

**FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER  
HERV-K PROTEINE ENV UND REC**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
d o c t o r   r e r u m   n a t u r a l i u m

vorgelegt von

Kirsten Hanke

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

Januar 2010

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin.

Angefertigt unter der Betreuung von Dr. Norbert Bannert

November 2005 bis Dezember 2009

Erster Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kurth, Robert Koch-Institut, Berlin

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 26. März 2010

## Zielsetzung

Die Funktionsweise der HERV-K Proteine ist bei weitem noch nicht vollständig verstanden. Sequenzvergleiche und erste Funktionsstudien deuteten jedoch an, dass auch die HERV-K113 Proteine aufgrund von Mutationen ihre Funktionalität verloren haben könnten. Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktionalität des HERV-K113 Env- und Rec-Proteins zu überprüfen und gegebenenfalls wiederherzustellen. Mit diesen funktionellen Proteinen sollten weiterführende Studien möglich sein. Bisher konnte für das HERV-K113 Env weder ein Einbau in Viruspartikel noch Infektiosität nachgewiesen werden. Mit einem rekonstituierten Hüllprotein könnten diese beiden Prozesse während der HERV-K Replikation besser verstanden werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, das funktionelle und onkogenetische Potential des Rec-Proteins näher zu charakterisieren. Durch einen „Yeast Two-Hybrid“-Versuch mit dem HERV-K Rec-Protein sollen Interaktionspartner des Rec-Proteins detektiert und die Rolle dieser Interaktion in der Tumorgenese und Virusphysiologie untersucht werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Retroviren . . . . .	8
1.1.1	Struktureller Aufbau der Retroviren . . . . .	9
1.1.2	Replikationszyklus . . . . .	11
1.1.3	Genomischer Aufbau des Provirus . . . . .	13
1.2	Endogene Retroviren . . . . .	15
1.2.1	Die HERV-K(HML-2) Familie und HERV-K113 . . . . .	18
1.2.2	Proviralear Aufbau von HERV-K113 . . . . .	20
1.2.3	Die Rolle des Hüllproteins Env während der HERV-K Replikation	21
1.2.4	Der virale RNA-Transport . . . . .	26
1.2.4.1	Das HIV-1 Rev-Protein . . . . .	27
1.2.4.2	HERV-K Rec/RcRE . . . . .	30
1.2.5	HERV-K und Krebs . . . . .	31
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>35</b>
2.1	Materialien . . . . .	35
2.1.1	Laborgeräte, Apparaturen und Hilfsmittel . . . . .	35
2.1.2	Chemikalien, Enzyme und Größenstandards . . . . .	35
2.1.3	Puffer und Nährmedien . . . . .	36
2.1.4	Kits . . . . .	37
2.1.5	Konstrukte . . . . .	37
2.1.6	Bakterienstämme . . . . .	38
2.1.7	Antibiotika . . . . .	38
2.1.8	Antikörper . . . . .	38
2.1.9	Software . . . . .	39
2.1.10	Oligonukleotide (Primer) . . . . .	39
2.2	Methoden . . . . .	40
2.2.1	Yeast Two-Hybrid System . . . . .	40

---

2.2.1.1	Hefe-Transformation . . . . .	41
2.2.1.2	Yeast Two-Hybrid Analyse . . . . .	41
2.2.2	DNA-Analytik . . . . .	43
2.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	43
2.2.2.2	Expand High Fidelity PCR . . . . .	43
2.2.2.3	Mutagenese-PCR . . . . .	44
2.2.2.4	Restriktion mit Endonukleasen . . . . .	45
2.2.2.5	Ligation . . . . .	45
2.2.2.6	DNA-Agarosegelelektrophorese . . . . .	46
2.2.2.7	Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten . . . . .	46
2.2.2.8	Herstellung elektrokompenter „One Shot“ Top10 <i>E. coli</i> . . . . .	47
2.2.2.9	Transformation . . . . .	47
2.2.2.10	Plasmidisolierung . . . . .	48
2.2.2.11	DNA-Bestimmung . . . . .	48
2.2.2.12	Sequenzierungs-PCR . . . . .	48
2.2.3	Zellkultur . . . . .	49
2.2.3.1	Puffer und Medien . . . . .	49
2.2.3.2	Zellbiologische Verbrauchsmaterialien . . . . .	49
2.2.3.3	Eukaryotische Zelllinien . . . . .	50
2.2.3.4	Zellkultivierung . . . . .	50
2.2.3.5	Transfektion . . . . .	51
2.2.3.6	Infektionsversuche . . . . .	52
2.2.3.7	Androgenrezeptor-Transaktivierungsassays . . . . .	52
2.2.3.8	Messung des RNA-Transports . . . . .	53
2.2.4	Protein-Analytik . . . . .	53
2.2.4.1	Zellyse/Proteinextraktion . . . . .	53
2.2.4.2	Immunpräzipitation . . . . .	54
2.2.4.3	Herstellung rekombinanter Proteine . . . . .	54
2.2.4.4	Pull Down Versuche . . . . .	55
2.2.4.5	Ultrazentrifugation (UZ) . . . . .	56

---

2.2.4.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . .	56
2.2.4.7	Western Blot . . . . .	56
2.2.4.8	Immunfluoreszenz-Färbung (cLSM) . . . . .	57
2.2.4.9	p24 Gag-ELISA . . . . .	58
2.2.4.10	Cavidi . . . . .	59
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
3.1	Funktionelle Untersuchungen zum Hüllprotein . . . . .	60
3.1.1	Codonoptimierung des <i>env</i> -Gens . . . . .	61
3.1.2	Rekonstitution der ursprünglichen HERV-K113 Env-Proteinsequenz	62
3.1.3	Toxizitätsbestimmung . . . . .	65
3.1.4	Einbau des rekonstituierten Hüllproteins in lentivirale Partikel .	66
3.1.5	Einbau des Hüllproteins in HERV-K113-Partikel . . . . .	68
3.1.6	Untersuchung der infektiösen Eigenschaften des HERV-K113 Hüll- proteins . . . . .	70
3.1.7	Verstärkung der Infektionsrate durch SEVI . . . . .	71
3.2	Funktionelle Untersuchungen zum Rec-Protein . . . . .	75
3.2.1	Identifikation von Interaktionspartnern des Rec-Proteins mittels eines „Yeast Two-Hybrid“-Systems . . . . .	75
3.2.2	Optimierung der Rec-Expression . . . . .	78
3.2.3	Rekonstitution der originalen Rec-Sequenz . . . . .	79
3.2.4	Bestätigung der Interaktion des oricoRecs mit Staufen-1 und hSGT im YTH-Versuch . . . . .	82
3.2.5	Bestätigung der Interaktion mittels Coimmunpräzipitation . . .	82
3.2.6	Untersuchungen zur Colokalisation . . . . .	83
3.2.7	Identifikation der oricoRec-interagierenden Domäne . . . . .	85
3.2.8	Einfluss von Staufen-1 und hSGT auf den viralen RNA-Transport	88
3.2.9	Einfluss von Staufen-1 und hSGT auf die virale Partikelbildung	90

---

3.2.10	Die Interaktion von Rec mit Staufen-1 hat Einfluss auf Prozesse nach dem nukleozytoplasmatischen Transport und die Virus-RNA-Verteilung . . . . .	91
3.2.11	Pathogenetische Effekte der Rec-hSGT-Interaktion . . . . .	97
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>106</b>
4.1	Das HERV-K113 Hüllprotein . . . . .	106
4.1.1	Rekonstitution des Hüllproteins . . . . .	106
4.1.2	Der Einfluss C-terminaler Modifikationen auf die Eigenschaften des Hüllproteins . . . . .	109
4.1.3	Der Einfluss von SEVI auf die Infektiosität . . . . .	110
4.2	Funktionelle Charakterisierung des HERV-K Rec-Proteins . . . . .	113
4.2.1	Optimierung der Expression . . . . .	113
4.2.2	Die Suche nach weiteren Interaktionspartnern . . . . .	115
4.2.3	Rec-Interaktion mit Staufen-1 . . . . .	116
4.2.4	Interaktion von Rec mit hSGT . . . . .	129
4.2.4.1	Implikation der Rec-hSGT-Interaktion in der Krebsentwicklung . . . . .	134
4.3	Zusammenfassung . . . . .	136
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung der Arbeit</b>	<b>138</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>XXXV</b>
A.1	Oligonukleotide (Primer) . . . . .	XXXV
A.1.1	Sequenzierprimer . . . . .	XXXV
A.1.2	Mutageneseprimer . . . . .	XXXV
A.1.3	Klonierungsprimer . . . . .	XXXVI
A.2	Sequenzen . . . . .	XXXIX
A.2.1	coEnv-Sequenz . . . . .	XXXIX
A.3	Abkürzungen . . . . .	XL
A.4	Publikationsliste . . . . .	XLIV

**B Danksagung**

**XLV**

**C Erklärung**

**XLVII**



# 1 Einleitung

## 1.1 Retroviren

Die Familie der Retroviren (Retroviridae) setzt sich aus morphologisch und funktionell unterschiedlichen, umhüllten Viren zusammen, die zwei Kopien eines RNA-Einzelstrang-Genoms in Plusstrangorientierung tragen. Ihr auffälligstes Merkmal ist die Reverse Transkription. Während der Replikation wird die genomische RNA durch die Reverse Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umgeschrieben und anschließend in das Wirtsgenom integriert. Von der Aktivität der Reversen Transkriptase leitet sich auch der Name der Retroviren ab.

Die zur Zeit gültige Taxonomie wurde vom „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV) erstellt. Aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaftsverhältnisse werden die Retroviridae in zwei Unterfamilien unterteilt: in die Orthoretrovirinae und in die Spumaretrovirinae. Während die Lentiviren sowie  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -, und  $\epsilon$ -Retroviren Genera der Orthoretrovirinae sind, gehören die Foamy- beziehungsweise Spumaviren zu den Spumaretrovirinae.

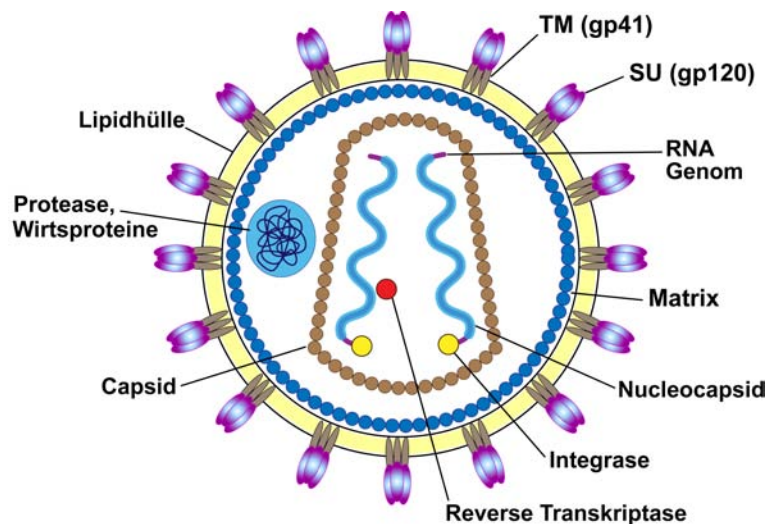
Zu den Retroviren zählen Erreger weit verbreiteter Infektionskrankheiten, die sowohl bei Tieren als auch beim Menschen auftreten können. So infizieren sie neben Säugtieren auch andere Wirbeltiere wie Vögel, Amphibien, Reptilien und Fische. Die wohl bekanntesten Vertreter der Retroviridae, die Humanen Immundefizienzviren (HIV-1/HIV-2), werden zum Genus der Lentiviren gezählt und gelten als Erreger des erworbenen Immunschwäche Syndroms, abgekürzt AIDS („acquired immunodeficiency syndrome“) [10], [111].

