie die finale Abschnürung der Membranen katalysieren. Allerdings kann aufgrund der Studien zur Charakterisierung beider Motive angenommen werden, dass die YP_{x_n}L L-Domänen sich in der Ausübung ihrer Funktion unterstützen und ergänzen, denn die Ergebnisse der Untersuchungen in zwei verschiedenen Zelllinien zeigen deutlich auf, dass einzelne Mutationen dieser Motive nur mäßige Folgen für die Virusfreisetzung haben. In Abhängigkeit von den intrazellulären Konzentrationen der ESCRT-Proteine kann, je nach Zelltyp, die Bedeutung der drei L-Domänen beim Knospen der Viren variieren. Allerdings deuten viele Indizien auf eine dominante Rolle der PTAP-Sequenz hin, so dass diese als primäre L-Domäne angesehen werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Alix und Tsg101 unabhängige Wege zur Freisetzung aus der Zelle darstellen, obwohl beide Proteine miteinander interagieren und Funktionen im „multivesikulären Body“-Signalweg übernehmen. Viren haben im Laufe der Evolution komplexe Strategien entwickelt, um je nach Zelltyp das ESCRT-Systems zu rekrutieren und somit ihren Weg aus der Zelle optimal zu nutzen. Neben Typ und Anzahl der L-Domänen spielt die Bindungsaffinität der Motive zu den ESCRT-Proteinen eine Rolle. In den unterschiedlichen Virusfamilien variieren die drei genannten Kriterien in Abhängigkeit von der Spezifität des Wirtszellsystems. Dies kann auch auf HERV-K übertragen werden. Die in den Studien erzielten Daten lassen schlussfolgern, dass selbst, wenn die über Alix-induzierte Rekrutierung der ESCRT-Maschinerie nicht verfügbar ist, die Freisetzung viraler Partikel über die Tsg101-PTAP-Bindung sichergestellt wird. Andererseits kann ein durch eine PTAP-Mutation oder durch eine zu niedrige intrazelluläre Tsg101-Konzentration induzierter Buddingdefekt der Viren teilweise über die Alix-induzierte Kaskade überwunden werden. Somit ergänzen sich die HERV-K L-Domänen, um eine optimale Freisetzung der Viruspartikel aus den Wirtszellen zu gewährleisten.

Auf Basis der Daten wurde ein Model des HERV-K Buddings erstellt: (Abbildung 46).

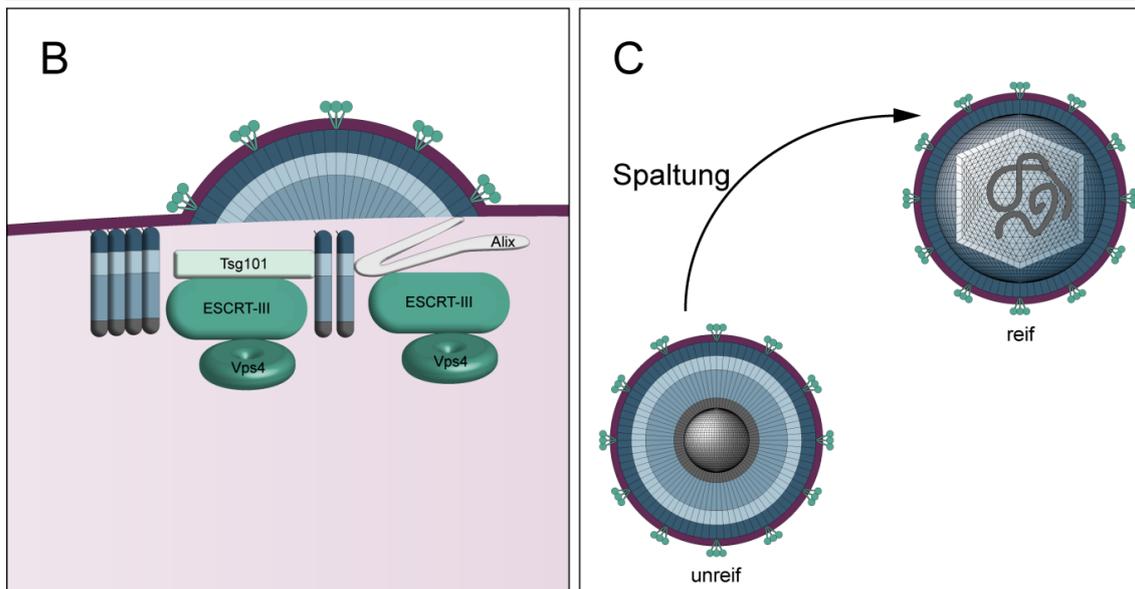
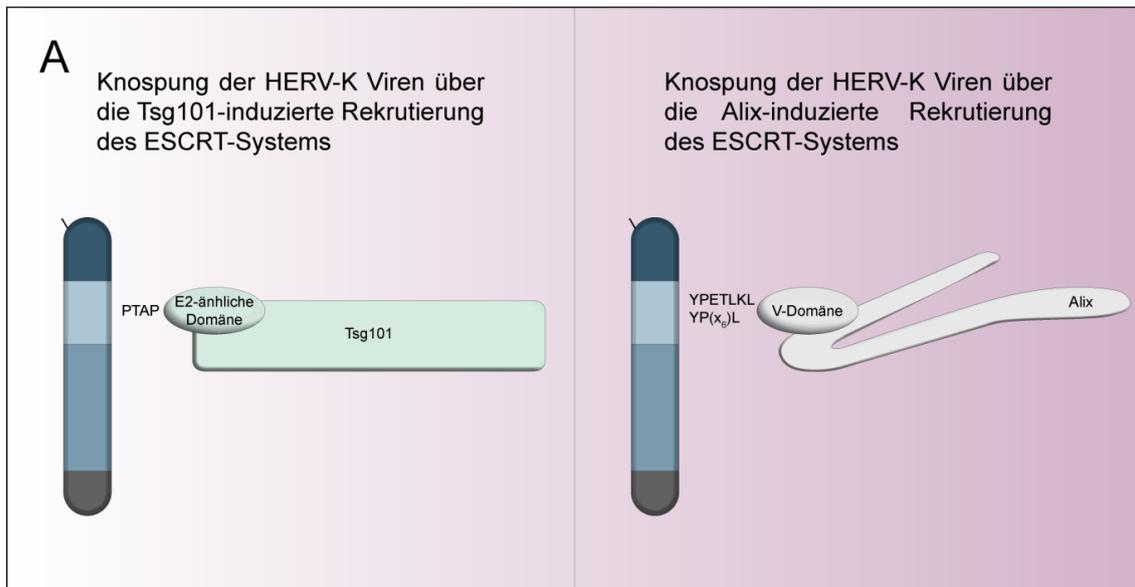
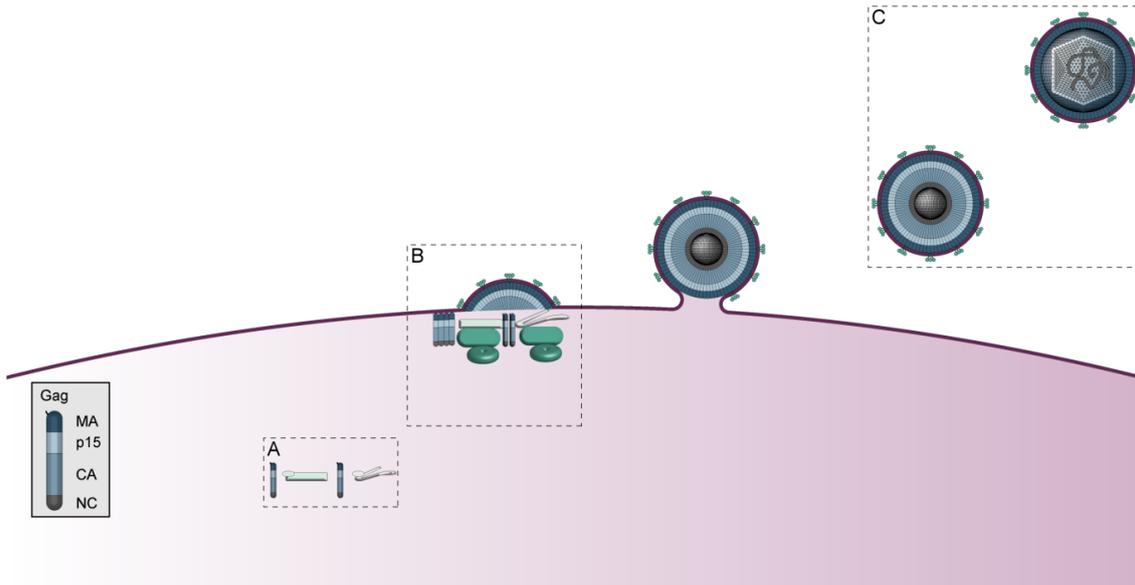


Abbildung 47: Buddingmodell für HERV-K. Übersicht über die Freisetzung von HERV-K Partikel in einer Wirtszelle A: Schematische Darstellung der HERV-K L-Domänen und ihrer Interaktion mit verschiedenen ESCRT-Proteinen. HERV-K können über zwei verschiedene Wege die ESCRT-Kaskade aktivieren. Zum einen bindet die PTAP L-Domäne an die E2-ähnliche Domäne von Tsg101, zum anderen rekrutieren die YPETLKL- und YP(x₆)L-Motive das ESCRT-assoziierte Protein Alix. Alle drei Motive sind in der p15-Untereinheit des Gag-Proteins lokalisiert. Sind die Alix-Binde-Sequenzen mutiert, kann der Buddingdefekt der Viren durch eine Tsg101-Überexpression überwunden werden. Bei einer Inaktivierung der PTAP L-Domäne steigern erhöhte Alix-Konzentrationen der Wirtszelle den Austritt der PTAP-defizienten Viren. B: virales Budding: Alix und Tsg101 rekrutieren den ESCRT-III-Komplex, woraufhin auch Vps4 zu den Orten des Buddings gelangt. Vps4 und die ESCRT-III-Proteine werden zur finalen Abschnürung der Retroviren an der Wirtszellmembran vermutlich benötigt. (Die Rekrutierung des Vps4-Proteins sowie der ESCRT-III-Proteine werden auf der Grundlage der HIV-1 Knospung sowie des Buddings weiterer Retroviren postuliert, Einleitung, Abschnitt 1.5.2.1) C: Reifung der Viren. Nach dem die Partikel freigesetzt wurden, spaltet die virale Protease die Gag-Vorläuferproteine, so dass reife Viren entstehen.

5 Zusammenfassung

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt war die Knospung und Freisetzung der humanen endogenen Retroviren der Familie K (HERV-K) nur wenig untersucht. Hingegen existierte eine Vielzahl von Untersuchungen über das Budding von exogenen Retroviren, bei denen „Late assembly“ (L)-Domänen die Abschnürung der Partikel maßgeblich steuern.

Im Zuge der Arbeit konnten drei verschiedene L-Domänen von HERV-K(HML-2) identifiziert werden: PTAP, YPETLKL und YP(x₆)L. Mutationen der in der p15-Domäne des Gag-Proteins lokalisierten Motive führten zu charakteristisch defekten Budding-Phänotypen, wodurch die Freisetzung der viralen Partikel stark beeinträchtigt wurde. Anhand von Messungen der Reversen Transkriptase-Aktivität in den Überständen von transfizierten HEK-293T- und Tera-1-Zellen war ein signifikanter Rückgang der Partikelfreisetzung aller Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar. Des Weiteren wiesen alle Mutanten reduzierte Mengen von prozessierten Gag-Proteinen in den ultrazentrifugierten Viruspellets auf. Besonders deutlich war dieser Effekt bei der Inaktivierung des hoch konservierten PTAP-Motivs ausgeprägt. HERV-K Partikel die sich durch ein mutiertes PTAP-Motiv auszeichneten waren häufig in einem späten Stadium der Knospung arretiert oder in Prokapsidketten über dünne Membranbrücken verbunden. Wie bei anderen Retroviren zeigte sich, dass die HERV-K L-Domänen die Virusfreisetzung zelltypabhängig begünstigen. Für ein weiteres, in der Kapsiddomäne des Gag-Proteins lokalisiertes Motiv, konnte keine Beteiligung an der HERV-K Knospung nachgewiesen werden. Ebenso wenig sind die QP1/2-Peptide an dem Freisetzungsprozess der endogenen Viren involviert.