Auch Tumorerkrankungen können durch Retroviren ausgelöst werden. Als eines der bekanntesten Beispiele gilt hierfür das Humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ-1 (HTLV-1), der Verursacher der adulten T-Zell-Leukämie (ATL) [259]. Ein weiterer wichtiger Vertreter der Retroviren ist das zum Genus der  $\beta$ -Retroviren gehörende „Mouse Mammary Tumour Virus“ (MMTV), das erstmals 1936 von John J. Bittner mit malignen Milchdrüsenenerkrankungen bei der Maus in Verbindung gebracht wurde [20].

Neben den infektiösen exogenen gibt es auch endogene Retroviren. Infiziert ein Retrovirus Zellen der Keimbahn und integriert hier in das Wirtsgenom, kann die Virusinformation zusammen mit der Elterninformation auf die Nachkommen weitergegeben, also vertikal vererbt werden.

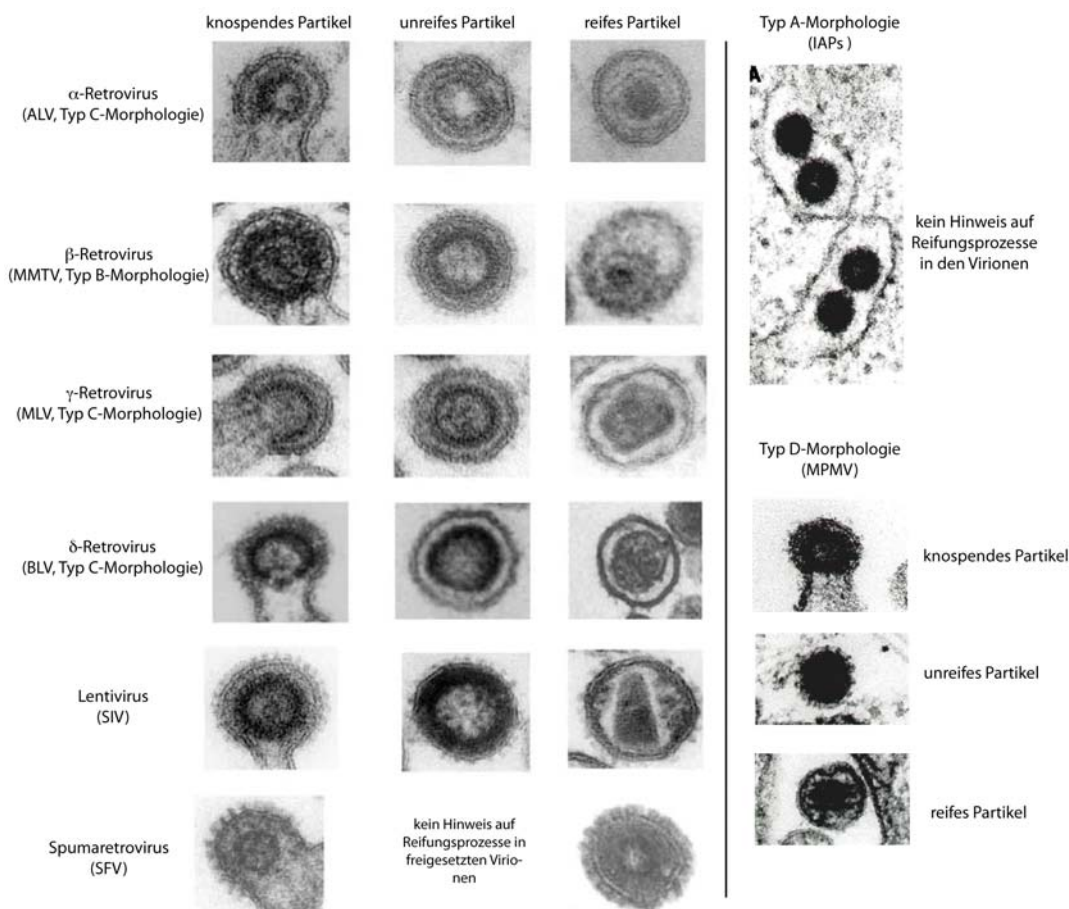
### 1.1.1 Struktureller Aufbau der Retroviren

Retroviren bilden charakteristische, umhüllte Viruspartikel mit einem Durchmesser von circa 100 nm [231]. Der Aufbau des HIV-1-Partikels ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Retrovirus am Beispiel von HIV-1:** In die Membran ist das Hüllprotein, bestehend aus transmembraner Untereinheit (TM) und Oberflächen-glykoprotein (SU), eingelagert. Das Gag-Vorläuferprotein wird in Matrix-, Capsid- und Nucleocapsid prozessiert. Im Zentrum befindet sich die vom Nucleocapsid geschützte ss(+)RNA. Weiterhin befinden sich enzymatische Proteine, wie die Reverse Transkriptase (RT), die Protease (Pro) und die Integrase (Int) im Virion. Abbildung verändert nach US National Institute of Health/Carl Henderson; <http://www.niaid.nih.gov/factsheets/graphics/howhiv.jpg>

Alle retroviralen Genome bestehen aus mindestens vier Genen: *gag*, *pro*, *pol* und *env*. Das *gag*-Gen kodiert für das Hauptstrukturpolyprotein Gag, dessen alleinige Expression ausreicht, um unreife, nicht-infektiöse Virus-artige Partikel (VLPs) zu bilden. Die virale Protease wird durch das *pro*-Gen kodiert und ermöglicht die Partikelreifung, bei der das Gag-Vorläuferprotein in Matrix-, Capsid- und Nucleocapsidprotein pro-



**Abbildung 2: Morphologie typischer retroviraler Vertreter bei der Knospung, im unreifen Stadium und im reifen Stadium:** Dünnschnitt-EM von virusinfizierten Zellen. Die durchschnittliche Größe der retroviralen Partikel liegt zwischen 100 und 150 nm. Unreife Partikel sind im Zentrum hell und weisen einen dunklen Gag-Ring auf. Während der Partikelreifung wird das Gag-Vorläuferprotein durch die virale Protease gespalten und es wird das charakteristische virale Capsid ausgebildet. Linker Teil: Es sind Vertreter der  $\alpha$ -Retroviren (ALV),  $\beta$ -Retroviren (MMTV),  $\gamma$ -Retroviren (MLV),  $\delta$ -Retroviren (BLV), Lentiviren (SIV) und Spumaretroviren (SFV) dargestellt. Die entsprechende morphologische Typisierung ist vermerkt. Entnommen aus dem Buch „Retroviruses“ von R. Kurth und N. Bannert [175]. Rechter Teil: Ergänzende Aufnahmen zu Typ A- (IAP) und Typ D-Retroviren (MPMV) aus dem Buch „Retroviruses“ von J. M. Coffin [64].

zessiert wird. Im reifen Virion befindet sich das virale Capsid beziehungsweise Core meist im Partikelzentrum und kann von Virusstamm zu Virusstamm verschieden gestaltet sein. Abhängig von ihrer Corestruktur und dem Knospungsprozess können die verschiedenen Retrovirusstämme morphologisch in Typ A, B, C oder D unterschieden werden. In Abbildung 2 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von knospenden Vi-

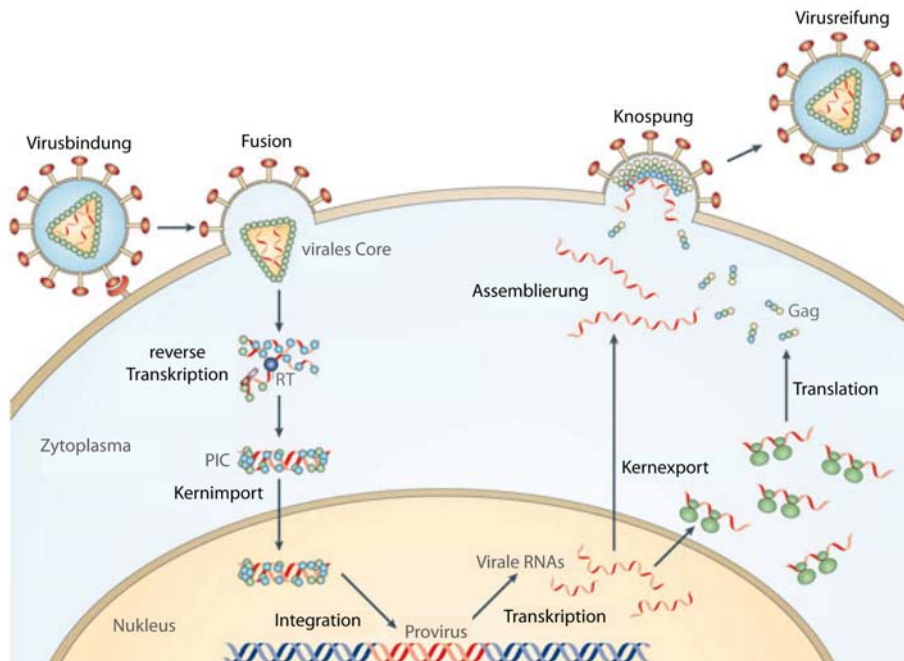
rionen sowie unreifen und reifen Partikeln ausgesuchter Prototypen der verschiedenen Genera dargestellt. Unter Typ A-Partikeln werden Partikel verstanden, die in das endoplasmatische Reticulum knospen. Dazu gehören die „Intracisternal Type-A Particles“ (IAPs), die von endogenen Retrovirus-artigen Elementen in Nagern gebildet werden. Die häufig vorkommende Typ C-Morphologie ist dadurch gekennzeichnet, dass das Core rund oder leicht eckig strukturiert ist und sich im Zentrum der Partikel befindet. Die Assemblierung der Partikel findet an der Zellmembran statt und knospende Partikel weisen einen noch nicht vollständig geschlossenen Gag-Ring auf. In Typ-B Viren, wie dem  $\beta$ -Retrovirus MMTV, ist das reife, runde Core exzentrisch im Partikel ausgerichtet. Typ D-Viren, wie das „Mason-Pfizer Monkey Virus“ (MPMV), weisen hingegen ein stabförmiges Core auf. Wie auch in den Spumaviren, erfolgt die Virusassemblierung in Typ B- und Typ D-Viren nicht an der Plasmamembran, sondern bereits im Zytoplasma. Anschließend wird das vollständig geschlossene Viruscapsid zur Zellmembran transportiert, wo die Virusknospung erfolgt. Lentiviren nehmen in dieser Klassifizierung eine Sonderstellung ein. Obwohl ihre Virusknospung der von Typ C-Viren ähnelt, weisen die reifen Virionen typische konische Capside auf. Für Spumaviren wurden bisher keine Reifungsprozesse gezeigt [336].

Im Inneren des Capsids befindet sich die genomische Virus-RNA, die mit dem Nucleocapsid (NC) assoziiert ist. Das Matrixprotein (MA) ist über Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran verankert. In diese Virusmembran sind auch die Glykoproteine (Env) eingelagert, die die Rezeptorerkennung und Membranfusion vermitteln. Das *pol*-Gen kodiert für die Reverse Transkriptase, Integrase (Int) und RNaseH, die wichtige Bestandteile des infektiösen Virions sind.

### 1.1.2 Replikationszyklus

Eine schematische Übersicht über den Verlauf der retroviralen Replikation befindet sich in Abbildung 3. Die Infektion durch Retroviren beginnt mit der Anheftung des viralen Hüllproteins (Env) an spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle. Unter Mitwirkung der transmembranen Untereinheit kommt es zur Fusion der Virus-

und der Wirtszellmembran. Das Nukleocapsid gelangt in das Zytoplasma der Zielzelle.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Retroviren:** Nach der Env-vermittelten Rezeptor-spezifischen Anheftung des Virions an die Zielzelle fusioniert die Virusmembran mit der Wirtszellmembran und die virale RNA wird zusammen mit den viralen Enzymen in das Zytoplasma freigesetzt. Die virale RNA wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase in dsDNA umgeschrieben, als prä-Integrationskomplex (PIC) in den Zellkern transportiert und dort durch die Integrase als Provirus in das Wirtsgenom integriert. Erfolgt die Transkription des Provirus, werden die verschiedenen RNA-Spezies in das Zytoplasma transportiert und dort translatiert. Zudem wird ungespleißte, virale genomische RNA im Zytoplasma angereichert. Translatiertes Gag aggregiert zu Viruspartikeln und verpackt dabei die genomische RNA. An der Zellmembran erfolgt die Knospung der Partikel aus der Zelle, wobei die Virionen von der Wirtsmembran mit den integrierten viralen Envs umhüllt werden. Nach der Knospung erfolgt die Virusreifung. RT = reverse Transkriptase. Nisole et al., 2005 [242]

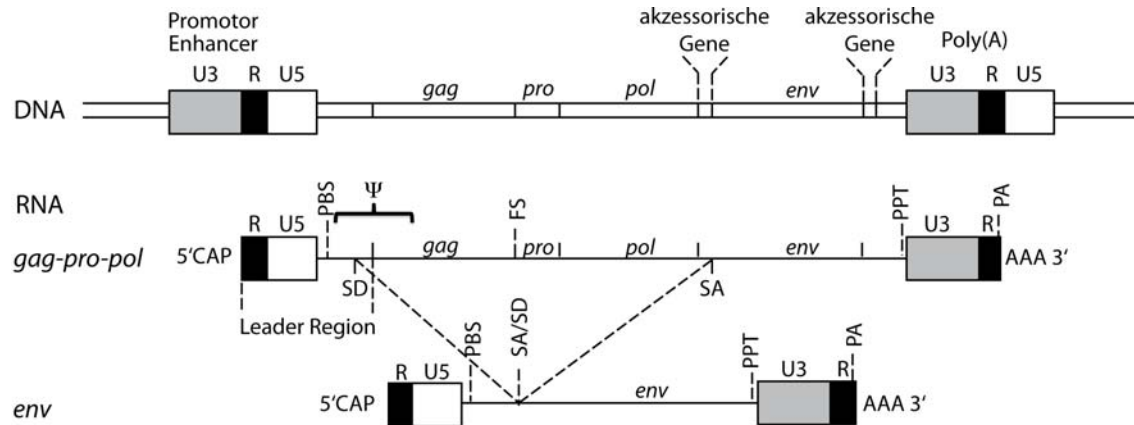
In einem Prozess, der als „Uncoating“ bezeichnet wird, wird die Capsidstruktur aufgelöst, wodurch die virale RNA und die Enzyme, welche zur Initiation der Replikation und Integration notwendig sind, freigesetzt werden. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wird die relativ fragile, virale Einzelstrang-RNA in stabile Doppelstrang-DNA (dsDNA) umgeschrieben. Aufgrund der fehlenden Korrekturfunktion des  $Mg^{2+}$ - oder  $Mn^{2+}$ -abhängigen Enzyms hat die Transkription eine hohe Mutationsrate zur Folge

[264]. Durch die Aktivität der RNaseH wird der virale RNA-Strang des Heteroduplex hydrolytisch abgebaut und anschließend durch einen DNA-Strang ersetzt. Die reverse Transkription ermöglicht es der Integrase, das Virusgenom in die Wirtszell-DNA zu integrieren [34], [83]. Das Provirus wird dann bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben.

Ob das Provirus transkribiert wird oder latent vorliegt, hängt bei vielen Retroviren vom Aktivierungszustand der Zelle ab [298]. Erfolgt eine Transkription, werden je nach Virusstamm zwei bis 30 verschiedene RNA-Spezies durch differenzielles Spleißen gebildet [197]. Die Vollängen-RNA dient entweder als genomische RNA, welche in neue Viruspartikel verpackt wird oder als mRNA zur Translation der Gag- und Pol-Vorläuferproteinen. Das Env-Vorläuferprotein wird aus einer einfach gespleißten viralen mRNA am rauen endoplasmatischen Reticulum (rER) synthetisiert und so während der Synthese in die Membran integriert. Abhängig vom Retrovirusstamm erfolgt die Gag-Aggregation im Zytoplasma oder an der Virusmembran. Als Erbinformation für einen neuen Infektionszyklus wird ungespleißte Vollängen-RNA in das Viruspartikel verpackt. Außerdem interagiert das Gag-Protein mit dem zytoplasmatischen Anteil des Hüllproteins, was zur Knospung der neugebildeten Viruspartikel führt. Die noch unreifen Viruspartikel werden freigesetzt. Durch proteolytische Spaltung des Gag-Vorläufers wird das zentrale Capsid ausgebildet. Dieser Prozess wird als Partikelreifung bezeichnet. Reife Partikel können nun neue Wirtszellen infizieren.

### 1.1.3 Genomischer Aufbau des Provirus

Das virale Genom selbst besteht aus zwei (+)RNA-Einzelsträngen (ss(+)RNA) mit einer Länge von 7 bis 12 Kilobasen (kb). Das integrierte virale Erbgut wird als Provirus bezeichnet. Der typische Aufbau eines Provirus ist in Abbildung 4 dargestellt. Die viralen Gensequenzen werden von den „Long Terminal Repeats“ (LTRs) begrenzt. LTRs sind regulatorische Sequenzen, die an den Genomenden in gleicher Orientierung vorliegen und aus den U3-, R- und U5- Bereichen bestehen. Auch *cis*-aktive Sequenzen, welche die retrovirale Genexpression kontrollieren, sind in der LTR-Region, vor



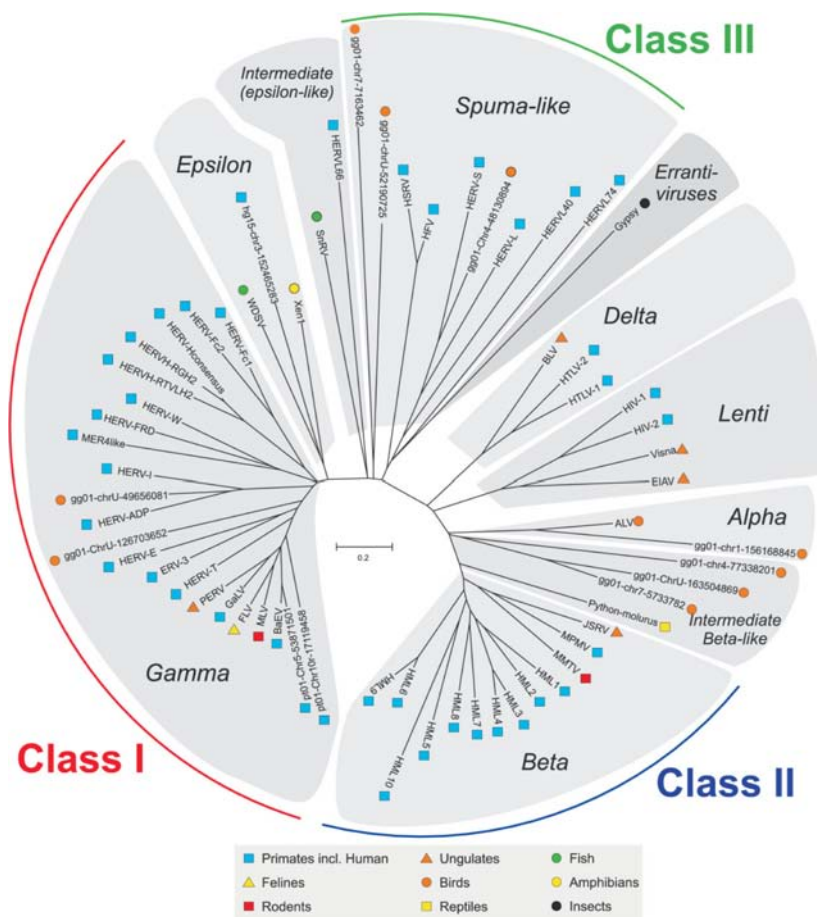
**Abbildung 4: Aufbau eines typischen Provirus:** Die Provirus DNA wird mit den „Long Terminal Repeats“ (LTRs) in das Wirtsgenom integriert. Die LTRs setzen sich aus U3-, R- und U5-Elementen zusammen. Wichtige Sequenzen innerhalb der LTRs, wie Enhancer, Promotor und das Poly(A)-Signal, sind eingezeichnet. Die Leserahmen für *gag*, *pro*, *pol* und *env* befinden sich bei allen Proviren in der selben Reihenfolge. Die möglichen Positionen akzessorischer Gene sind ebenfalls vermerkt. Diese können zudem mit *env*, der U3-Region oder untereinander überlappen. Selten sind sie an anderen Positionen zu finden. Das primäre Transkriptionsprodukt ist in der zweiten Reihe dargestellt. Sequenzen, die für die Replikation eine wichtige Rolle spielen, sind eingezeichnet. Dazu gehören das 5'Cap, die Primerbindestelle (PBS), das  $\Psi$ -Verpackungssignal, die Spleißdonor- (SD) und Spleißakzeptorstellen (SA), sowie der Polypurin-Trakt (PPT), das Polyadenylierungssignal (PA), der Poly(A)-Schwanz (AAA) und Frameshift-Regionen (FS). Die gespleißte mRNA des Env-Proteins ist in der unteren Reihe dargestellt. Retroviren mit akzessorischen Genen besitzen weitere SD und SA und damit zusätzliche, gespleißte mRNAs. Erstellt nach „Retroviruses“, 1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press.

allem im U3-Bereich, enthalten. Hinter dem U5-Bereich der 5'LTR befindet sich die Primerbindestelle (PBS) des Provirus, an der die spezifische, zelluläre tRNA bindet. Hier findet die Initiierung der RT-Reaktion statt, bei der die tRNA als Primer fungiert. Weiterhin liegt im 5'-Bereich die sogenannte  $\Psi$ -Site, die als Verpackungssignal der viralen RNA dient.