Damit die Viren an der Plasmamembran der Zelle knospen können, sind verschiedene Wirtsfaktoren des ESCRT („endosomal sorting complex required for transport“)-Systems notwendig. Eine besondere Rolle stellt hierbei das ESCRT-Protein Tsg101 dar, dessen Mitwirkung am HERV-K Budding belegt werden konnte. Dabei wird Tsg101 über die PTAP-Motive der Gag-Proteine zum Ort der Partikelabschnürung rekrutiert. Des Weiteren führt eine Überexpression von Tsg101 dazu, dass der Buddingdefekt der YP_{x_n}L-Mutanten teilweise aufgehoben wird. Neben Tsg101 konnte Alix, eine akzessorische Komponente der ESCRT-Maschinerie, als ein am HERV-K Budding beteiligtes Protein identifiziert werden. Wie Tsg101 fördert Alix das Budding von L-Domänen-Mutanten, woraufhin vermehrt Partikel an der Wirtszellmembran knospen können.

6 Summary

To date, the budding and release of human endogenous retrovirus K has remained only poorly understood. In contrast, there are several studies describing the budding of exogenous retroviruses. These viruses exhibit late assembly (L)-domains that regulate the pinch-off of virus from the host cell membrane.

During the course of this project, three different HERV-K(HML-2) L-domains were identified: PTAP, YPETLKL und YP(x₆)L. Mutations of L-domain motifs within the p15 domain of the Gag protein resulted in characteristic phenotypes that showed defective budding and severely impaired particle release. By measuring the reverse transcriptase activity in the supernatants of transfected HEK 293T and Tera-1 cells, a significant reduction in the particle release of all mutants compared to the wild type was demonstrated. Furthermore, the level of processed Gag protein in virus pellets was shown to be decreased. However, the most drastic effects on virus release were observed by disrupting the single PTAP motif. Most of the PTAP mutant particles were arrested at a late budding stage or were organized in chain buds, in which different procapsids were connected by thin membrane stalks. As already shown for other retroviruses, the L-domains of human endogenous retrovirus K promote virus release in a cell type-dependent manner. Analysis of a further motif showed that this sequence, located in the capsid domain of the Gag protein, has no influence on HERV-K(HML-2) virus budding. Moreover, QP1/2 peptides play no role in the release of the endogenous viruses.

Viruses are able to recruit cellular components of the "endosomal sorting complexes required for transport" (ESCRT) to bud from their host cell membrane. In this study, it was shown that Tsg101, a member of ESCRT system, plays a physiologically relevant role in HERV-K release and assembly. Therefore, the PTAP motif of Gag interacts with Tsg101 and recruits it to the site of particle budding. Furthermore, overexpression of Tsg101 restores the release of HERV-K(HML-2) mutants lacking YP_{x_n}L motifs. In addition, overexpression of Alix, an accessory component of ESCRT machinery also involved in HERV-K budding can, like Tsg101, markedly stimulate the budding of diverse HERV-K(HML-2) release mutants.

7 Literaturverzeichnis

- Agromayor, M., and J. Martin-Serrano. Interaction of Amsh with Escrt-iii and Deubiquitination of Endosomal Cargo. *J Biol Chem* 281, Nr. 32 (2006): 23083-91.
- Agromayor, M., J. G. Carlton, J. P. Phelan, D. R. Matthews, L. M. Carlin, S. Ameer-Beg, K. Bowers, and J. Martin-Serrano. Essential Role of Hist1 in Cytokinesis. *Mol Biol Cell* 20, Nr. 5 (2009): 1374-87.
- Amarasinghe, G. K., R. N. De Guzman, R. B. Turner, K. J. Chancellor, Z. R. Wu, and M. F. Summers. Nmr Structure of the Hiv-1 Nucleocapsid Protein Bound to Stem-Loop SI2 of the Psi-Rna Packaging Signal. Implications for Genome Recognition. *J Mol Biol* 301, Nr. 2 (2000): 491-511.
- Armbruster, V., M. Sauter, E. Krautkraemer, E. Meese, A. Kleiman, B. Best, K. Roemer, and N. Mueller-Lantzsch. A Novel Gene from the Human Endogenous Retrovirus K Expressed in Transformed Cells. *Clin Cancer Res* 8, Nr. 6 (2002): 1800-7.
- Babst, M., T. K. Sato, L. M. Banta, and S. D. Emr. Endosomal Transport Function in Yeast Requires a Novel Aaa-Type Atpase, Vps4p. *EMBO J* 16, Nr. 8 (1997): 1820-31.
- Babst, M., B. Wendland, E. J. Estepa, and S. D. Emr. The Vps4p Aaa Atpase Regulates Membrane Association of a Vps Protein Complex Required for Normal Endosome Function. *EMBO J* 17, Nr. 11 (1998): 2982-93.
- Bajorek, M., H. L. Schubert, J. McCullough, C. Langelier, D. M. Eckert, W. M. Stubblefield, N. T. Uter, D. G. Myszka, C. P. Hill, and W. I. Sundquist. Structural Basis for Escrt-iii Protein Autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol* 16, Nr. 7 (2009): 754-62.
- Bannert, N., and R. Kurth. The Evolutionary Dynamics of Human Endogenous Retroviral Families. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, (2006): 149-73.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Daugey, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (Aids). *Science* 220, Nr. 4599 (1983): 868-71.

- Battula N., and Loeb LA. On the fidelity of DNA replication. Lack of exodeoxyribonuclease activity and error-correcting function in avian myeloblastosis virus DNA polymerase. *J Biol Chem.* (1976): 982-6.
- Baumgartel, V., S. Ivanchenko, A. Dupont, M. Sergeev, P. W. Wiseman, H. G. Krausslich, C. Brauchle, B. Muller, and D. C. Lamb. Live-Cell Visualization of Dynamics of Hiv Budding Site Interactions with an Escrt Component. *Nat Cell Biol* 13, Nr. 4 (2011): 469-74.
- Beimforde, N., K. Hanke, I. Ammar, R. Kurth, and N. Bannert. Molecular Cloning and Functional Characterization of the Human Endogenous Retrovirus K113. *Virology* 371, Nr. 1 (2008): 216-25.
- Bello, N. F., V. Dussupt, P. Sette, V. Rudd, K. Nagashima, F. Bibollet-Ruche, C. Chen, R. C. Montelaro, B. H. Hahn, and F. Bouamr. Budding of Retroviruses Utilizing Divergent L Domains Requires Nucleocapsid. *J Virol* 86, Nr. 8 (2012): 4182-93.
- Benit, L., P. Dessen, and T. Heidmann. Identification, Phylogeny, and Evolution of Retroviral Elements Based on Their Envelope Genes. *J Virol* 75, Nr. 23 (2001): 11709-19.
- Bittner, J. J. Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice. *Science* 84, Nr. 2172 (1936): 162.
- Blaise, S., N. de Parseval, L. Benit, and T. Heidmann. Genomewide Screening for Fusogenic Human Endogenous Retrovirus Envelopes Identifies Syncytin 2, a Gene Conserved on Primate Evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, Nr. 22 (2003): 13013-8.
- Blond, J. L., D. Lavillette, V. Cheynet, O. Bouton, G. Oriol, S. Chapel-Fernandes, B. Mandrand, F. Mallet, and F. L. Cosset. 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* 74, Nr. 7 (2000): 3321-9.
- Blot V., Perugi F., Gay B., Prévost MC., Briant L., Tangy F., Abriel H., Staub O., Dokh lar MC. and Pique C. Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding. *J Cell Sci.* (2004): 2357-67.
- Boeke, J. D., and J. P. Stoye. Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements. In *Retroviruses*, edited by J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor (NY), 1997.

- Boese, A., M. Sauter, U. Galli, B. Best, H. Herbst, J. Mayer, E. Kremmer, K. Roemer, and N. Mueller-Lantzsch. Human Endogenous Retrovirus Protein Corf Supports Cell Transformation and Associates with the Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein. *Oncogene* 19, Nr. 38 (2000): 4328-36.
- Borinstein, S. C., M. A. Hyatt, V. W. Sykes, R. E. Straub, S. Lipkowitz, J. Boulter, and O. Bogler. Seta Is a Multifunctional Adapter Protein with Three Sh3 Domains That Binds Grb2, Cbl, and the Novel Sb1 Proteins. *Cell Signal* 12, Nr. 11-12 (2000): 769-79.
- Bouamr, F., J. A. Melillo, M. Q. Wang, K. Nagashima, M. de Los Santos, A. Rein, and S. P. Goff. Pppyveptap Motif Is the Late Domain of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Gag and Mediates Its Functional Interaction with Cellular Proteins Nedd4 and Tsg101 [Corrected]. *J Virol* 77, Nr. 22 (2003): 11882-95.
- Brandt, S., M. Blissenbach, B. Grewe, R. Konietzny, T. Grunwald, and K. Uberla. Rev Proteins of Human and Simian Immunodeficiency Virus Enhance Rna Encapsidation. *PLoS Pathog* 3, Nr.4 (2007): e54.
- Briggs, J. A., M. N. Simon, I. Gross, H. G. Krausslich, S. D. Fuller, V. M. Vogt, and M. C. Johnson. The Stoichiometry of Gag Protein in Hiv-1. *Nat Struct Mol Biol* 11, Nr. 7 (2004): 672-5.
- Briggs, J. A., and H. G. Krausslich. The Molecular Architecture of Hiv. *J Mol Biol* 410, Nr. 4 (2011): 491-500.
- Buscher, K., U. Trefzer, M. Hofmann, W. Sterry, R. Kurth, and J. Denner. Expression of Human Endogenous Retrovirus K in Melanomas and Melanoma Cell Lines. *Cancer Res* 65, Nr. 10 (2005): 4172-80.
- Buzdin, A., E. Kovalskaya-Alexandrova, E. Gogvadze, and E. Sverdlov. At Least 50% of Human-Specific Herv-K (Hml-2) Long Terminal Repeats Serve in Vivo as Active Promoters for Host Nonrepetitive DNA Transcription. *J Virol* 80, Nr. 21 (2006): 10752-62.
- Callahan, R., W. Drohan, S. Tronick, and J. Schlom. Detection and Cloning of Human DNA Sequences Related to the Mouse Mammary Tumor Virus Genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, Nr. 18 (1982): 5503-7.
- Cameron, C. E., B. Grinde, J. Jentoft, J. Leis, I. T. Weber, T. D. Copeland, and A. Wlodawer. Mechanism of Inhibition of the Retroviral Protease by a Rous Sarcoma Virus Peptide Substrate Representing the Cleavage Site between the Gag P2 and P10 Proteins. *J Biol Chem* 267, Nr. 33 (1992): 23735-41.

- Carlton, J. G., and J. Martin-Serrano. Parallels between Cytokinesis and Retroviral Budding: A Role for the Escrt Machinery. *Science* 316, Nr. 5833 (2007): 1908-12.
- Chang, Y. F., S. M. Wang, K. J. Huang, and C. T. Wang. Mutations in Capsid Major Homology Region Affect Assembly and Membrane Affinity of Hiv-1 Gag. *J Mol Biol* 370, Nr. 3 (2007): 585-97.
- Chatellard-Causse, C., B. Blot, N. Cristina, S. Torch, M. Missotten, and R. Sadoul. Alix (Alg-2-Interacting Protein X), a Protein Involved in Apoptosis, Binds to Endophilins and Induces Cytoplasmic Vacuolization. *J Biol Chem* 277, Nr. 32 (2002): 29108-15.
- Chau, V., J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda, and A. Varshavsky. A Multiubiquitin Chain Is Confined to Specific Lysine in a Targeted Short-Lived Protein. *Science* 243, Nr. 4898 (1989): 1576-83.
- Chen, B., S. C. Borinstein, J. Gillis, V. W. Sykes, and O. Bogler. The Glioma-Associated Protein Seta Interacts with Aip1/Alix and Alg-2 and Modulates Apoptosis in Astrocytes. *J Biol Chem* 275, Nr. 25 (2000): 19275-81.
- Chen, C., F. Li, and R. C. Montelaro. Functional Roles of Equine Infectious Anemia Virus Gag P9 in Viral Budding and Infection. *J Virol* 75, Nr. 20 (2001): 9762-70.
- Christensen, T., P. Dissing Sorensen, H. Riemann, H. J. Hansen, M. Munch, S. Haahr, and A. Moller-Larsen. Molecular Characterization of Herv-H Variants Associated with Multiple Sclerosis. *Acta Neurol Scand* 101, Nr. 4 (2000): 229-38.
- Christensen, T., L. Pedersen, P. D. Sorensen, and A. Moller-Larsen. A Transmissible Human Endogenous Retrovirus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18, Nr. 12 (2002): 861-6.
- Chudak. Expression und zelluläre Kontrollmechanismen der Replikation humaner endogener Retroviren (2008)
- Craven, R. C., A. E. Leure-duPree, R. A. Weldon, Jr., and J. W. Wills. Genetic Analysis of the Major Homology Region of the Rous Sarcoma Virus Gag Protein. *J Virol* 69, Nr. 7 (1995): 4213-27.
- D'Souza, V., and M. F. Summers. Structural Basis for Packaging the Dimeric Genome of Moloney Murine Leukaemia Virus. *Nature* 431, Nr. 7008 (2004): 586-90.
- De Guzman, R. N., Z. R. Wu, C. C. Stalling, L. Pappalardo, P. N. Borer, and M. F. Summers. Structure of the Hiv-1 Nucleocapsid Protein Bound to the SI3 Psi-Rna Recognition Element. *Science* 279, Nr. 5349 (1998): 384-8.