Komplexe Retroviren besitzen neben den Hauptstrukturprotein-Genen auch Nichtstrukturprotein-Gene, die für die Replikation essentiell sind beziehungsweise diese verstärken und die Wirtsabwehr außer Kraft setzen können [122]. HIV-1 besitzt beispielsweise die akzessorischen Gene *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpu* und *vpr*. HTLV-1 besitzt zusätzlich die *rex*-, *rof*-, *tax*- und *tof*-Gene und Foamyviren exprimieren das *tas*- und das *bet*-Gen.

## 1.2 Endogene Retroviren

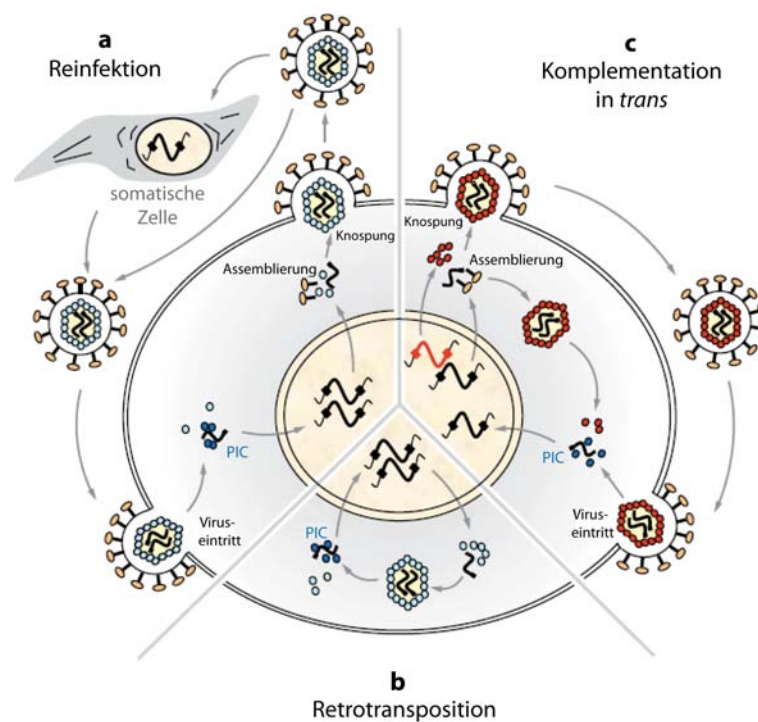
Aufgrund ihres besonderen Merkmals der Reversen Transkription und aufgrund der Expression des einzigartigen Enzyms der viralen Integrase ist es Retroviren möglich, in das Genom von Oozyten beziehungsweise Spermatozyten des Wirtes zu integrieren. Genomanalysen verschiedenster Organismen zeigten, dass Retroviren in der evolutionären Vergangenheit schon sehr oft die Keimbahn ihrer Wirte infiziert haben. Dabei schwankt der Anteil retroviraler Elemente im Genom von Wirbeltieren zwischen 5 und 10 % . Das menschliche Genom besteht zu 8 % aus retroviralen Elementen [293], [179], [319]. Eine Übersicht verschiedener endogener Retroviren (ERV) befindet sich in Abbildung 5.



**Abbildung 5: Dendrogramm verschiedener (endogener) Retroviren:** Für das Dendrogramm wurden *pol*-Sequenzen der sieben retroviralen Genera verwendet:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -, lenti- und spuma-artige Retroviren. Die farbigen Symbole markieren die verschiedenen Wirte. Aus Jern *et al.*, 2005 [153].



Im menschlichen Genom wurden bisher 31 verschiedene Humane Endogene Retrovirus (HERV)-Familien beschrieben, die wahrscheinlich auf 31 unabhängige Keimbahninfektionen durch Retroviren zurückzuführen sind. Dieser initialen Infektion folgen Vermehrungsprozesse wie Reinfektion, Retrotransposition und Komplementation *in trans* durch intakte Helferviren, die es den HERVs ermöglichen, sich über das gesamte humane Genom zu verteilen und gleichzeitig sicherstellen, dass die viralen Proteine weitestgehend intakt bleiben [26]. Eine Übersicht zu diesen Vermehrungsprozessen befindet sich in Abbildung 6.



**Abbildung 6: Amplifizierungsmechanismen von endogenen Retroviren (ERVs):** (a) *Reinfektion:* Grundvoraussetzung ist ein funktionelles Hüllprotein, das den Wiedereintritt des Virus in die Keimbahn des Wirtes vermittelt. Eine kurze Replikationsperiode in somatischen Zellen führt zur weiteren Anpassung und erhöht die Fitness des Retrovirus. (b) *Retrotransposition* stellt einen intrazellulären Amplifikationsmechanismus von Retrotransposons und ERVs dar. Die Mechanismen der ERV-Retrotransposition sind wenig verstanden. Es ist aber wahrscheinlich, dass Übergangsformen von Core-Partikeln gebildet werden, die virale RNA enthalten. (c) Für die *Komplementation in trans* wird ein Helfervirus (rot) benötigt. Dieses Helfervirus stellt Proteine bereit, die vom ERV benötigt werden, um Partikel zu bilden, die sowohl durch Retrotransposition als auch durch Reinfektion proliferieren können. Abbildung aus Bannert und Kurth, 2006 [7].

Da sich im Laufe der Generationen jedoch immer mehr Mutationen anhäufen oder gar ganze Genabschnitte verloren gehen, nimmt die Aktivität der ERVs während der Evolution meist immer weiter ab, bis hin zum vollständigen Aktivitätsverlust. Eine Ausnahme können dabei retrovirale Gene sein, die sich für den Wirtsorganismus als nützlich erwiesen haben. Eines der bestuntersuchteten Beispiele dafür sind die Geneprodukte der *env*-Gene von HERV-W und HERV-FRD: Syncytin-1 und Syncytin-2. Beide humanen Syncytine spielen eine wichtige Rolle in der Plazentaentwicklung. Aufgrund seiner immunsuppressiven Eigenschaften trägt Syncytin-2 möglicherweise auch dazu bei, die Abstoßung des Embryos durch die Mutter zu verhindern [226], [120], [24]. Anhand von phylogenetischen Stammbäumen kann das Alter der einzelnen ERV-Familien abgeschätzt werden. Neben Stammbaumanalysen wird das Alter eines Provirus auch über den Sequenzvergleich der LTRs bestimmt. Bei der genomischen Integration des Retrovirus in das humane Genom sind beide LTRs absolut identisch. Pro Jahr können Mutationen mit einer Häufigkeit von  $2,3 \times 10^{-9}$  bis  $5 \times 10^{-9}$  im HERV Element auftreten. Statistisch gesehen kommt es daher alle 200.000 bis 450.000 Jahre zu einem Basenaustausch in einer LTR [155]. Je stärker sich beide LTRs voneinander unterscheiden, umso länger liegt der Integrationszeitpunkt zurück. Der Integrationszeitpunkt der Humanen Endogenen Retroviren variiert dabei sehr stark. Einige Retroviren integrierten bereits vor weit über 35 Millionen Jahren, andere Elemente hingegen erst vor 200.000 Jahren.

Es gibt auch Retroviren, die sowohl als exogene als auch endogene Retroviren vorliegen. Eines der prominentesten Beispiele dafür ist das Koala Retrovirus (KoRV). KoRV liegt als replikationskompetentes, Vollängen-Provirus im Genom vieler Koalabären vor. Sequenzvergleiche des KoRV-Provirus mit anderen Retroviren zeigten eine große Ähnlichkeit zum exogenen Gibbonleukämievirus (GALV). Dies lässt einen erst kürzlich vollzogenen „Artensprung“ des Virus vermuten [132], [102]. Zudem ist die Prävalenz des Provirus selbst in Australien stark unterschiedlich. Während in Nordaustralien alle untersuchten Tiere endogenes KoRV aufwiesen, konnten in Südaustralien Tiere ohne KoRV Provirus auffindig gemacht werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine noch nicht abgeschlossene KoRV-Endogenisierung hin [304].

### 1.2.1 Die HERV-K(HML-2) Familie und HERV-K113

Die Namensgebung der HERVs erfolgte sehr heterogen. Oft erhielten HERVs ihren Namen aufgrund nahe gelegener Gene. Auch Cosmid- oder Klonnummern können Ursprung des Namens sein. Die meisten Mitglieder sind jedoch nach ihrer spezifischen, zellulären tRNA benannt, die als Primer für die RT dient. Hierbei wird der Name nach dem Einbuchstabencode der Aminosäuren vergeben. Die Primerbindestelle der HERV-K Familie wird beispielsweise durch eine Lysin-tragende tRNA erkannt (Lysin=K). Die HERV-K Familie gehört zu den  $\beta$ -Retroviren. Aufgrund der Ähnlichkeit zu MMTV wurde HERV-K 1982 erstmals im menschlichen Genom entdeckt [50]. Außer HERV-K(C4) und HERV-K(14C) werden deshalb die Mitglieder dieser Familie als „human MMTV-like“ (HML-1 bis 9) bezeichnet.

Vor allem die Mitglieder der HERV-K(HML-2) Familie besitzen besondere Eigenschaften unter den ERVs, die sie für die Forschung sehr interessant machen. Als Ono *et al.* als erstes das HERV-K10 Genom sequenzierten, fanden sie dieses erstaunlich gut erhalten vor [244], [245]. HERV-K(HML-2) integrierte vor 35 Millionen Jahren zum ersten Mal in das Genom der Vorfahren von Altweltaffen. Wiederholte Replikationsereignisse führten dazu, dass sich mehr als 60 provirale Kopien und über 2500 Einzel-LTRs im Genom manifestieren konnten [7], [202]. Diese Amplifizierung ist in erster Linie die Folge von Reinfektionen der Keimbahn durch replikationskompetente HERV-Ks. Seit der Trennung der humanen Linie von der Schimpansen-Linie vor sechs Millionen Jahren blieb die Insertionsrate von Neuintegraten konstant. Dies führte zu über 70 humanspezifischen Insertionen, von denen 15 bis 20 hochkonservierte Vollängen-Proviren darstellen [14], [15]. Bisher konnte jedoch noch kein replikationskompetentes, infektiöses HERV-K gefunden werden. Verschiedene Gruppe konnten aber kürzlich mit Hilfe von human-spezifischen Consensus-HERV-K(HML2)-Elementen zeigen, dass diese „single cycle“-Infektiosität besitzen. Die Consensus-Elemente sind in der Lage, Zellen zu infizieren und in das Genom zu integrieren. Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass diese Elemente replizieren und neue infektiöse, replikationskompetente Viruspartikel bilden können [85], [186].

HERV-K(HML-2) Mitglieder können anhand von Merkmalen ihrer kodierenden Regionen und LTRs, sowie Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz in zwei Gruppen unterteilt werden. Typ-I Proviren weisen eine Deletion von 292 Basenpaaren (bp) im *env*-Bereich auf, die die für das Rec-Protein notwendige Spleißstelle entfernt. Diese Proviren sind nicht mehr in der Lage, Env oder Rec zu bilden. Stattdessen wird eine alternative Spleißstelle verwendet, was zur Bildung des Np9-Proteins führt. Bei den Typ-II Viren ist der Bereich des *pol-env*-Übergangs vollständig, so dass sowohl Env als auch das Rec-Protein exprimiert werden können. Bisher wurden 10 verschiedene HERV-K(HML-2) Typ-I und 11 verschiedene Typ-II Proviren genauer charakterisiert [9], [66], [299], [313].

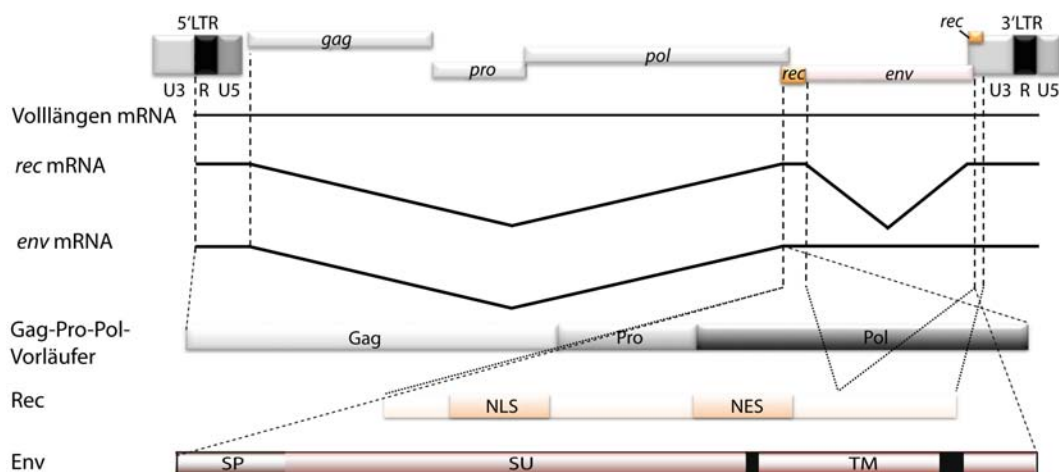
Das HERV-K113 Provirus, welches zu den Typ-II Proviren zählt, ist das bisher einzige bekannte Mitglied der HERV-K(HML-2)-Familie, das für alle viralen Proteine vollständige, offene Leserahmen besitzt. Turner *et al.* konnten es erstmals mit Hilfe einer HERV-K-Polymerase-Gensonde in einer humanen RP11-BAC-Bibliothek nachweisen [313]. Das Provirus integriert auf dem Chromosom 19p13.11, tritt jedoch mit einem allelen Polymorphismus auf, das heißt nur ein gewisser Prozentsatz der Population ist Träger des Provirus. Eine besonders hohe Verbreitung kann man mit bis zu 30 % in der afrikanischen Bevölkerung finden, wohingegen in Asien und Europa die Prävalenz bei circa 15 % liegt [234], [12]. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Ursprung des Virus auf dem afrikanischen Kontinent liegt.

Sequenzvergleiche der beiden LTRs ließen zunächst vermuten, dass die Integration im Chromosom 19 vor 150.000 bis 200.000 Jahren stattfand [313]. Neuere Analysen ergaben jedoch, dass Rekombinationsereignisse zwischen den beiden LTRs stattgefunden haben müssen und somit das eigentliche Alter verfälscht wurde [12]. Das tatsächliche Alter wird nun auf zwei Millionen Jahre geschätzt. Trotz dieser Korrektur bleibt das HERV-K113 eines der jüngsten und am besten erhaltenen Proviren der HERV-K-Gruppe. Es ist nicht auszuschließen, dass innerhalb der Weltbevölkerung noch replikationskompetente Proviren existieren [84].

### 1.2.2 Proviralear Aufbau von HERV-K113

Obwohl HERV-K113 ein endogenes Retrovirus ist, besitzt es noch den charakteristischen proviralear Aufbau exogener Retroviren. Das integrierte HERV-K113 Provirusgenom besitzt eine Länge von circa 8,9 kb und wird von den beiden LTRs flankiert. Obwohl die 5'LTR und die 3'LTR aufgrund von Mutationen nicht mehr völlig identisch sind, ist die 5'LTR als proviralear Promotor noch deutlich aktiv [13].

In Abbildung 7 ist der proviralear Aufbau von HERV-K113 dargestellt. Wie alle exogenen und konservierten endogenen Retroviren besitzt auch HERV-K113 den typischen genetischen Aufbau 5'-*gag* - *pro* - *pol* - *env* - 3' [6], [199]. *Gag* kodiert für das Matrix-, Capsid- und Nukleocapsidprotein und ist somit das Hauptstrukturprotein. *Pro* trägt



**Abbildung 7: Proviralear Aufbau von HERV-K113:** HERV-K113 besitzt offene Leserahmen für *gag*, *pro*, *pol* und *env*. Zusätzlich befindet sich ein weiterer Leserahmen für das Rec-Protein in der proviralear Sequenz. Das Provirus wird durch die 5'LTR und die 3'LTR begrenzt. Unterhalb der proviralear Sequenz sind die drei gebildeten mRNA-Spezies dargestellt. Die gestrichelten Linien verdeutlichen die Spleißstellen. In der unteren Hälfte der Abbildung sind die drei Hauptprotein-Spezies dargestellt. Sowohl das Env- als auch das Gag-Pro-Pol-Vorläuferprotein werden weiter prozessiert.

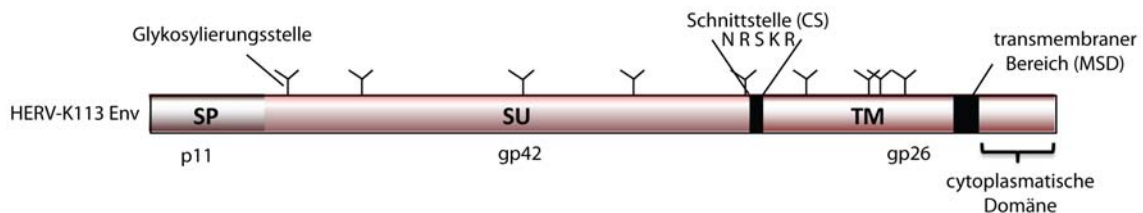
die genetische Information für die Protease, die eine Spaltung der Vorläuferproteine katalysiert, deren Leserahmen den des Gag-Vorläuferproteins am 3'-Ende überlappen. *Pol* kodiert für die Reverse Transkriptase, RNaseH und Integrase. Am 3'-Ende des für *pol*-kodierenden Bereichs befindet sich der Leserahmen des Glykoproteins (*env*), der die genetische Information für das Hüllprotein enthält.

Im Gegensatz zu den meisten anderen endogenisierten Retroviren, besitzt die HERV-K-Familie weitere akzessorische Proteine. HERV-K113 exprimiert ein akzessorisches Protein: das Rec-Protein. Rec ist dem HIV-1 Rev-Protein und dem HTLV Rex-Protein funktionell sehr ähnlich und vermittelt den viralen RNA-Transport vom Zellkern in das Zytoplasma [200], [206], [205]. Zusätzlich tritt eine dritte 1,5 kb große Spleißvariante auf, die als *hel*-Transkript bezeichnet wird, deren Funktion jedoch noch nicht geklärt wurde.

### 1.2.3 Die Rolle des Hüllproteins Env während der HERV-K Replikation

Mit Hilfe von Sequenzvergleichen konnten 18 vollständige *env*-Gene innerhalb der Familie der humanen endogenen Retroviren identifiziert werden [45], [253]. Davon gehören allein sechs *env*-Gene zur HERV-K(HML-2) Familie. Sie sind sehr gut erhalten und weisen eine Aminosäureidentität von 97 % auf, was darauf hinweist, dass diese Viren erst „kürzlich“ in das humane Genom integriert sind [84].

Das HERV-K113 *env*-Gen, das für ein Env-Vorläuferprotein kodiert, befindet sich am 3'-Ende des viralen Genoms. In Abbildung 8 ist der schematische Aufbau des



**Abbildung 8: Schematischer Aufbau des HERV-K113 Hüllproteins:** Das 80 kDa-Protein setzt sich aus einem Signalpeptid (SP), einem Oberflächenglykoprotein (SU) und einer transmembranen Untereinheit (TM) zusammen. Die putativen Glykosylierungsstellen, die Schnittstelle für zelluläre Furinproteasen (CS) und der transmembrane Bereich (MSD) sind eingezeichnet.