- Deininger, P. L., and M. A. Batzer. Mammalian Retroelements. *Genome Res* 12, Nr. 10 (2002): 1455-65.
- Delchambre, M., D. Gheysen, D. Thines, C. Thiriart, E. Jacobs, E. Verdin, M. Horth, A. Burny, and F. Bex. The Gag Precursor of Simian Immunodeficiency Virus Assembles into Virus-Like Particles. *EMBO J* 8, Nr. 9 (1989): 2653-60.
- Demirov, D. G., J. M. Orenstein, and E. O. Freed. The Late Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 P6 Promotes Virus Release in a Cell Type-Dependent Manner. *J Virol* 76, Nr. 1 (2002): 105-17.
- Denne, M., M. Sauter, V. Armbruster, J. D. Licht, K. Roemer, and N. Mueller-Lantzsch. Physical and Functional Interactions of Human Endogenous Retrovirus Proteins Np9 and Rec with the Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein. *J Virol* 81, Nr. 11 (2007): 5607-16.
- Dewannieux, M., F. Harper, A. Richaud, C. Letzelter, D. Ribet, G. Pierron, and T. Heidmann. Identification of an Infectious Progenitor for the Multiple-Copy Herv-K Human Endogenous Retroelements. *Genome Res* 16, Nr. 12 (2006): 1548-56.
- Dilley, K. A., D. Gregory, M. C. Johnson, and V. M. Vogt. An Lypsl Late Domain in the Gag Protein Contributes to the Efficient Release and Replication of Rous Sarcoma Virus. *J Virol* 84, Nr. 13 (2010): 6276-87.
- Dolnik, O., L. Kolesnikova, L. Stevermann, and S. Becker. Tsg101 Is Recruited by a Late Domain of the Nucleocapsid Protein to Support Budding of Marburg Virus-Like Particles. *J Virol* 84, Nr. 15 (2010): 7847-56.
- Doms, R. W., and J. P. Moore. Hiv-1 Membrane Fusion: Targets of Opportunity. *J Cell Biol* 151, Nr. 2 (2000): F9-14.
- Dorfman, T., F. Mammano, W. A. Haseltine, and H. G. Gottlinger. Role of the Matrix Protein in the Virion Association of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein. *J Virol* 68, Nr. 3 (1994): 1689-96.
- Doyotte, A., M. R. Russell, C. R. Hopkins, and P. G. Woodman. Depletion of Tsg101 Forms a Mammalian "Class E" Compartment: A Multicisternal Early Endosome with Multiple Sorting Defects. *J Cell Sci* 118, Nr. Pt 14 (2005): 3003-17.

- Dubay, J. W., S. J. Roberts, B. Brody, and E. Hunter. Mutations in the Leucine Zipper of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmembrane Glycoprotein Affect Fusion and Infectivity. *J Virol* 66, Nr. 8 (1992): 4748-56.
- Dussupt, V., P. Sette, N. F. Bello, M. P. Javid, K. Nagashima, and F. Bouamr. Basic Residues in the Nucleocapsid Domain of Gag Are Critical for Late Events of Hiv-1 Budding. *J Virol* 85, Nr. 5 (2011): 2304-15.
- Eastman, S. W., J. Martin-Serrano, W. Chung, T. Zang, and P. D. Bieniasz. Identification of Human Vps37c, a Component of Endosomal Sorting Complex Required for Transport-I Important for Viral Budding. *J Biol Chem* 280, Nr. 1 (2005): 628-36.
- Enard, W., and S. Paabo. Comparative Primate Genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5, (2004): 351-78.
- Filimonenko, M., S. Stuffers, C. Raiborg, A. Yamamoto, L. Malerod, E. M. Fisher, A. Isaacs, A. Brech, H. Stenmark, and A. Simonsen. Functional Multivesicular Bodies Are Required for Autophagic Clearance of Protein Aggregates Associated with Neurodegenerative Disease. *J Cell Biol* 179, Nr. 3 (2007): 485-500.
- Finley, D., S. Sadis, B. P. Monia, P. Boucher, D. J. Ecker, S. T. Crooke, and V. Chau. Inhibition of Proteolysis and Cell Cycle Progression in a Multiubiquitination-Deficient Yeast Mutant. *Mol Cell Biol* 14, Nr. 8 (1994): 5501-9.
- Fisher, R. D., H. Y. Chung, Q. Zhai, H. Robinson, W. I. Sundquist, and C. P. Hill. Structural and Biochemical Studies of Alix/Aip1 and Its Role in Retrovirus Budding. *Cell* 128, Nr. 5 (2007): 841-52.
- Fujii, K., U. M. Munshi, S. D. Ablan, D. G. Demirov, F. Soheilian, K. Nagashima, A. G. Stephen, R. J. Fisher, and E. O. Freed. Functional Role of Alix in Hiv-1 Replication. *Virology* 391, Nr. 2 (2009): 284-92.
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and et al. Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (Htlv-III) from Patients with Aids and at Risk for Aids. *Science* 224, Nr. 4648 (1984): 500-3.
- Gamble, T. R., S. Yoo, F. F. Vajdos, U. K. von Schwedler, D. K. Worthylake, H. Wang, J. P. McCutcheon, W. I. Sundquist, and C. P. Hill. Structure of the Carboxyl-Terminal Dimerization Domain of the Hiv-1 Capsid Protein. *Science* 278, Nr. 5339 (1997): 849-53.

- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist. Tsg101 and the Vacuolar Protein Sorting Pathway Are Essential for Hiv-1 Budding. *Cell* 107, Nr. 1 (2001): 55-65.
- George, M., T. Schwecke, N. Beimforde, O. Hohn, C. Chudak, A. Zimmermann, R. Kurth, D. Naumann, and N. Bannert. Identification of the Protease Cleavage Sites in a Reconstituted Gag Polyprotein of an Herv-K(Hml-2) Element. *Retrovirology* 8, (2011): 30.
- Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde. Assembly and Release of Hiv-1 Precursor Pr55gag Virus-Like Particles from Recombinant Baculovirus-Infected Insect Cells. *Cell* 59, Nr. 1 (1989): 103-12.
- Gifford, R., and M. Tristem. The Evolution, Distribution and Diversity of Endogenous Retroviruses. *Virus Genes* 26, Nr. 3 (2003): 291-315.
- Goila-Gaur, R., D. G. Demirov, J. M. Orenstein, A. Ono, and E. O. Freed. Defects in Human Immunodeficiency Virus Budding and Endosomal Sorting Induced by Tsg101 Overexpression. *J Virol* 77, Nr. 11 (2003): 6507-19.
- Golovkina, T. V., A. Chervonsky, J. P. Dudley, and S. R. Ross. Transgenic Mouse Mammary Tumor Virus Superantigen Expression Prevents Viral Infection. *Cell* 69, Nr. 4 (1992): 637-45.
- Gottlinger, H. G., T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. Effect of Mutations Affecting the P6 Gag Protein on Human Immunodeficiency Virus Particle Release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, Nr. 8 (1991): 3195-9.
- Gottwein, E., J. Bodem, B. Muller, A. Schmechel, H. Zentgraf, and H. G. Krausslich. The Mason-Pfizer Monkey Virus Pppy and Psap Motifs Both Contribute to Virus Release. *J Virol* 77, Nr. 17 (2003): 9474-85.
- Gottwein, E., and H. G. Krausslich. Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Ubiquitination. *J Virol* 79, Nr. 14 (2005): 9134-44.
- Hanger, J. J., L. D. Bromham, J. J. McKee, T. M. O'Brien, and W. F. Robinson. The Nucleotide Sequence of Koala (*Phascolarctos Cinereus*) Retrovirus: A Novel Type C Endogenous Virus Related to Gibbon Ape Leukemia Virus. *J Virol* 74, Nr. 9 (2000): 4264-72.

- Hanke, K., P. Kramer, S. Seeher, N. Beimforde, R. Kurth, and N. Bannert. Reconstitution of the Ancestral Glycoprotein of Human Endogenous Retrovirus K and Modulation of Its Functional Activity by Truncation of the Cytoplasmic Domain. *J Virol* 83, Nr. 24 (2009): 12790-800.
- Hanke, K., Funktionelle Charakterisierung der HERV-K Proteine Env und Rec. Dissertation. (2010) S. 8-136.
- Henderson, L. E., H. C. Krutzsch, and S. Oroszlan. Myristyl Amino-Terminal Acylation of Murine Retrovirus Proteins: An Unusual Post-Translational Proteins Modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, Nr. 2 (1983): 339-43.
- Henderson, L. E., R. Sowder, G. Smythers, R. E. Benveniste, and S. Oroszlan. Purification and N-Terminal Amino Acid Sequence Comparisons of Structural Proteins from Retrovirus-D/Washington and Mason-Pfizer Monkey Virus. *J Virol* 55, Nr. 3 (1985): 778-87.
- Heslin, D. J., P. Murcia, F. Arnaud, K. Van Doorslaer, M. Palmarini, and J. Lenz. A Single Amino Acid Substitution in a Segment of the Ca Protein within Gag That Has Similarity to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Blocks Infectivity of a Human Endogenous Retrovirus K Provirus in the Human Genome. *J Virol* 83, Nr. 2 (2009): 1105-14.
- Hizi, A., L. E. Henderson, T. D. Copeland, R. C. Sowder, H. C. Krutzsch, and S. Oroszlan. Analysis of Gag Proteins from Mouse Mammary Tumor Virus. *J Virol* 63, Nr. 6 (1989): 2543-9.
- Huang, M., J. M. Orenstein, M. A. Martin, and E. O. Freed. P6gag Is Required for Particle Production from Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Molecular Clones Expressing Protease. *J Virol* 69, Nr. 11 (1995): 6810-8.
- Hurley, J. H. The Escrt Complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45, Nr. 6 (2010): 463-87.
- Ivanov, D., O. V. Tsodikov, J. Kasanov, T. Ellenberger, G. Wagner, and T. Collins. Domain-Swapped Dimerization of the Hiv-1 Capsid C-Terminal Domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, Nr. 11 (2007): 4353-8.
- Jacks, T., M. D. Power, F. R. Masiarz, P. A. Luciw, P. J. Barr, and H. E. Varmus. Characterization of Ribosomal Frameshifting in Hiv-1 Gag-Pol Expression. *Nature* 331, Nr. 6153 (1988): 280-3.
- Jager, S., E. Gottwein, and H. G. Krausslich. Ubiquitination of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Is Highly Dependent on Gag Membrane Association. *J Virol* 81, Nr. 17 (2007): 9193-201.