HERV-K113 Env-Proteins dargestellt. Das unprozessierte Hüllprotein besitzt ein Molekulargewicht von circa 80 kDa und setzt sich aus dem Oberflächenglykoprotein (SU) mit einem theoretischen Molekulargewicht von 44 kDa, der transmembranen Untereinheit (TM) mit einem Molekulargewicht von 26 kDa und einem 10 kDa großen Signalpeptid zusammen. Hüllproteine wie das von HERV-K113, deren subzelluläre Destination die umgebende Plasmamembran der Wirtszelle ist, werden am rauen endoplasmatischen

Reticulum gebildet und gelangen über den Golgiapparat an die Zelloberfläche [322], [256], [190]. Für die richtige Lokalisation ist die aminoterminalen Signalsequenz verantwortlich. Bezüglich des Signalpeptids nimmt das HERV-K113 Env eine Sonderstellung unter den Retroviren ein, da es mit 279 Aminosäuren ungewöhnlich lang ist. Noch während das Protein am ER gebildet und durch die Membran gefädelt wird, wird kotranslational das Signalpeptid entfernt und es finden erste Modifikationen des Envs mit N-verknüpften Oligosacchariden statt [275], [170]. Die Verankerung des transmembranen Hüllproteins in der Zellmembran findet bereits während der Synthese am rauhen ER statt. Die transmembrane Untereinheit besitzt dafür eine Region bestehend aus mehreren hydrophoben Aminosäuren, den sogenannten transmembranen Bereich (MSD). Am zytoplasmatischen C-Terminus befindet sich eine kurze Aminosäuresequenz, die bei einigen  $\gamma$ -Retroviren als R-Peptid bezeichnet wird [124], [138], [150]. Dieser Abschnitt des Hüllproteins scheint beim Einbau in die Viruspartikel eine wichtige Rolle zu spielen. Retrovirale R-Peptide von D-Typ- und C-Typ-Viren besitzen beispielsweise Fusions-inhibierende Eigenschaften [341], [342]. Die Spaltung des R-Peptids durch die retrovirale Protease ermöglicht es dem Hüllprotein, in einen fusogenen Zustand zu gelangen [41], [267], [269]. Verschiedene Gruppen haben zudem berichtet, dass durch eine Trunkierung des C-Terminus die Fusogenität und der Einbau des Hüllproteins in Viruspartikel gesteigert werden kann. Für die Hüllproteine des „Porcine Endogenous Retrovirus“ (PERV) und des „Jaksiekte Sheep Retrovirus“ (JSRV) wurde beispielsweise gezeigt, dass das Abspalten eines kurzen Fragments am C-Terminus die Membranfusion begünstigt [25], [74]. Auch der Einbau in die Zellmembran konnte durch C-terminale Deletionen der zytoplasmatischen Domäne verbessert werden [225], [291], [290]. Beim HERV-W Env hingegen führt eine Trunkierung des C-Terminus zu einem Verlust in der Fusogenität [58].

Noch während des Transports zur Membran wird das Vorläuferprotein durch eine zelluläre Furin-Protease proteolytisch in seine beiden Untereinheiten gespalten. Diese erkennt eine fünf Aminosäuren umfassende Sequenz mit dem Motiv R-X-K/R-R, die als „cleavage site“ (CS) bezeichnet wird und spaltet nach dem letzten Arginin (R) [86], [254], [221]. Beide Untereinheiten bleiben anschließend nicht-kovalent miteinander ver-

bunden.

Außerdem erfährt das Hüllprotein während seiner Reise durch das ER/Golgi-Netzwerk weitere Modifikationen, wie die Verknüpfung oder Eliminierung von Kohlenhydraten und die Ausbildung von Disulfidbrücken [109], [170]. Für die Funktionalität des Hüllproteins sind Verzuckerungen essentiell. Die kovalente Bindung zwischen der Zuckergruppe und dem Protein erfolgt an einer Asparaginseitenkette mit der entsprechenden Aminosäuresequenz N-X-S/T, wobei es sich bei dem X um eine beliebige Aminosäure handelt, mit Ausnahme von Prolin.

Über das *trans*-Golgi-Netzwerk gelangt das Hüllprotein an die Orte der Zellmembran, wo es zur Viruspartikelbildung kommt. Dafür interagiert das Virus-Capsid mit der Wirtsmembran und den darin eingelagerten viralen Hüllproteinen. Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass das Hüllprotein entscheidenden Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Gag-Proteins und der viralen RNAs hat. Die Env-Expression verändert beispielsweise die Verteilung der HIV-1 RNA in HeLa-Zellen drastisch [63]. Auch das Gag-Protein muss gerichtet zum Ort der Virus-Knospung (Budding) transportiert werden. Env wird benötigt, um Gag aus den späten endosomalen/lysosomalen Kompartimenten zu den endosomalen Membranen der RNA-haltigen Vesikel zu leiten [63]. Auch für einige andere Retroviren wurde der Einfluss der endosomalen Kompartimente und der Env-Expression auf den RNA-Vesikeltransport nachgewiesen. Sowohl für das „Murine Leukämie Virus“ (MLV), einem C-Typ-Virus, welches an der Membran assembliert als auch für „Mason-Pfizer Monkey Virus“, das intrazellulär an den Centriolen assembliert, wurde gezeigt, dass die endosomalen Kompartimente und die Env-Expression essentiell für den intrazellulären RNA-Transport sind [289].

Frühe elektronenmikroskopische Untersuchungen des Hüllproteins von HIV-1 lieferten Hinweise darauf, dass sich mehrere Hüllprotein-Monomere zu Oligomeren zusammenschlagern [115], [246], [116]. Die Bildung von Oligomeren, vor allem Trimeren aus prozessierten Env-Untereinheiten, wurde an zahlreichen Virionen gezeigt. Die Hüllprotein-Monomere von HIV-1 sind untereinander durch eine schwache, nicht-kovalente Interaktion miteinander verbunden [339], [260], [93]. Alle drei Env-Monomere müssen vollständig prozessiert sein, um die Verschmelzung der Membranen und den Eintritt des



Virus in die Wirtszelle zu vermitteln [331].

Die infektiösen Viruspartikel werden anschließend durch Knospung freigesetzt. Die SU-Untereinheit des viralen Hüllproteins ist ausschließlich außerhalb des Partikels lokalisiert und leitet die Adsorption bei einer späteren Infektion ein. Es erkennt spezifische Rezeptormoleküle auf der Plasmamembran der Wirtszelle und ermöglicht es dem Virus, sich an diese anzuheften. Die TM-Untereinheit, die die Fusion der Virusmembran mit der Wirtszellmembran vermittelt, besteht aus einer extrapartikulären, transmembranen und intrapartikulären Domäne. Am Beispiel des Env-Proteins des „Moloney Murine Leukemia Virus“ (MoMLV) wurde gezeigt, dass der transmembrane Bereich ebenfalls an der Fusion beteiligt ist [305]. Es wird davon ausgegangen, dass nach der Rezeptorerkennung die Verknüpfung zwischen der SU- und TM-Untereinheit aufgelöst wird, wodurch die TM-Untereinheit freigelegt wird und die Membranfusion und der Viruseintritt begünstigt werden [279]. Der genaue Prozess ist jedoch bislang nur sehr wenig verstanden.

Bei der Infektion scheinen auch eine Vielzahl von Wirtsfaktoren eine Rolle zu spielen. Eine beispielhafte Auflistung einiger beteiligter Wirtsproteine findet sich in Tabelle 1. 2007 publizierten Münch *et al.*, dass durch die Prostata amyloide Fibrillen in die Samenflüssigkeit gegeben werden, die eine Infektion durch HIV-1 begünstigen und um ein Vielfaches verstärken. Dabei aggregieren natürlich vorkommende Fragmente der „Prostata sauren Phosphatase“ (PAP) zu kurzen, amyloiden Fibrillen [237]. Aufgrund der positiven Ladung dieser Fibrillen, die auch als „Semen-derived Enhancer of Virus Infection“ (SEVI) bezeichnet werden, wird die Anlagerung und die Fusion der Virionen mit der Zielzelle begünstigt [273]. SEVI fungiert dabei als polykationische Brücke, die eine Abstoßung der HIV-1-Partikel durch die negativ geladene Zelloberfläche verhindert.

Für das HERV-K113 Env konnte bis dato keinerlei Funktionalität gezeigt werden [84]. Die Ursachen dafür sind noch unbekannt. Es gibt aber verschiedene Hinweise, dass posttranslationale Modifikationen eine Rolle spielen könnten. So kann das HERV-K(HML-2) Env zwar als glykosyliertes Protein in Säuger- und Insektenzellen exprimiert werden, es wird jedoch nicht nach der Abspaltung des Signalpeptids in TM und SU-Untereinheit

Wirtsprotein	Funktion	betroffene Virusstämme
AOBEC3-Familie (A3)	Die Mitglieder der A3-Familie besitzen Deaminaseaktivität. Für A3G und A3F konnten antivirale Aktivitäten gezeigt werden. A3 deaminiert in Nukleinsäuren dC zu dU, was anschließend zur sogenannten G→A-Hypermethylierung führt, wodurch die virale genomische Information stark beschädigt werden kann. A3G wird in Viruspartikel verpackt. Das HIV-1 Vif-Protein inhibiert die A3-Funktion. Neben der niedrigmolekulare LMM-Form gibt es die enzymatisch inaktive hochmolekulare (HMM)-Form, die für die Restriktion von endogenen Retroelemente eine wichtige Rolle spielt.	HIV-1 [119], LINE-1 [194], Alu [61], MMTV [274], HERVs und HERV-K [186], [97], HTLV-1 [281], F-MLV [302], Foamyviren auch in anderen Viren, wie dem Humanen Papillomavirus [317] und Hepadnaviren (HBV) [277]
„tripartite motif protein 5 alpha“ (TRIM5α)	Das Protein besteht aus einem RING-Finger, einer B-box und einer coiled-coil Domäne. Als Multimer inhibiert es die HIV-1-Aktivität während der reversen Transkription und des nukleären Imports [189]. Dies erfolgt wahrscheinlich durch vorzeitiges „Uncoating“ und Proteasomen-Targeting.	HIV-1
Tetherin (auch „bone marrow stromal cell antigen 2“, BST-2)	BST-2 ist ein 30-36 kDa großes TypII-Transmembrananglykoprotein mit N-terminaler Transmembrandomäne und C-terminalem GPI-Anker [152]. Über diese beiden Domänen bindet BST-2 die Virionen an die Membran der Virusproduzierenden Zelle [147] und vermindert so die Partikelfreisetzung. BST-2 Expression ist Zelltyp-abhängig und wird durch Interferone reguliert [239], [238]. Sein Gegenspieler ist das HIV Vpu-Protein. Vpu bindet BST-2 und bewirkt dessen Internalisierung und Abbau in den Endosomen.	HIV-1 [239]; HTLV-1 [248]; PERV [220]; auch in Ebola [157]
CyclophilinA	Das kleine globuläre Protein bindet an Prolin-reiche Sequenzen. Als zellulärer Faktor bindet es das Capsidprotein von Lentiviren im Zytoplasma und markiert diese, so dass andere Restriktionsfaktoren wie TRIM diesen Komplex erkennen und mit der Reversen Transkription und Integration interferieren können.	HIV-1 [107]; SIV [241]; FIV [282]
Fv1	Fv1 ist ein murines Protein, das eine große Ähnlichkeit zum Gag Ca-Protein besitzt. Auch in nicht-murinen Zellen gibt es ähnliche Faktoren [19]. Nach dem Viruseintritt interferiert Fv1 mit dem viralen Gag. Durch diese Interaktion wird der prä-Integrationskomplex (PIC) im zytoplasmatischen Kompartiment zurückgehalten und kann nicht in den Zellkern wandern. Außerdem wird die Reverse Transkription gestört.	MuLV [240]
PACSI	PACSI kontrolliert die Membranzusammensetzung. Interagiert das HIV-1 Nef-Protein mit PACS1, werden die membranständigen MHC I-Moleküle herunterreguliert, was verhindert, dass die zelluläre Immunantwort effektiv HIV-1 infizierte Zellen eliminiert.	HIV-1 [21], [257]
SEVI	SEVI besteht aus polykationischen Fibrillen, die sich aus kurzen Peptiden der „prostatic acid phosphatase“ (PAP) zusammensetzen und von der Prostata in die Samenflüssigkeit abgegeben werden. Die Fibrillen vermindern die elektrostatische Abstoßung der Viruspartikel von der zellulären Membran und verstärken so die Infektion [237].	HIV-1 [237], HIV-2 [237], XMRV [144], Foamyvirus

**Tabelle 1: Wirtsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle in der Virusreplikation:** Exemplarische Auflistung verschiedener regulatorischer Wirtsfaktoren und ihrer Rolle im retroviralen Replikationszyklus.

prozessiert oder an die Zelloberfläche transportiert [314]. Wahrscheinlich ist die fehlende Prozessierung und Spaltung des Envs eine Ursache dafür, dass bislang keine infektiösen HERV-K(HML-2) Partikel im Menschen nachgewiesen werden konnten.

#### 1.2.4 Der virale RNA-Transport

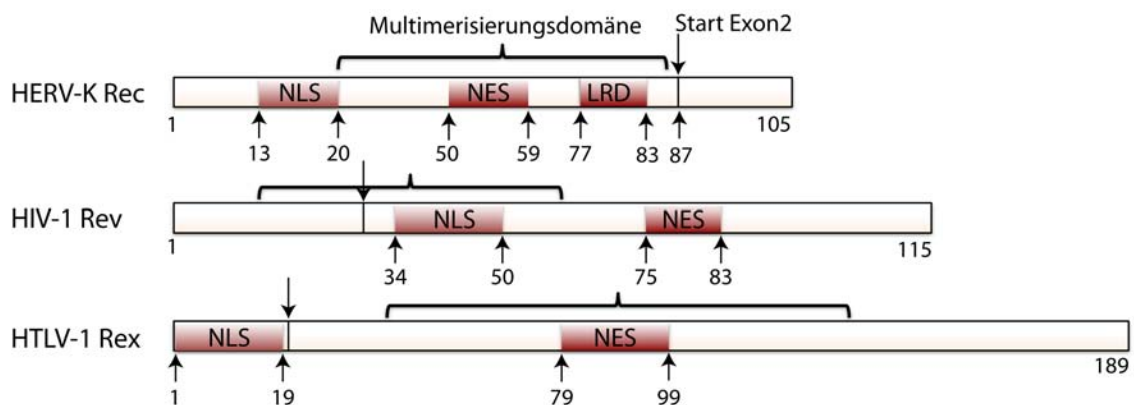
Retroviren haben verschiedene Strategien entwickelt, um das Ausmaß der viralen RNA-Prozessierung zu regulieren und damit ein ausgewogenes Verhältnis von ungespleißter und gespleißter RNA zu erhalten. Dazu gehören suboptimale 3'-Spleißstellen, „splicing enhancer“ (ESE) und „splicing silencer“ (ESS). Für das virale Spleißen wird die zelluläre Spleiß-Maschinerie verwendet. Die Nutzung zellulärer Proteine, wie SR-Proteine oder hnRNPs, für die Regulation des Spleißprozesses legt nahe, dass das Ausmaß der RNA-Prozessierung und damit auch das Ausmaß der Virusreplikation durch Wirtsfaktoren mitbestimmt wird. Die Spleißfaktoren können jedoch von Spezies zu Spezies verschieden sein, wodurch unter anderem dem Virus die Wirtsspezifität vorgegeben wird [350], [185].

Die Unterdrückung des Spleißprozesses allein reicht aber nicht aus, um ausreichende Mengen an ungespleißter viraler RNA im Zytoplasma zu erhalten. Es mussten zusätzlich Mechanismen entwickelt werden, die einen effizienten nukleären Export der viralen Transkripte gewährleisten. Einfach strukturierte Retroviren, wie das MPMV, die nur zwei mRNA-Spezies (Vollängen- und *env*-RNA) bilden, besitzen dafür auf der viralen mRNA *cis*-aktive, stark gefaltete Strukturen, die so genannten „Constitutive Transport Elements“ (CTEs) [36], [96]. Unabhängig vom Spleißprozess bindet der zelluläre Exportrezeptor TAP an diese Strukturen und sorgt dann für einen effizienten Transport der viralen Transkripte ins Zytoplasma [288].

Ein CTE-Element genügt komplexen Retroviren jedoch nicht, um die verschiedenen viralen RNA-Spezies effektiv aus den Zellkern zu transportieren. Stattdessen besitzen sie häufig akzessorische Proteine, die den RNA-Transport durchführen. Bei HIV-1 ist dies das Rev-, bei HTLV das Rex- und bei HERV-K das Rec-Protein. Eine Übersicht dieser drei verschiedenen RNA-Transportmoleküle findet sich in Abbildung 9.

**1.2.4.1 Das HIV-1 Rev-Protein** Rev (Regulator of expression of virion proteins) ist schon lange dafür bekannt, den nukleozytoplasmatischen Transport von ungespleißter und nicht vollständig gespleißter RNA zu stimulieren [71], [145], [261]. Die zweifach gespleißte *rev*-mRNA wird über den zellulären TAP vermittelten mRNA Exportweg in das Zytoplasma transportiert. Nach der Translation bindet Rev über sein nukleäres Importsignal (NLS), einer argininreichen Domäne, direkt an den Kern-Importrezeptor Importin- $\beta$  [251], [297], [76], [123], [146], [296], [346], [347], [16], [46], [173], [208], [255]. Dies stellt insofern eine Besonderheit dar, als dass die meisten Proteine mit einer basischen NLS über Adaptorproteine mit Importin- $\beta$  interagieren müssen. Der dimere Rev/Importin- $\beta$ -Komplex interagiert mit Proteinen der Nukleopore und gelangt so in den Kern. Hier bindet Importin- $\beta$  an RanGTP und der Rev/Importin  $\beta$ -Komplex zerfällt.

Rev bindet zunächst als Monomer an einem spezifischen Bereich der viralen RNA, das sogenannte Rev responsive Element (RRE). Dafür besitzt die NLS eine  $\alpha$ -Helix, die



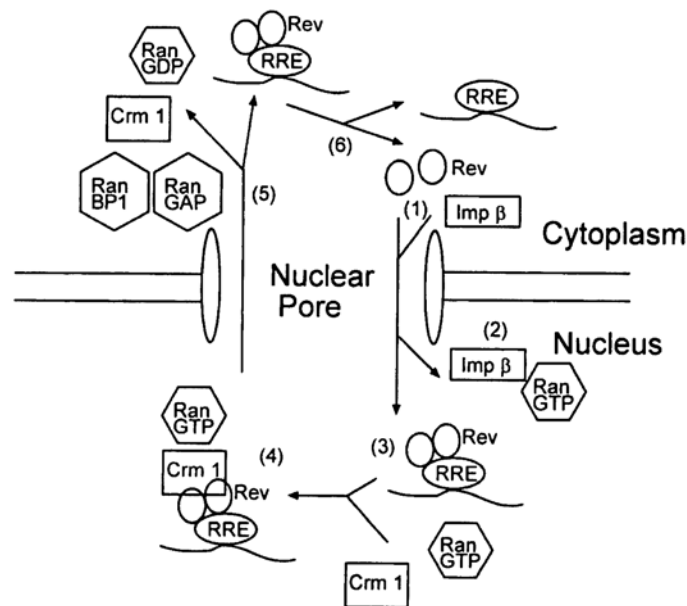
**Abbildung 9: Rec, Rev und Rex sind RNA-Transportproteine:** Alle drei Proteine entstehen aus zweifach gespleißter RNA. Der Übergang von Exon 1 zu Exon 2 ist durch einen Pfeil markiert. Typisch für die Transportfaktoren ist die Arginin-reiche Kernlokalisationssequenz (NLS) und die Leucin-reiche Kernexportsequenz (NES). Das Rec-Protein besitzt zudem eine weitere Leucin-reiche Domäne (LRD). Zusätzlich verfügen die drei Proteine über eine Multimerisierungsdomäne. Alle Regionen sind mit den entsprechenden Aminosäurepositionen angegeben.

in die große Furche der Rev-Bindestelle innerhalb des RRE bindet. Das RRE ist ein 351 Nukleotide umfassender Bereich von ausgeprägter Sekundärstruktur, der innerhalb der *env*-Sequenz lokalisiert ist. Nachdem Rev an diesen Bereich gebunden hat, bildet

das Protein Multimere aus [216], [349]. Für die Multimerisierung des Revs sind wahrscheinlich die flankierenden N- und C-terminalen Regionen der NLS verantwortlich [29], [204], [243], [348]. Die carboxyterminale Region, die ursprünglich als Aktivierungsdomäne bezeichnet wurde, enthält das Kernexportsignal (NES) [210], [318], [329], [105], [332]. Die NES ist eine Leucin-reiche Domäne, die an den Exportrezeptor Crm1/Exportin-1 bindet [210], [250], [329]. Crm1/Exportin-1 muss jedoch von RanGTP aktiviert worden sein. Der ternäre RNA-Protein Komplex, bestehend aus dem viralen RRE-Transkript, mehreren Rev-Molekülen, Crm1 und RanGTP, interagiert mit den Nucleoporinen und der gesamte Komplex wird durch die Kernpore bewegt. Im Zytoplasma vermittelt das Ran-GTPase aktivierende Protein (Ran-GAP) zusammen mit dem Ran-Bindeprotein 1 (RanBP1) die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP und der Komplex zerfällt in seine Bestandteile. Rev kann nun erneut in den Kern transportiert werden. In Lokalisationsstudien zeigt Rev eine überwiegend nukleoläre Lokalisation. Trotz einer „steady-state“ Akkumulation in den Nukleoli bewirken die NES und die NLS, dass Rev sich ständig zwischen Kern und Zytoplasma bewegt. Eine Übersicht zum Rev-vermittelten Transport zeigt die Abbildung 10.

Es häufen sich zunehmend Berichte, dass das HIV-1 Rev auch nach dem nukleozytoplasmatischen RNA-Transport entscheidende regulatorische Aufgaben besitzt. Der Transport der RNAs durch Rev und andere RNA-Transportproteine könnte, beispielsweise durch den Aufbau von speziellen Transportgranulas, diese RNAs so markieren, dass sie bestimmte Ziele im Zytoplasma erreichen [33], [219], [301]. So hat Rev-unabhängig translatiertes Gag gegenüber Rev-abhängig translatiertem Gag grundsätzlich andere Lokalisierungen innerhalb der Zelle [300]. Ebenso können *gag-pol*-RNAs, die nicht Rev-abhängig den Zellkern verlassen, nicht mit Polysomen assoziieren und werden daher nicht effizient translatiert [4], [75], [154]. Rev scheint im Zytoplasma am RRE zu verbleiben und die Translation der RNAs zu erhöhen [5], [184]. Die Art des RNA-Exports legt demzufolge das Schicksal der RNAs fest [68], [154].