- Johnson, W. E., and J. M. Coffin. Constructing Primate Phylogenies from Ancient Retrovirus Sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, Nr. 18 (1999): 10254-60
- Johnson, M. C., J. L. Spidel, D. Ako-Adjei, J. W. Wills, and V. M. Vogt. The C-Terminal Half of Tsg101 Blocks Rous Sarcoma Virus Budding and Sequesters Gag into Unique Nonendosomal Structures. *J Virol* 79, Nr. 6 (2005): 3775-86.
- Joshi, A., U. Munshi, S. D. Ablan, K. Nagashima, and E. O. Freed. Functional Replacement of a Retroviral Late Domain by Ubiquitin Fusion. *Traffic* 9, Nr. 11 (2008): 1972-83.
- Karacostas, V., K. Nagashima, M. A. Gonda, and B. Moss. Human Immunodeficiency Virus-Like Particles Produced by a Vaccinia Virus Expression Vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, Nr. 22 (1989): 8964-7.
- Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr. Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, Escrt-I. *Cell* 106, Nr. 2 (2001): 145-55.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Emr. Receptor Downregulation and Multivesicular-Body Sorting." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, Nr. 12 (2002): 893-905.
- Katzourakis, A., A. Rambaut, and O. G. Pybus. "The Evolutionary Dynamics of Endogenous Retroviruses. *Trends Microbiol* 13, Nr. 10 (2005): 463-8.
- Kieffer, C., J. J. Skalicky, E. Morita, I. De Domenico, D. M. Ward, J. Kaplan, and W. I. Sundquist. Two Distinct Modes of Escrt-iii Recognition Are Required for Vps4 Functions in Lysosomal Protein Targeting and Hiv-1 Budding. *Dev Cell* 15, Nr. 1 (2008): 62-73.
- Kikonyogo, A., F. Bouamr, M. L. Vana, Y. Xiang, A. Aiyar, C. Carter, and J. Leis. Proteins Related to the Nedd4 Family of Ubiquitin Protein Ligases Interact with the L Domain of Rous Sarcoma Virus and Are Required for Gag Budding from Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, Nr. 20 (2001): 11199-204.
- Kim, J., S. Sitaraman, A. Hierro, B. M. Beach, G. Odorizzi, and J. H. Hurley. Structural Basis for Endosomal Targeting by the Bro1 Domain. *Dev Cell* 8, Nr. 6 (2005): 937-47.
- Krausslich, H. G., M. Facke, A. M. Heuser, J. Konvalinka, and H. Zentgraf. The Spacer Peptide between Human Immunodeficiency Virus Capsid and Nucleocapsid Proteins Is Essential for Ordered Assembly and Viral Infectivity. *J Virol* 69, Nr. 6 (1995): 3407-19.

- Krzyształowska-Wawrzyniak, M., M. Ostanek, J. Clark, A. Binczak-Kuleta, L. Ostanek, M. Kaczmarczyk, B. Loniewska, L. S. Wyrwicz, M. Brzosko, and A. Ciechanowicz. The Distribution of Human Endogenous Retrovirus K-113 in Health and Autoimmune Diseases in Poland. *Rheumatology (Oxford)* 50, Nr. 7 (2011): 1310-4.
- Kurth, R., and N. Bannert. Beneficial and Detrimental Effects of Human Endogenous Retroviruses. *Int J Cancer* 126, Nr. 2 (2010): 306-14.
- Laemmli, U. K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Nr. 227 (1970):680-5.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya,

- S. Choi, Y. J. Chen, and Consortium International Human Genome Sequencing. "Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome." *Nature* 409, Nr. 6822 (2001): 860-921.
- Langelier, C., U. K. von Schwedler, R. D. Fisher, I. De Domenico, P. L. White, C. P. Hill, J. Kaplan, D. Ward, and W. I. Sundquist. Human Esct-II Complex and Its Role in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Release. *J Virol* 80, Nr. 19 (2006): 9465-80.
- Larsson, E., N. Kato, and M. Cohen. Human Endogenous Proviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 148, (1989): 115-32.
- Lavie, L., P. Medstrand, W. Schempp, E. Meese, and J. Mayer. Human Endogenous Retrovirus Family Herv-K(Hml-5): Status, Evolution, and Reconstruction of an Ancient Betaretrovirus in the Human Genome. *J Virol* 78, Nr. 16 (2004): 8788-98.
- Lee, J. A., A. Beigneux, S. T. Ahmad, S. G. Young, and F. B. Gao. Esct-IIi Dysfunction Causes Autophagosome Accumulation and Neurodegeneration. *Curr Biol* 17, Nr. 18 (2007): 1561-7.
- Lee, Y. N., and P. D. Bieniasz. Reconstitution of an Infectious Human Endogenous Retrovirus. *PLoS Pathog* 3, Nr. 1 (2007): e10.
- Leiter, E. H., and H. G. Bedigian. Intracisternal α -Particles in Genetically Diabetic Mice: Identification in Pancreas and Induction in Cultured Beta Cells. *Diabetologia* 17, Nr. 3 (1979): 175-85.
- Li, F., C. Chen, B. A. Puffer, and R. C. Montelaro. Functional Replacement and Positional Dependence of Homologous and Heterologous L Domains in Equine Infectious Anemia Virus Replication. *J Virol* 76, Nr. 4 (2002): 1569-77.
- Lindeskog, M., D. L. Mager, and J. Blomberg. Isolation of a Human Endogenous Retroviral Herv-H Element with an Open Env Reading Frame. *Virology* 258, Nr. 2 (1999): 441-50.
- Lower, R., R. R. Tonjes, C. Korbmacher, R. Kurth, and J. Lower. Identification of a Rev-Related Protein by Analysis of Spliced Transcripts of the Human Endogenous Retroviruses Htdv/Herv-K. *J Virol* 69, Nr. 1 (1995): 141-9.
- Lu, Q., L. W. Hope, M. Brasch, C. Reinhard, and S. N. Cohen. Tsg101 Interaction with Hrs Mediates Endosomal Trafficking and Receptor Down-Regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, Nr. 13 (2003): 7626-31.

- Macfarlane, C., and P. Simmonds. Allelic Variation of Herv-K(Hml-2) Endogenous Retroviral Elements in Human Populations. *J Mol Evol* 59, Nr. 5 (2004): 642-56.
- Mamedov, I. Z., Y. B. Lebedev, and E. D. Sverdlov. Unusually Long Target Site Duplications Flanking Some of the Long Terminal Repeats of Human Endogenous Retrovirus K in the Human Genome. *J Gen Virol* 85, Nr. Pt 6 (2004): 1485-8.
- Mammano, F., A. Ohagen, S. Hoglund, and H. G. Gottlinger. Role of the Major Homology Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Virion Morphogenesis. *J Virol* 68, Nr. 8 (1994): 4927-36.
- Mang, R., J. Maas, A. C. van Der Kuyl, and J. Goudsmit. Papio Cynocephalus Endogenous Retrovirus among Old World Monkeys: Evidence for Coevolution and Ancient Cross-Species Transmissions. *J Virol* 74, Nr. 3 (2000): 1578-86.
- Mangeney, M., M. Renard, G. Schlecht-Louf, I. Bouallaga, O. Heidmann, C. Letzelter, A. Richaud, B. Ducos, and T. Heidmann. Placental Syncytins: Genetic Disjunction between the Fusogenic and Immunosuppressive Activity of Retroviral Envelope Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, Nr. 51 (2007): 20534-9.
- Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz. Hiv-1 and Ebola Virus Encode Small Peptide Motifs That Recruit Tsg101 to Sites of Particle Assembly to Facilitate Egress. *Nat Med* 7, Nr. 12 (2001): 1313-9.
- Martin-Serrano, J., and P. D. Bieniasz. A Bipartite Late-Budding Domain in Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 77, Nr. 22 (2003a): 12373-7.
- Martin-Serrano, J., A. Yarovoy, D. Perez-Caballero, and P. D. Bieniasz. Divergent Retroviral Late-Budding Domains Recruit Vacuolar Protein Sorting Factors by Using Alternative Adaptor Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, Nr. 21 (2003b): 12414-9.
- Martin-Serrano, J., D. Perez-Caballero, and P. D. Bieniasz. Context-Dependent Effects of L Domains and Ubiquitination on Viral Budding. *J Virol* 78, Nr. 11 (2004): 5554-63.
- Martin-Serrano, J., S. W. Eastman, W. Chung, and P. D. Bieniasz. Hect Ubiquitin Ligases Link Viral and Cellular Ppxy Motifs to the Vacuolar Protein-Sorting Pathway. *J Cell Biol* 168, Nr. 1 (2005): 89-101.

- McClure, M. A. Evolution of Retroposons by Acquisition or Deletion of Retrovirus-Like Genes. *Mol Biol Evol* 8, Nr. 6 (1991): 835-56.
- McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, and I. L. Weissman. Endoproteolytic Cleavage of Gp160 Is Required for the Activation of Human Immunodeficiency Virus. *Cell* 53, Nr. 1 (1988): 55-67.
- Medina, G., Y. Zhang, Y. Tang, E. Gottwein, M. L. Vana, F. Bouamr, J. Leis, and C. A. Carter. The Functionally Exchangeable L Domains in Rsv and Hiv-1 Gag Direct Particle Release through Pathways Linked by Tsg101. *Traffic* 6, Nr. 10 (2005): 880-94.
- Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert, and F. S. Cohen. Evidence That the Transition of Hiv-1 Gp41 into a Six-Helix Bundle, Not the Bundle Configuration, Induces Membrane Fusion. *J Cell Biol* 151, Nr. 2 (2000): 413-23.
- Modrow, S. ; Falke, D. ; Truyen, U.: Retroviren, Molekulare Virologie (vol. Auflage). In: Spektrum Akademischer Verlag GmbH 1 (2003)
- Morita, E., V. Sandrin, S. L. Alam, D. M. Eckert, S. P. Gygi, and W. I. Sundquist. "Identification of Human Mvb12 Proteins as Escrt-I Subunits That Function in Hiv Budding." *Cell Host Microbe* 2, Nr. 1 (2007): 41-53.
- Moyes, D. L., A. Martin, S. Sawcer, N. Temperton, J. Worthington, D. J. Griffiths, and P. J. Venables. The Distribution of the Endogenous Retroviruses Herv-K113 and Herv-K115 in Health and Disease. *Genomics* 86, Nr. 3 (2005): 337-41.
- Myers, E. L., and J. F. Allen. Tsg101, an Inactive Homologue of Ubiquitin Ligase E2, Interacts Specifically with Human Immunodeficiency Virus Type 2 Gag Polyprotein and Results in Increased Levels of Ubiquitinated Gag. *J Virol* 76, Nr. 22 (2002): 11226-35.
- Nikko, E., and B. Andre. Evidence for a Direct Role of the Doa4 Deubiquitinating Enzyme in Protein Sorting into the Mvb Pathway. *Traffic* 8, Nr. 5 (2007): 566-81.
- Obita, T., S. Saksena, S. Ghazi-Tabatabai, D. J. Gill, O. Perisic, S. D. Emr, and R. L. Williams. Structural Basis for Selective Recognition of Escrt-iii by the Aaa Atpase Vps4. *Nature* 449, Nr. 7163 (2007): 735-9.
- Omer, C. A., and A. J. Faras. Mechanism of Release of the Avian Rotavirus TrnatrP Primer Molecule from Viral DNA by Ribonuclease H During Reverse Transcription. *Cell* 30, Nr. 3 (1982): 797-805.

- Orlinsky, K. J., J. Gu, M. Hoyt, S. Sandmeyer, and T. M. Menees. Mutations in the Ty3 Major Homology Region Affect Multiple Steps in Ty3 Retrotransposition. *J Virol* 70, Nr. 6 (1996): 3440-8.
- Ott, D. E. Cellular Proteins Detected in Hiv-1. *Rev Med Virol* 18, Nr. 3 (2008): 159-75.
- Ott, D. E., L. V. Coren, T. D. Copeland, B. P. Kane, D. G. Johnson, R. C. Sowder, 2nd, Y. Yoshinaka, S. Oroszlan, L. O. Arthur, and L. E. Henderson. Ubiquitin Is Covalently Attached to the P6gag Proteins of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus and to the P12gag Protein of Moloney Murine Leukemia Virus. *J Virol* 72, Nr. 4 (1998): 2962-8.
- Ott, D. E., L. V. Coren, R. C. Sowder, 2nd, J. Adams, K. Nagashima, and U. Schubert. Equine Infectious Anemia Virus and the Ubiquitin-Proteasome System. *J Virol* 76, Nr. 6 (2002): 3038-44.
- Ott, D. E., L. V. Coren, T. D. Gagliardi, and K. Nagashima. Heterologous Late-Domain Sequences Have Various Abilities to Promote Budding of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 79, Nr. 14 (2005): 9038-45.
- Pardue, M. L., S. Rashkova, E. Casacuberta, P. G. DeBaryshe, J. A. George, and K. L. Traverse. Two Retrotransposons Maintain Telomeres in *Drosophila*. *Chromosome Res* 13, Nr. 5 (2005): 443-53.
- Parent, L. J., R. P. Bennett, R. C. Craven, T. D. Nelle, N. K. Krishna, J. B. Bowzard, C. B. Wilson, B. A. Puffer, R. C. Montelaro, and J. W. Wills. Positionally Independent and Exchangeable Late Budding Functions of the Rous Sarcoma Virus and Human Immunodeficiency Virus Gag Proteins. *J Virol* 69, Nr. 9 (1995): 5455-60.
- Patarca, R., and W. A. Haseltine. A Major Retroviral Core Protein Related to Epa and Timp. *Nature* 318, Nr. 6044 (1985): 390.
- Patnaik, A., V. Chau, and J. W. Wills. Ubiquitin Is Part of the Retrovirus Budding Machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, Nr. 24 (2000): 13069-74.
- Patnaik, A., V. Chau, F. Li, R. C. Montelaro, and J. W. Wills. Budding of Equine Infectious Anemia Virus Is Insensitive to Proteasome Inhibitors. *J Virol* 76, Nr. 6 (2002): 2641-7.
- Peel, S., P. Macheboeuf, N. Martinelli, and W. Weissenhorn. Divergent Pathways Lead to Escrt-iii-Catalyzed Membrane Fission. *Trends Biochem Sci* 36, Nr. 4 (2011): 199-210.

- Perron, H., J. A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. Paranhos-Baccala, F. Komurian-Pradel, F. Mallet, P. W. Tuke, C. Voisset, J. L. Blond, B. Lalande, J. M. Seigneurin, and B. Mandrand. Molecular Identification of a Novel Retrovirus Repeatedly Isolated from Patients with Multiple Sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, Nr. 14 (1997): 7583-8.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo. 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* 77, Nr. 12 (1980): 7415-9.
- Ponferrada, V. G., B. S. Mauck, and D. P. Wooley. The Envelope Glycoprotein of Human Endogenous Retrovirus Herv-W Induces Cellular Resistance to Spleen Necrosis Virus. *Arch Virol* 148, Nr. 4 (2003): 659-75.
- Pornillos, O., D. S. Higginson, K. M. Stray, R. D. Fisher, J. E. Garrus, M. Payne, G. P. He, H. E. Wang, S. G. Morham, and W. I. Sundquist. Hiv Gag Mimics the Tsg101-Recruiting Activity of the Human Hrs Protein. *J Cell Biol* 162, Nr. 3 (2003): 425-34.
- Puffer, B. A., L. J. Parent, J. W. Wills, and R. C. Montelaro. Equine Infectious Anemia Virus Utilizes a YxxI Motif within the Late Assembly Domain of the Gag P9 Protein. *J Virol* 71, Nr. 9 (1997): 6541-6.
- Putterman, D., R. B. Pepinsky, and V. M. Vogt. Ubiquitin in Avian Leukosis Virus Particles. *Virology* 176, Nr. 2 (1990): 633-7.
- Raiborg, C., and H. Stenmark. The Escrt Machinery in Endosomal Sorting of Ubiquitylated Membrane Proteins. *Nature* 458, Nr. 7237 (2009): 445-52.
- Ren, X., and J. H. Hurley. Vhs Domains of Escrt-0 Cooperate in High-Avidity Binding to Polyubiquitinated Cargo. *EMBO J* 29, Nr. 6 (2010): 1045-54.
- Resnick, R., C. A. Omer, and A. J. Faras. Involvement of Retrovirus Reverse Transcriptase-Associated Rnase H in the Initiation of Strong-Stop (+) DNA Synthesis and the Generation of the Long Terminal Repeat. *J Virol* 51, Nr. 3 (1984): 813-21.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230, Nr. 4732 (1985): 1350-4.

- Saksena, S., J. Sun, T. Chu, and S. D. Emr. Exporting Proteins in the Endocytic Pathway. *Trends Biochem Sci* 32, Nr. 12 (2007): 561-73.
- Sambrook, J. ; Fritsch, E. F. ; Maniatis, T.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition). In: CSH Press. Nr. 2 (1989), 1–1659
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, Nr. 12 (1977): 5463-7.
- Schubert, U., D. E. Ott, E. N. Chertova, R. Welker, U. Tessmer, M. F. Princiotta, J. R. Bennink, H. G. Krausslich, and J. W. Yewdell. Proteasome Inhibition Interferes with Gag Polyprotein Processing, Release, and Maturation of Hiv-1 and Hiv-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, Nr. 24 (2000): 13057-62.
- Segura-Morales, C., C. Pescia, C. Chatellard-Causse, R. Sadoul, E. Bertrand, and E. Basyuk. Tsg101 and Alix Interact with Murine Leukemia Virus Gag and Cooperate with Nedd4 Ubiquitin Ligases During Budding. *J Biol Chem* 280, Nr. 29 (2005): 27004-12.
- Shehu-Xhilaga, M., S. Ablan, D. G. Demirov, C. Chen, R. C. Montelaro, and E. O. Freed. Late Domain-Dependent Inhibition of Equine Infectious Anemia Virus Budding. *J Virol* 78, Nr. 2 (2004): 724-32.
- Somogyi, P., A. J. Jenner, I. Brierley, and S. C. Inglis. Ribosomal Pausing During Translation of an Rna Pseudoknot. *Mol Cell Biol* 13, Nr. 11 (1993): 6931-40.
- Spitzer, C., S. Schellmann, A. Sabovljevic, M. Shahriari, C. Keshavaiah, N. Bechtold, M. Herzog, S. Muller, F. G. Hanisch, and M. Hulskamp. The Arabidopsis Elch Mutant Reveals Functions of an Escrt Component in Cytokinesis. *Development* 133, Nr. 23 (2006): 4679-89.
- Strack, B., A. Calistri, M. A. Accola, G. Palu, and H. G. Gottlinger. A Role for Ubiquitin Ligase Recruitment in Retrovirus Release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, Nr. 24 (2000): 13063-8.
- Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H. G. Gottlinger. Aip1/Alix Is a Binding Partner for Hiv-1 P6 and EiaV P9 Functioning in Virus Budding. *Cell* 114, Nr. 6 (2003): 689-99.
- Strambio-de-Castillia, C., and E. Hunter. Mutational Analysis of the Major Homology Region of Mason-Pfizer Monkey Virus by Use of Saturation Mutagenesis. *J Virol* 66, Nr. 12 (1992): 7021-32.

- Stuchell, M. D., J. E. Garrus, B. Muller, K. M. Stray, S. Ghaffarian, R. McKinnon, H. G. Krausslich, S. G. Morham, and W. I. Sundquist. The Human Endosomal Sorting Complex Required for Transport (Escrt-I) and Its Role in Hiv-1 Budding. *J Biol Chem* 279, Nr. 34 (2004): 36059-71.
- Subramanian, R. P., J. H. Wildschutte, C. Russo, and J. M. Coffin. Identification, Characterization, and Comparative Genomic Distribution of the Herv-K (Hml-2) Group of Human Endogenous Retroviruses. *Retrovirology* 8, (2011): 90.
- Swaminathan, S., A. Y. Amerik, and M. Hochstrasser. The Doa4 Deubiquitinating Enzyme Is Required for Ubiquitin Homeostasis in Yeast. *Mol Biol Cell* 10, Nr. 8 (1999): 2583-94.
- Swanson CM and Malim MH. SnapShot: HIV-1 proteins. *Cell*. (2008): 742, 742.e1.
- Tanzi, G. O., A. J. Piefer, and P. Bates. Equine Infectious Anemia Virus Utilizes Host Vesicular Protein Sorting Machinery During Particle Release. *J Virol* 77, Nr. 15 (2003): 8440-7.
- Tarlinton, R. E., J. Meers, and P. R. Young. Retroviral Invasion of the Koala Genome. *Nature* 442, Nr. 7098 (2006): 79-81.
- Tarlinton, R., J. Meers, and P. Young. Biology and Evolution of the Endogenous Koala Retrovirus. *Cell Mol Life Sci* 65, Nr. 21 (2008): 3413-21.
- Trioulier, Y., S. Torch, B. Blot, N. Cristina, C. Chatellard-Causse, J. M. Verna, and R. Sadoul. Alix, a Protein Regulating Endosomal Trafficking, Is Involved in Neuronal Death. *J Biol Chem* 279, Nr. 3 (2004): 2046-52.
- Tristem, M. Identification and Characterization of Novel Human Endogenous Retrovirus Families by Phylogenetic Screening of the Human Genome Mapping Project Database. *J Virol* 74, Nr. 8 (2000): 3715-30.
- Tucker, S. P., R. V. Srinivas, and R. W. Compans. Molecular Domains Involved in Oligomerization of the Friend Murine Leukemia Virus Envelope Glycoprotein. *Virology* 185, Nr. 2 (1991): 710-20.
- Tuerk, C., S. MacDougal, and L. Gold. Rna Pseudoknots That Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, Nr. 15 (1992): 6988-92.
- Turner, G., M. Barbulescu, M. Su, M. I. Jensen-Seaman, K. K. Kidd, and J. Lenz. Insertional Polymorphisms of Full-Length Endogenous Retroviruses in Humans. *Curr Biol* 11, Nr. 19 (2001): 1531-5.

- Usami, Y., S. Popov, and H. G. Gottlinger. Potent Rescue of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Late Domain Mutants by Alix/Aip1 Depends on Its Chmp4 Binding Site. *J Virol* 81, Nr. 12 (2007): 6614-22.
- VerPlank, L., F. Bouamr, T. J. LaGrassa, B. Agresta, A. Kikonyogo, J. Leis, and C. A. Carter. Tsg101, a Homologue of Ubiquitin-Conjugating (E2) Enzymes, Binds the L Domain in Hiv Type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, Nr. 14 (2001): 7724-9.
- Vito, P., L. Pellegrini, C. Guiet, and L. D'Adamio. Cloning of Aip1, a Novel Protein That Associates with the Apoptosis-Linked Gene Alg-2 in a Ca²⁺-Dependent Reaction. *J Biol Chem* 274, Nr. 3 (1999): 1533-40.
- Vogt, V. M., R. Eisenman, and H. Diggelmann. Generation of Avian Myeloblastosis Virus Structural Proteins by Proteolytic Cleavage of a Precursor Polypeptide. *J Mol Biol* 96, Nr. 3 (1975): 471-93.
- Vogt, V. M., and M. N. Simon. Mass Determination of Rous Sarcoma Virus Virions by Scanning Transmission Electron Microscopy. *J Virol* 73, Nr. 8 (1999): 7050-5.
- von Schwedler, U. K., M. Stuchell, B. Muller, D. M. Ward, H. Y. Chung, E. Morita, H. E. Wang, T. Davis, G. P. He, D. M. Cimbara, A. Scott, H. G. Krausslich, J. Kaplan, S. G. Morham, and W. I. Sundquist. The Protein Network of Hiv Budding. *Cell* 114, Nr. 6 (2003): 701-13.
- Votteler, J., E. Iavnilovitch, O. Fingrut, V. Shemesh, D. Taglicht, O. Erez, S. Sorgel, T. Walther, N. Bannert, U. Schubert, and Y. Reiss. Exploring the Functional Interaction between Posh and Alix and the Relevance to Hiv-1 Release. *BMC Biochem* 10, (2009): 12.
- Walker JM, Gingold EB. Molecular Biology and Biotechnology, 3rd Edition, *Royal Society of Chemistry*, (1993), 41-42
- Wang-Johanning, F., A. R. Frost, G. L. Johanning, M. B. Khazaeli, A. F. LoBuglio, D. R. Shaw, and T. V. Strong. Expression of Human Endogenous Retrovirus K Envelope Transcripts in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 7, Nr. 6 (2001): 1553-60.
- Wang-Johanning, F., A. R. Frost, B. Jian, L. Epp, D. W. Lu, and G. L. Johanning. Quantitation of Herv-K Env Gene Expression and Splicing in Human Breast Cancer. *Oncogene* 22, Nr. 10 (2003): 1528-35.

- Wang, Y., N. M. Wills, Z. Du, A. Rangan, J. F. Atkins, R. F. Gesteland, and D. W. Hoffman. Comparative Studies of Frameshifting and Nonframeshifting Rna Pseudoknots: A Mutational and Nmr Investigation of Pseudoknots Derived from the Bacteriophage T2 Gene 32 Mrna and the Retroviral Gag-Pro Frameshift Site. *RNA* 8, Nr. 8 (2002): 981-96.
- Wang, T., J. Zeng, C. B. Lowe, R. G. Sellers, S. R. Salama, M. Yang, S. M. Burgess, R. K. Brachmann, and D. Haussler. Species-Specific Endogenous Retroviruses Shape the Transcriptional Network of the Human Tumor Suppressor Protein P53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, Nr. 47 (2007): 18613-8.
- Ward, D. M., M. B. Vaughn, S. L. Shiflett, P. L. White, A. L. Pollock, J. Hill, R. Schnegelberger, W. I. Sundquist, and J. Kaplan. The Role of Lip5 and Chmp5 in Multivesicular Body Formation and Hiv-1 Budding in Mammalian Cells. *J Biol Chem* 280, Nr. 11 (2005): 10548-55.
- Weiss, R. A. The Discovery of Endogenous Retroviruses. *Retrovirology* 3, (2006): 67.
- Wills, J. W., R. C. Craven, R. A. Weldon, Jr., T. D. Nelle, and C. R. Erdie. Suppression of Retroviral Ma Deletions by the Amino-Terminal Membrane-Binding Domain of P60src. *J Virol* 65, Nr. 7 (1991): 3804-12.
- Wills, J. W., C. E. Cameron, C. B. Wilson, Y. Xiang, R. P. Bennett, and J. Leis. An Assembly Domain of the Rous Sarcoma Virus Gag Protein Required Late in Budding. *J Virol* 68, Nr. 10 (1994): 6605-18.
- Wu, Y., S. Pan, W. Luo, S. H. Lin, and J. Kuang. Hp95 Promotes Anoikis and Inhibits Tumorigenicity of Hela Cells. *Oncogene* 21, Nr. 44 (2002): 6801-8.
- Yasuda, J., E. Hunter, M. Nakao, and H. Shida. Functional Involvement of a Novel Nedd4-Like Ubiquitin Ligase on Retrovirus Budding. *EMBO Rep* 3, Nr. 7 (2002): 636-40.
- Yeager, M., E. M. Wilson-Kubalek, S. G. Weiner, P. O. Brown, and A. Rein. Supramolecular Organization of Immature and Mature Murine Leukemia Virus Revealed by Electron Cryo-Microscopy: Implications for Retroviral Assembly Mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, Nr. 13 (1998): 7299-304.
- Yu, X., X. Yuan, Z. Matsuda, T. H. Lee, and M. Essex. The Matrix Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Required for Incorporation of Viral Envelope Protein into Mature Virions. *J Virol* 66, Nr. 8 (1992): 4966-71.

- Yu, X., X. Yuan, M. F. McLane, T. H. Lee, and M. Essex. Mutations in the Cytoplasmic Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmembrane Protein Impair the Incorporation of Env Proteins into Mature Virions. *J Virol* 67, Nr. 1 (1993): 213-21.
- Yuan, B., S. Campbell, E. Bacharach, A. Rein, and S. P. Goff. Infectivity of Moloney Murine Leukemia Virus Defective in Late Assembly Events Is Restored by Late Assembly Domains of Other Retroviruses. *J Virol* 74, Nr. 16 (2000): 7250-60.
- Zabransky, A., R. Hadravova, J. Stokrova, M. Sakalian, and I. Pichova. Premature Processing of Mouse Mammary Tumor Virus Gag Polyprotein Impairs Intracellular Capsid Assembly. *Virology* 384, Nr. 1 (2009): 33-7.
- Zhai, Q., R. D. Fisher, H. Y. Chung, D. G. Myszka, W. I. Sundquist, and C. P. Hill. Structural and Functional Studies of Alix Interactions with Ypx(N)L Late Domains of Hiv-1 and EiaV. *Nat Struct Mol Biol* 15, Nr. 1 (2008): 43-9.
- Zhai, Q., M. B. Landesman, H. Robinson, W. I. Sundquist, and C. P. Hill. Identification and Structural Characterization of the Alix-Binding Late Domains of Simian Immunodeficiency Virus SIVmac239 and SIVagmtan-1. *J Virol* 85, Nr. 1 (2011): 632-7.
- Zlotnick, A., S. J. Stahl, P. T. Wingfield, J. F. Conway, N. Cheng, and A. C. Steven. Shared Motifs of the Capsid Proteins of Hepadnaviruses and Retroviruses Suggest a Common Evolutionary Origin. *FEBS Lett* 431, Nr. 3 (1998): 301-4.

8 Anhang

8.1 Oligonukleotide (Primer)

8.1.1 Sequenzierprimer

Tabelle 18: Auflistung der verwendeten spezifischen Sequenzierprimer. FW, „Forward“; Rev, „Reverse“

Name	Orientierung	Sequenz
113RT_Sec1_For	FW	CAG CCA CCA GGT TTC AG
113RT_Seq3_For	FW	GAA CAA GTT AGA CAA G
3CV	FW	CTG TGT CCT AAT GCA TTA TGG
3HERV-SDa	REV	TAG CTT CTT CCG AGC GCA CAA GCT TAC C
3HERV-SDb	REV	TAC CGT AAG GCT GAC TGT AGA CGT ACT C
AM_For	FW	GCC ATG ATG ACG ATG GTG GT
Env_Rev	REV	AGA GCA CGG GGT TGG GGG TAA GGT CAT AG
EnvSeq_F	FW	AGA ACA GCC CAC ATG AAG GA
FL_F	FW	TTC TCT AGG GTG AAG GTA CGC
FR	FW	TTT AGG AGG ACA AGT TAG AAC
H_Seq_E	REV	TGC CGT AGG ATT AAG TCT C
HL_F	FW	ATC TGG TGC CCA ACG TG
LH	REV	GTT GGG CAC CAG ATG TAG
M13	FW	GTA AAA CGA CGG CCA GTG
Pol_Stop_F	FW	TTC CCA AGG ACA GGC CAT AG
Seq113a	FW	CCT CTT CCA GCA GGT CAG
Seq113b	REV	GCT TAA TGG CTG ATT GAC AC

SeqH113c	REV	TAG CGG CCA CTG ATT TAC
SeqH113d	FW	CTT AGG GCC AGA TAA TCA AG
T7	FW	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

8.1.2 Mutageneseprimer

Tabelle 19: Auflistung der Oligonukleotidprimer zur Generierung der L-Domänen-Mutanten bzw. zur Deletion der QP1/2-Peptide in der oriHERV-K113-Sequenz. FW, „Forward“; Rev, „Reverse“

Mutationsort	Name	Ori.	Sequenz
Übergang NC-QP1/2	Ori-QPStop_F	FW	CAA CAA ACT GGG GCA TTC TGA ATT CAG CCA TTT GTT CC
Übergang NC-QP1/2	Ori-QPStop_R	REV	GGA ACA AAT GGC TGA ATT CAG AAT GCC CCA GTT TGT TG
PTAP-Motiv	oriPAAP_f	FW	GCC GCC CAC TAG GAG ACT TAA TCC CGC GGC ACC ACC TAG TAG ACA GGG TAG TG
PTAP-Motiv	oriPAAP_r	REV	CAC TAC CCT GTC TAC TAG GTG GTG CCG CGG GAT TAA GTC TCC TAG TGG GCG GC
YPETLKL-Motiv	LdomSRETAKA-2418_1_F	FW	CAA TTA CAG GAG GTG ATA TCT AGA GAA ACG TTA AAA TTA G
YPETLKL-Motiv	LdomSRETAKA-2418_1_R	REV	CTA ATT TTA ACG TTT CTC TAG ATA TCA CCT CCT GTA ATT G
YPETLKL-Motiv	LdomSRETAKA-2418_2_F	FW	GTA TGG ATA TCT AGA GAA ACG GCA AAA GCA GAA GGA AAA GGT CCA G
YPETLKL-Motiv	LdomSRETAKA-2418_2_R	REV	CTG GAC CTT TTC CTT CTG CTT TTG CCG TTT CTC TAG ATA TCC ATA C
YP(x ₆)L-Motiv	LdomSR(x ₆)A_2694_1_F	FW	GGC AGG GCG CCA TCC AGA CAG CCG CCC ACT AGG AG
YP(x ₆)L-Motiv	LdomSR(x ₆)A_2694_1_R	REV	CTC CTA GTG GGC GGC TGT CTG GAT GGC GC CCT GCC
YP(x ₆)L-Motiv	LdomSR(x ₆)A_2694_2_F	FW	CAG CCG CCC ACT AGG AGA GCT AAT CCT ACG GCA CCA C
YP(x ₆)L-Motiv	LdomSR(x ₆)A_2694_2_R	REV	GTG GTG CCG TAG GAT TAG CTC TCC TAG TGG GCG GCT G

Danksagung

YPD(x ₄)L-Motiv	LdomSRG(x ₄)A_3312_1_F	FW	GTT CAA AAG AGC CCT CTA GAG AGT TTG TGG CAA GGC TC
YPD(x ₄)L-Motiv	LdomSRG(x ₄)A_3312_1_R	REV	GAG CCT TGC CAC AAA CTC TCT AGA GGG CTC TTT TGA AC
YPD(x ₄)L-Motiv	LdomSRG(x ₄)A_3312_2_F	FW	AGA GAG TTT GTG GCA AGG GCC CAA GAT GTT GCT CAA AAG
YPD(x ₄)L-Motiv	LdomSRG(x ₄)A_3312_2_R	REV	CTT TTG AGC AAC ATC TTG GGC CCT TGC CAC AAA CTC TCT

Tabelle 20: Auflistung der Oligonukleotidprimer zur Generierung der PTAP-Mutante im oricoGagCherry Konstrukt (GagCherryPAAP). FW, „Forward“; Rev, „Reverse“

Mutationsort	Name	Ori.	Sequenz
PTAP-Motiv	mutLdom_PAAP_F	FW	CCT CCC ACC AGG CGG CTG AAC GCC CCT CCC AGC AGG CAG AGC GAG
PTAP-Motiv	mutLdom_PAAP_R	REV	CTC GCT GCC CTG CCT GCT GGG AGG GGC CGC GGG GTT CAG CCG CCT GGT GGG AGG

8.2 oriHERV-K113 Sequenz

Gag

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
HERV-K113	MGQTKSKI	KYASYLSFI	ILLKRGV	STKNLIKLF	Q	EQGTLDL	KRIGKEL	QGRKGNII	PLTVNDWAI	IKAALEP
HERV-K101
HERV-K102
HERV-K104
HERV-K107	S
HERV-K108
HERV-K109
HERV-K115
AP000776
AC025420
Y178333
Konsensus
oriHERV-K113

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
HERV-K113	SVSVSDAP	GSIIIDCN	ETKRSK	QKTESL	HCEYVAE	PVMAQST	QADYN	QLQEV	IYPET	LKLEGG
HERV-K101
HERV-K102	L	N	G	V	V	V	V	V	H
HERV-K104	L	L	M	G	V	V	V	V	L	T
HERV-K107	I	L	N	V	V	V	V	V	L	R
HERV-K108
HERV-K109	I	G	N	V	V	V	V	V
HERV-K115	I	L	N	V	V	V	V	V
AP000776	I	L	N	G	V	V	V	V	*	R
AC025420	I	N	G	A	V	V	V	V	T
Y178333	N	R	T
Konsensus	N	R	T
oriHERV-K113	N	R	T

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
HERV-K113	ENKTPP	QVYPP	AEQY	QPPPE	SQYGY	PGMP	PAPQ	GR	APY	QPP
HERV-K101
HERV-K102
HERV-K104	L	I	V	M
HERV-K107	Q	L	H	M
HERV-K108	K
HERV-K109
HERV-K115	E
AP000776	PK
AC025420	M	P
Y178333	R	M	P
Konsensus	R	M	P
oriHERV-K113	R	M	P

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
HERV-K113	PTVEAR	YKSF	SIRK	MLKDM	KEGVK	QYGN	SPYMR	TL	LD	SI
HERV-K101
HERV-K102
HERV-K104	L	L	T
HERV-K107	Y
HERV-K108
HERV-K109	K
HERV-K115	I
AP000776
AC025420	L
Y178333
Konsensus
oriHERV-K113

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
HERV-K113	NWSTIS	QQAAL	MQNEA	IEQVR	AICL	RAW	EKI	QDPG	STC	PSF
HERV-K101
HERV-K102
HERV-K104
HERV-K107
HERV-K108
HERV-K109
HERV-K115
AP000776
AC025420	S
Y178333
Konsensus	N	P
oriHERV-K113	N	P

Danksagung

```

510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
HERV-K113 AGSDVISEYV KACDGMGGAM HKAMLMAQAI TGVVLGGQVR TFGGKCYNCG QIGHLKNCP VLNKQNIITQ ATTTGREPPD LCPRCKGKH WASQCRSKFD
HERV-K101 .....I.....
HERV-K102 .....I.....
HERV-K104 .....I.....
HERV-K107 .....I.....
HERV-K108 .....I.....
HERV-K109 .....I.....
HERV-K115 .....I.....
AP000776 .....I.....
AC025420 .....I.....
Y178333 .....I.....
Konsensus .....I.....
oriHERV-K113 .....I.....

```

```

610      620      630      640      650      660
HERV-K113 KNGQPLSGNE QRGQPQAPQQ TGAFPIQPFV PQGFQGGQPP LSGVFQGISQ LPQYNNCPPP QAAVQQ*
HERV-K101 .....L.....*
HERV-K102 .....E.....*
HERV-K104 .....S.....*
HERV-K107 .....S.....*
HERV-K108 .....V.....*
HERV-K109 .....V.....*
HERV-K115 .....-.....*
AP000776 .....-.....*
AC025420 .....-.....*
Y178333 .....H.....*
Konsensus .....-.....*
oriHERV-K113 .....-.....*

```

Pro

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
HERV-K113 KWATIVGKRA KGPASGPTTN WGIPNSAICS SGFSGTTTPT VPSVSGNKPV TTIQQLSPAT SGSAAVDLCT IQAVSLLPGE PPQKIPTGVY GPLPEGTVGL
HERV-K101 .....S.....
HERV-K102 .....S.....
HERV-K104 .....*.....
HERV-K107 .....LT.....
HERV-K108 .....T.....K.....
HERV-K109 .....T.....K.....
HERV-K115 .....-.....
AP000776 .....-.....
AC025420 .....T.....
Y178333 .....W.....
Konsensus .....-.....
oriHERV-K113 .....-.....

```

```

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
HERV-K113 ILGRSSLNLK GVQIHTSVVD SDYKGEIQLV ISSSIPWSAS PGDRIAQLLL LPYIKGGNSE IKRTGGLGST DPTGKAAIYA SQVSENRPVC KAIIQGKQFE
HERV-K101 .....L.KI.....
HERV-K102 .....I.....T.....
HERV-K104 .....T.....V.....I.EF.....
HERV-K107 .....R.....I.V.....
HERV-K108 .....R.....I.....
HERV-K109 .....V.....R.....I.....
HERV-K115 .....R.....I.....
AP000776 .....K.....I.....I.V.....
AC025420 .....G.....I.....
Y178333 .....G.....I.....
Konsensus .....I.....
oriHERV-K113 .....I.....

```

```

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
HERV-K113 GLVDTGADV IIALNQWPKN WPKQKAVTGL VGISTASEVY QSTEILHCLG PDNQESTVQP MITSIPLNW GRDLLQGWV EITMPAPLYS PTSQKIMTKM
HERV-K101 .....G.....A.....
HERV-K102 .....G.....A.....
HERV-K104 .....E.....G.....Q.....A.....
HERV-K107 .....G.....M.....A.....
HERV-K108 .....G.....M.....A.....S.....
HERV-K109 .....G.....M.....A.....R.....
HERV-K115 .....I.....G.....M.....A.....R.....
AP000776 .....V.....G.....A.....
AC025420 .....G.....A.....T.....
Y178333 .....G.....A.....
Konsensus .....G.....A.....
oriHERV-K113 .....G.....A.....

```

Danksagung

```

          310      320      330
HERV-K113  GYIPGKGLGK NEDGKVPVE AKINQEREI GYPF*
HERV-K101  .....I.F.....K.....*
HERV-K102  .....K.....*
HERV-K104  .....K.....*
HERV-K107  .....K.....*
HERV-K108  .....I.....N.C*
HERV-K109  .....I.F.....K.....*
HERV-K115  .....I.F.....K.....*
AP000776  .....I.....K.....*
AC025420  .....K.....*
Y178333    ..L.....I.....K.....*
Konsensus  .....I.....K.....*
oriHERV-K113  .....I.....K.....*
    
```

Pol

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
HERV-K113  NKSRRNRV SFLGAATVEP PKPIPLTWKT EKPVVVNQWP LPKQKLEALH LLANEQLEKQ HIEPSFSPWN SPVFVVIQKKS GKWRMLDLDL AVNAVIQPMG
HERV-K101  ..K.....I.....Q.....
HERV-K102  .....K.....
HERV-K104  ..K.....
HERV_K107  .....V.....HT.....
HERV-K108  .....E.L.....
HERV-K109  ..K.....I.....
HERV-K115  ..K.....V.I.....L.....
AP000776  ..K.....
AC025420  ..K.....L.....L.....F.....I.....
Y178333    ..K.....V.....
Konsensus  ..K.....
oriHERV-K113  ..K.....

          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
HERV-K113  PLQPGLPSPA MIPKDWELII IDLKDCFFTI PLAEQDCEKF AFTIPAINNK EPATRFQWKV LFGQMLNSPT ICQTFVGRAL QPVRDKFSDC YIIHYIDDIL
HERV-K101  .....
HERV-K102  .....*.....E.....
HERV-K104  ..SR.....VL.....
HERV_K107  .....E.....
HERV-K108  .....E.....C.....
HERV-K109  .....
HERV-K115  .....K.....
AP000776  .....E.....
AC025420  .....E.....
Y178333    .....L.....E.....
Konsensus  .....E.....
oriHERV-K113  .....E.....

          210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
HERV-K113  CAAEKDKLI DCYTFLQAEV ANAGLAIASD KIQTSTPFHY LGMQIENRKI KPQKIEIRKD TLKTLNDFQK LLGDINWIRP TLGIPTYVMS NLFSLIRGDS
HERV-K101  .....S.....
HERV-K102  .....R.....V.....
HERV-K104  .....Y.....
HERV_K107  .....A.....
HERV-K108  .....A.....
HERV-K109  .....W.....A.....
HERV-K115  .....S.....Q.....A.....
AP000776  .....A.....
AC025420  .....I.....A.....
Y178333    ..M.....E.....P.....
Konsensus  .....A.....
oriHERV-K113  .....A.....

          310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
HERV-K113  DLNSKRMLTP ETTKEIKLVE EKIQSAQINR IDPLAPLRLI IFATAHSPIG IIIQNTDLVE WSFLPHSTVK TFTLYLDQIA TLIGQTRLRI IKLCGNDDPK
HERV-K101  .....A.....T.....Q.....
HERV-K102  .....I.....A.....Q.....T.....
HERV-K104  .....A.....V.....Q.....T.....
HERV_K107  ..Q.I...A.....Q.....T.....
HERV-K108  .....A.....Q.....T.....
HERV-K109  .....A.....Q.....T.....
HERV-K115  .....I.....A.....Q.....T.....
AP000776  .....A.....Q.....T.....
AC025420  .....A.....Q.....T.....
Y178333    .....A.....Q.....T.....M.....
Konsensus  .....A.....Q.....T.....
oriHERV-K113  .....A.....Q.....T.....
    
```

Danksagung

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
HERV-K113	IVVPLTKEQV	RQAFINSGAW	QIGLANFVGI	IDNHYPKTKI	FQFLKLTWII	LPKITRREPL	ENALTVFTDG	SSNGKAAATG	LKERVIKTPY	QSAQRaelVA
HERV-K101									P	
HERV-K102									P	
HERV-K104		D				H			P	*
HERV_K107			L						P	
HERV-K108			K						P	
HERV-K109			K						P	
HERV-K115									P	
AP000776									P	
AC025420									P	
Y178333					M				P	Q
Konsensus									P	
oriHERV-K113									P	

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
HERV-K113	VITVLQDFDQ	PINIISDSAY	VVQATRDVET	ALIKYSMDQD	LNQLFNLLQQ	TVRKRNFPPY	ITHIRAHNTL	PGPLTKANEQ	ADLLVSSALI	KAQELHALTH
HERV-K101										
HERV-K102										
HERV-K104									F	
HERV_K107										
HERV-K108										
HERV-K109										
HERV-K115			V							
AP000776								K		
AC025420		S							V	A
Y178333										
Konsensus										
oriHERV-K113										

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
HERV-K113	VNAAGLNKNF	DVTWKQAKDI	VQHCTQCQVL	HLPTQEAGVN	PRGLCPNALW	QMDVTHVPSF	GRLSYVHVTV	DTYSHFIWAT	CQTGESTSHV	KKHLLSCFAV
HERV-K101										
HERV-K102				I						
HERV-K104										
HERV_K107										
HERV-K108										
HERV-K109										
HERV-K115										
AP000776		L							H	
AC025420								L		
Y178333	V					S	I			
Konsensus										
oriHERV-K113										

	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
HERV-K113	MGVPEKIKTD	NGPGYCSKAF	QKFLSQWKIS	HTTGIPYNSQ	GQAIVERTNR	TLKTQLVKQK	EGGDSKECTT	PQMQLNLAPY	TLNFLNIYRN	QTTTSABQHL
HERV-K101									L	
HERV-K102			R						L	
HERV-K104						N			L	
HERV_K107									L	
HERV-K108									L	
HERV-K109									L	
HERV-K115									L	
AP000776									L	
AC025420									L	G
Y178333									L	
Konsensus									L	
oriHERV-K113									L	

	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
HERV-K113	TGKKNSPHEG	KLIHWKDNKN	KTWEIGKVIT	WGRGFACVSP	GENQLPVMTP	TRHLKPYNEP	IGDAKKSTSA	ETETPQSSIV	DSQDEQNGDV	RRTDEVALHQ
HERV-K101					I		RA	T		
HERV-K102					I		RA	T		
HERV-K104	*							L		R
HERV_K107				*			RA	T		
HERV-K108					I				S	
HERV-K109					I	P	R			
HERV-K115					I		R			
AP000776					I		R			
AC025420					I	A			I	X
Y178333					I					
Konsensus					I		R			
oriHERV-K113					I					

Danksagung

```

          910      920      930      940      950
HERV-K113  EGRAADLGT KEADAVSYKI SREHKGDTNP REYAACSLDD CINGGKSPYA CRSSCS*
HERV-K101  -----
HERV-K102  -----
HERV-K104  -----
HERV_K107  -----
HERV-K108  .....N.....
HERV-K109  -----
HERV-K115  -----
AP000776  .....N.....
AC025420  -----
Y178333   .S.....
Konsensus  -----
oriHERV-K113 -----

```

Env

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
HERV-K113  MNPSEMQRKA PPRRRRHRNR APLTHKMNMK VTSEEQMKLP STKKAEPPTW AQLKKLTQLA TKYLENTKVT QTPESMLLAA LMIVSMVVS L PMPAGAAAAN
HERV-K101  .....G...W*.....
HERV-K102  ...L...G...W*.....
HERV-K104  .....C.....E.....*...C.....
HERV-K107  .....G...G*.....
HERV-K108  -----
HERV-K109  -----
HERV-K115  -----
AP000776  -----
AC025420  .H.....
Y178333   -----
Konsensus  -----
oriHERV-K113 -----

```

```

          110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
HERV-K113  YTYWAYVFPF PLIRAVTWMD NPIELYVNS VVWPGPTDDC CPAKPEEEMG MINISIGYRY PPICLGRAPG CLMPAVQNLW VEVPTVSPIS RFTYHVMVSGM
HERV-K101  -----
HERV-K102  .....V...E...R.....
HERV-K104  .....V...I...R.....
HERV-K107  .....V...I...R.....
HERV-K108  .....T.V...I...R.....H.....
HERV-K109  .N.....V...I...R.....I...C.....
HERV-K115  .N.....V...I...R.....T.....
AP000776  .....V...I...R.....
AC025420  .N.....V...H...I...R.....H.....
Y178333   .....V...R.....
Konsensus  .....V...I...R.....
oriHERV-K113 -----

```

```

          210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
HERV-K113  SLRPRVNYLQ DFSYQSLKF RPKGKPCPK EIPKESKNT E V LWEECVANS AVILQNEPFG TLIDWAPRGQ FVHNCSGQTQ SCPSAQVSPA VSDLTESLD
HERV-K101  .....P.....
HERV-K102  .....P.....
HERV-K104  .....P.....R.....
HERV-K107  .....P.....*.....
HERV-K108  .....P.....
HERV-K109  .....P.....T.Q.....
HERV-K115  .....P.....
AP000776  .....P.....
AC025420  .....V.....
Y178333   .....F.....
Konsensus  .....P.....
oriHERV-K113 -----

```

```

          310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
HERV-K113  KHKHKKLQSF YPWEWGEKGI STARPKLIIS VSGPEHP ELW RLTVASHHIR IWSGNQTL E T RDRKPFYTI D LNSSLTVPLQ SCVKPPYMLV VGNIVIKPDS
HERV-K101  .....P.....
HERV-K102  .....R...P...V.....C.....
HERV-K104  .....P...P...V.....C.....
HERV-K107  .....P...V.....C.....
HERV-K108  .....P...V.....
HERV-K109  .....P...V.....L.....
HERV-K115  .....R...P...V.....L.....
AP000776  .....P...V.....
AC025420  .....P.....
Y178333   .....P.....V.....V.....I.....
Konsensus  .....P.....V.....
oriHERV-K113 -----

```

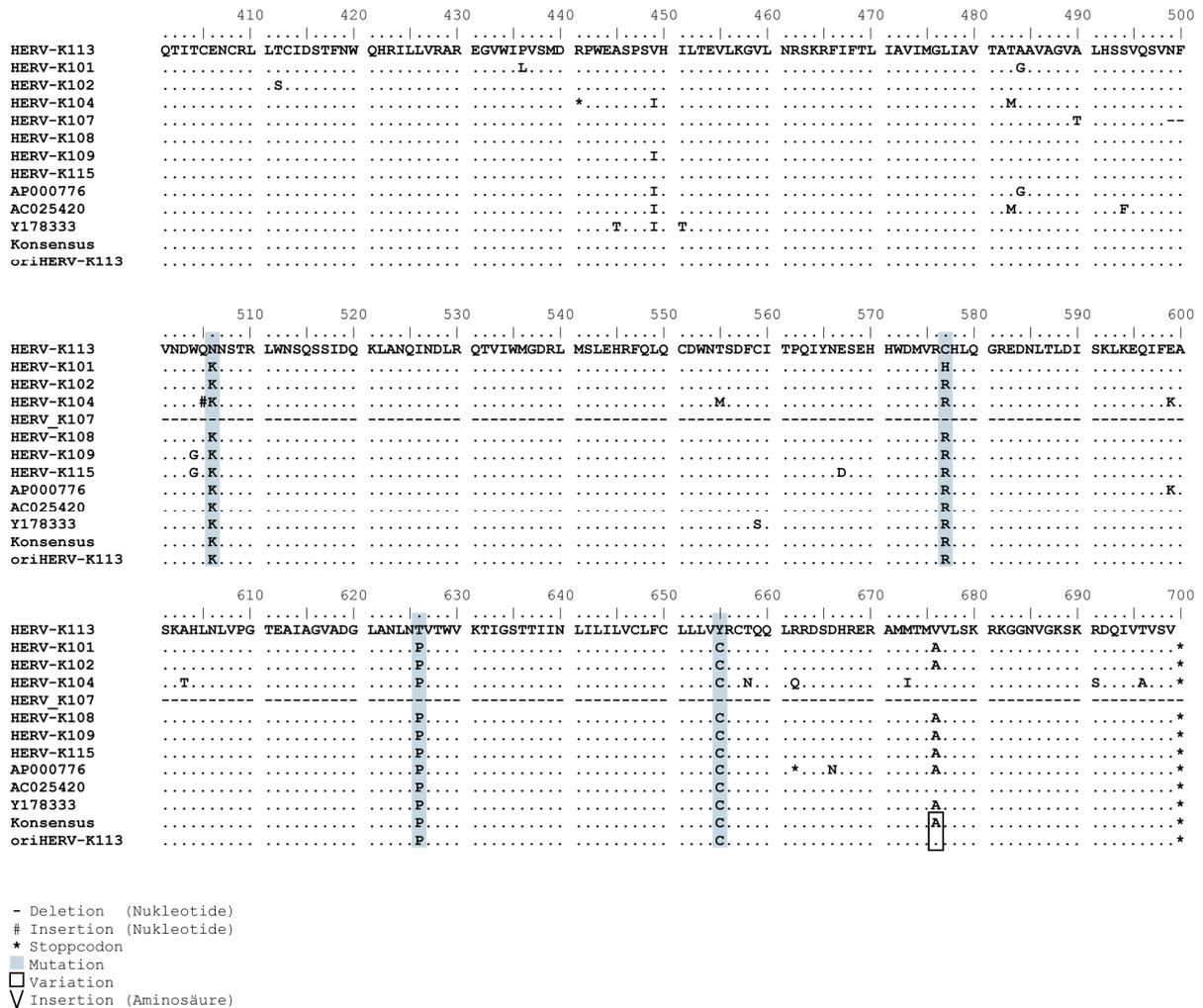


Abbildung 48: Sequenzvergleich zur Herstellung eines ursprünglichen, zum Zeitpunkt der Integration in das menschliche Genom oriHERV-K113 Konstrukts. Um postinsertionale Mutationen zu identifizieren, wurde die gag-, pro-, pol- und env-Sequenz von HERV-K113 mit zehn anderen gut erhaltenden HML-2-Mitgliedern (HERV-K101, HERV-K102, HERV-K104, HERV-K107, HERV-K108, HERV-K109, HERV-K115, AP000776, AC025420 und Y178333) abgeglichen. Zusätzlich wurde eine Konsensussequenz aus allen Elementen generiert und die oriHERV-K113-Sequenz aus der Identifizierung und Korrektur postinsertionaler Mutationen (grau hinterlegt). K113 spezifische Polymorphismen (schwarz eingerahmt) blieben unverändert und lagen vor, wenn mindestens zwei weitere provirale Env-Sequenzen an derselben Aminosäureposition wie HERV-K113 von der Konsensussequenz abweichen. Abbildung aus Hanke *et al.*, 2009 und George *et al.*, 2011 (verändert).

8.3 Abkürzungsverzeichnis

®	eingetragenes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
ALV	<i>Aviäres Leukosevirus</i>
AP	alkalische Phosphatase
APOBEC3	„apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic Polypeptide 3“
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestilliert
AS	Aminosäuren
BaEV	<i>Pavian endogene Retrovirus</i>
Bp	Basenpaare
BFV	<i>Bovines Spumavirus</i>
BLV	<i>Bovines Leukämie-Virus</i>
CA	Kapsid
cLSM	konfokale Laserscanning-Mikroskopie
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DUB	deubiquitinierendes Enzym
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EIAV	<i>Virus der infektiösen Anämie der Pferde</i>
Env	Hüllprotein (engl. „envelope protein“)
ER	endoplasmatischen Retikulum
ERV	Endogenes Retrovirus
ESCRT	„endosomal sorting complex required for transport“
<i>et al.</i>	und andere (lat. „et alii“ beziehungsweise „et aliae“)
FeLV	<i>Felines Leukämie-Virus</i>
FFV	<i>Felines Spumavirus</i>
FIV	<i>Felines Immundefizienzvirus</i>
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigungskonstante 9.81 m/s
Gag	gruppenspezifisches Antigen
GALV	<i>Gibbonleukämievirus</i>
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HBS	„Hepes buffer saline“
HERV	<i>Humanes endogenes Retrovirus</i>
HIV	<i>Humanes Immundefizienzvirus</i>
HML	„humane MMTV-like“
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. „Horseradishperoxidase“)
IAPs	„Intracisternal Type-A Particles“
Int	Integrase
ITCV	„International Committee on Taxonomy of Viruses“
JSRV	<i>Jaagsiekte Sheep Retrovirus</i>
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
KoRV	<i>Koala Retrovirus</i>
LB	„lysogeny broth“
L-Domäne	„Late assembly“-Domäne
LTR	„Long terminal repeats“
MA	Matrix
MVB	multivesikuläre, späte Endosomen (engl.: „multivesicular bodies“)
Mg	Magnesium
M	molare Masse
min	Minute
ml	Milliliter
MLV	<i>Mäuseleukämievirus</i>
Mm	Millimeter
MMTV	<i>Maus-Mammatumor-Virus</i>
Mn	Mangan
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
MSRV	<i>MS-assoziiertes Retrovirus</i>
MVV	<i>Maedi-Visna-Virus der Schafe</i>
NC	Nukleokapsid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	offene Leserahmen (engl. „open reading frame“)
ori	original

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PcEV	<i>Steppenpavian endogenen Retrovirus</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PERV	Porcines endogenes Retrovirus
PB	Primer-Bindestelle
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PLZF	promyelozytisches Leukämie Zinkfinger Protein
Pol	Polymerase
PP	Polypurintrakt
Pro	Protease
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseH	RibonukleaseH
rpm	Umdrehung pro Minute
RSV	<i>Rous-Sarkomvirus</i>
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SA	Spleißakzeptorstelle
Sag	Superantigen
SD	Spleißdonorstelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERV	<i>Affen endogenen Retrovirus</i>
SFV	<i>Simianes Foamyvirus</i>
siRNA	„small interfering RNA“
SIV	<i>Simianes Immundefizienzvirus</i>

SnRV	<i>Schlangen-Retrovirus</i>
SNV	<i>Milz-Nekrosevirus</i>
SP1	„spacer peptid 1“
SRV	<i>Simianes D-Typ Retrovirus</i>
SU	externes Glykoprotein
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TICS	„TSG-3'-induced cellular structures“
TM	transmembranes Hüllprotein
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tsg101	„tumour susceptibility gene“
U3	unique3
U5	unique5
UV	ultraviolett
V	Volt
Vps	„vacuolar protein sorting“
WDSV	<i>Zander-Hautsarkomvirus</i>
w/v	„weight to volume“

Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt:

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
X	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin

9 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Dr. Norbert Bannert für seine vielen Bemühungen und seine Unterstützung in den verschiedenen Abschnitten der Arbeit danken. Er gab mir die Möglichkeit in seiner Gruppe diese Arbeit durchzuführen und ermöglichte es mir, mit seinen hilfreichen Vorschlägen meine Arbeit zu planen. Weiterhin danke ich ihm für sein Engagement während der schriftlichen Phase der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel von der Freien Universität Berlin danke ich für die externe Betreuung und Begutachtung der vorliegenden Arbeit

Ganz besonders Bedanken möchte ich mich bei Oliver Hohn und Kirsten Hanke für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung meiner Promotionsarbeit und die fachlichen Ratschläge bezüglich der Laborarbeit. Vielen Dank für die hilfreichen Anregungen und den moralische Beistand.

Bedanken möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe von ZBS4/FG18 und besonders bei Kazimierz Madela, Lars Niederstadt, Veronika Lausch und Lars Möller.

Weiterhin gilt großen Dank meinen Freundinnen Sandy Krause und Sandra Bleck sowie meinen Brüdern Christoph und Jens-Christoph für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke meinen Eltern, da sie mir durch ihre Unterstützung das Studium erst ermöglicht haben. Ich danke insbesondere meinem Vater der mir mit Rat und Tat bei der Vollendung der schriftlichen Form zur Seite stand.

Besonderen Dank gilt Tobias Ziehl, der bereit war glückliche und frustrierende Momente während der Doktorarbeit mit mir zu teilen. Er half mir schwierige Momente durchzustehen und fest an meine Arbeit und meine Ziele zu glauben. Ich danke ihm auch für die Freude die er mit mir teilt, diese Arbeit fertiggestellt zu haben.

10 Erklärung

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Robert Koch-Institut in Berlin in der Zeit vom 01. Januar 2009 bis zum 31. Dezember 2011 durchgeführt.

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

Berlin, den 14.09.2012

.....

Claudia Chudak