Rev wird außerdem mit der Verpackung der genomischen RNA von HIV-1 in Verbindung gebracht. Trotz des Übermaßes an genomischer RNA gegenüber der viralen RNA im Zytoplasma der infizierten Zellen wird die virale genomische RNA aus diesem



**Abbildung 10: Modell des Rev-vermittelten, nukleozytoplasmatischen RNA-Transports:**

(1) Nach der Synthese bindet Rev an Importin- $\beta$ , welches daraufhin mit den Kernporen interagiert und somit zum nukleären Import des Rev-Importin- $\beta$ -Komplexes führt. (2) Im Nucleus bindet Importin- $\beta$  an Ran-GTP. Rev wird freigesetzt. (3) Rev bindet und multimerisiert am RRE der frisch gebildeten, ungespleißten bzw. einfach-gespleißten RNA. (4) Crm1 und RanGTP werden durch den Rev-RRE-Komplex rekrutiert und der gesamte Komplex wird aus dem Zellkern exportiert. (5) Im Zytoplasma induzieren das Ran-GTPase aktivierende Protein (RanGAP) und das Ran-Bindeprotein (RanBP1) die Hydrolyse des Ran-GTPs, wodurch Crm1 den Komplex verlässt. (6) Freigesetztes, monomeres Rev kann nun wieder in den Kern einwandern. Abbildung von Wang *et al.*, 2000 [323].

riesigen Pool selektiert. Während des Buddings interagiert die Nukleocapsid-Domäne des Gags mit dem Verpackungssignal in der 5'UTR des RNA Genoms [17], [88], [188]. Der Stemloop 3 innerhalb des Verpackungssignals wird dabei als Hauptregion angesehen [62], [135]. Das Verpackungssignal allein reicht jedoch nicht für die Verpackung aus und andere Strukturen müssen noch eine Rolle spielen [18], [188]. 2007 publizierten Brandt *et al.*, dass die Rev-RRE Interaktion wichtig bei der Selektion der Vollängen-RNA während der Capsidbildung ist [35]. Wird Rev oder das RRE in einem proviralen Vektor eliminiert, dann hat dies nur geringe Effekte auf zytoplasmatische Vektor-RNA-Level (Reduzierung um Faktor 2). Auf Vektor-Titer-Ebene sind die Effekte mit Faktor 33 jedoch dramatisch [35], [195]. Interessanterweise scheint die Bindung des Revs an

das RRE bereits im Kern erfolgen zu müssen. Ein Rev, dessen NLS ausgeschaltet wurde und daher nicht mehr in den Zellkern einwandern kann, unterstützt nicht mehr die Verpackung der genomischen RNA [126]. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass nukleäre Ereignisse bei der Verpackung eine Rolle spielen [301].

**1.2.4.2 HERV-K Rec/RcRE** Sequenzanalysen zeigten, dass auch HERV-K Proviren neben den Transkripten *gag*, *pro*, *pol* und *env* weitere Transkripte kodieren, die durch alternatives Spleißen entstehen. HERV-K Viren des Typs II besitzen innerhalb der *env*-Gensequenz einen offenen Leserahmen, der für Rec („regulator of expression encoded by *corf*“) kodiert [200]. Durch das Vorhandensein von mehrfach gespleißten viralen Transkripten und der Existenz des regulatorischen Proteins Rec ist HERV-K den komplexen Retroviren zuzuordnen.

1995 konnten Löwer *et al.* erstmals das cORF-Protein, heute Rec genannt, in keimzell-tumorabgeleiteten Zellen nachweisen [200]. Rec besteht aus 105 Aminosäuren und wird aus doppelt gespleißter mRNA abgelesen. Während des Spleißprozesses der *rec* mRNA stimmt der erste Spleißdonor und -akzeptor mit dem der *env*-RNA überein. Somit ist auch das erste Exon von *rec*, welches für die N-terminalen 87 Aminosäuren kodiert, mit dem 5'Ende von *env* identisch. In einem zweiten Spleißereignis wird das zweite Exon, welches die C-terminalen 18 Aminosäuren kodiert, angefügt, wobei eine Verschiebung im Leseraster bewirkt, dass die Aminosäuresequenz des zweiten Exons nicht mit der *Env*-Sequenz übereinstimmt.

Funktionell und strukturell ist das Rec Protein mit den Rev/Rex Proteinen von HIV-1 beziehungsweise HTLV-1 verwandt [206]. Analog zu Rev und Rex erstreckt sich im N-terminalen Bereich des Proteins von Aminosäure 13 bis 20 eine argininreiche Domäne (siehe Abbildung 9). Durch Funktionsanalysen und Lokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Domäne um das nukleäre Importsignal (NLS) handelt [205].

Ebenso wie Rev und Rex vermittelt Rec den nukleozytoplasmatischen Export der viralen Vollängen- und subgenomischen *env*-Transkripte durch Bindung an sein responsives Element [206]. Das Rec responsive Element (RcRE) umfasst einen Bereich von 430

Nukleotiden und befindet sich in der U3-Region der 3'LTR. Das HERV-K RcRE besteht aus einer komplexen, gefalteten RNA Sekundärstruktur mit zahlreichen Stem-Loops. Analysen des RcRE durch gerichtete Mutagenesen oder Deletionen zeigten, dass für die Bindung von Rec an sein RcRE ein weitaus größerer Sequenzbereich benötigt wird, als das bei Rev und Rex der Fall ist. Rev und Rex benötigen zur Bindung einen Sequenzbereich von 20-30 Nukleotiden innerhalb eines Stem-Loops ihres responsiven Elements. Rec hingegen benötigt einen Bereich von mehr als 210 Nukleotiden, um an sein RcRE zu binden [128]. Es wird vermutet, dass die Bindung über verschiedene Kontaktpunkte innerhalb der vier Stem-Loops erfolgt [128], [207]. Wurde einer dieser Kontaktpunkte mutiert oder deletiert, führte das zwar nicht zum Verlust der Rec/RcRE-Bindung, verhinderte jedoch, dass die Protein-RNA-Interaktion den Aufbau eines aktiven Exportkomplexes induzierte.

### 1.2.5 HERV-K und Krebs

Endogene Retroviren sind oft mit Tumorerkrankungen assoziiert. So verursacht das Maus-Mammatumor-Virus (MMTV) Brusttumore bei Mäusen und das Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV) Lungenkarzinome in Schafen [249].

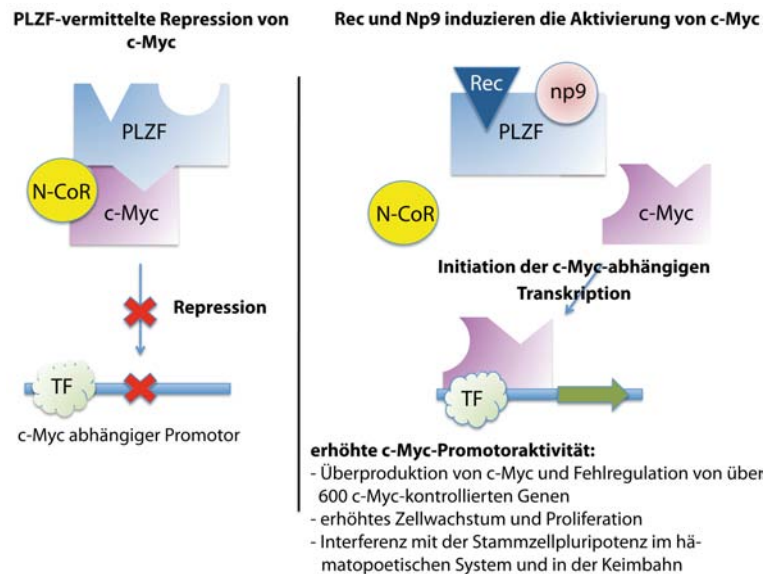
Die Mechanismen der Krebsentstehung sind dabei vielfältig. Zum einen kann die provirale chromosomale Integration die Expression benachbarter Gene empfindlich stören [163], [181], [180], [182]. Häufig kodieren Retroviren aber auch Proteine, die onkogen sind. Ein Beispiel dafür ist das *src*-Onkogen des Rous Sarcoma Virus (RSV), das *tax*-Gen des Humanen T-Zell-Leukämievirus oder das *env*-Gen des JSRV. Onkogene retrovirale Proteine stimulieren häufig die Zellproliferation, indem sie zelluläre Signalkaskaden oder die Cytokinproduktion beeinflussen, was in unkontrolliertem Zellwachstum und/oder Immunsuppression resultiert.

In gesunden Geweben ist die HERV-K(HML-2)-Expression gewöhnlich reprimiert. Häufig zeigen jedoch maligne Gewebe wie Keimzelltumore, Melanome oder Eierstocktumore eine Reaktivierung der viralen Proteine [198], [236], [48], [139], [326], [47]. Zudem ist das Niveau von HERV-K *env*-RNA in Brustkrebsgeweben und *gag*-RNA in periphe-



ren Blutzellen von Leukämiepatienten sowie von Patienten mit Prostata- oder Eierstockkrebs erhöht [324], [95], [82], [151]. Häufig bilden Patienten mit Keimzelltumoren (GCT) eine Immunantwort gegen HERV-K Gag und Env-Proteine aus [199], [118]. Dabei korreliert die Antikörperantwort gegen HERV-K Proteine stark mit der klinischen Erscheinungsform der GCTs und kann deshalb als diagnostischer und prognostischer Marker verwendet werden [169]. Hahn *et al.* zeigten 2008, dass die Immunantwort gegen HERV-K Genprodukte negativ mit den Überlebenschancen von Melanompatienten korreliert [129]. Sowohl in Melanom-, Mammakarzinom- als auch in Teratokarzinomzelllinien konnte die Bildung von HERV-K(HML-2)-Partikeln nachgewiesen werden. Contreras-Galindo *et al.* konnten im Plasma von HIV-1 Patienten sowie im Blut von Brustkrebs- und Lymphompatienten HERV-K(HML-2)-RNA detektieren. Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen zeigte die Gruppe erstmals, dass virusähnliche Partikel im Plasma von Lymphompatienten enthalten sind [65]. Dennoch ist es bisher unklar, ob die erhöhte HERV-K-Expression Ursache oder Folge der Zelltransformation ist. Obwohl verschiedene Gruppen bereits gezeigt haben, dass die Rec-, Np9- und Env-Expression die Tumorentwicklung unterstützen kann, sind die Mechanismen, durch die HERV-K onkogen sein könnte, nicht genau verstanden.

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass das Rec-Protein mit Wirtsproteinen interagieren muss, um seiner Funktion während der Virusassemblierung gerecht zu werden. Solche Interaktionen können aber auch negative Auswirkungen auf den Wirtsstoffwechsel haben. HERV-K Genexpression könnte daher dazu beitragen, dass die Zelle in ein Vorkrebsstadium gebracht wird. Transgene Mäuse, die Rec exprimierten, zeigten beispielsweise eine gestörte Keimzellentwicklung und einige Tiere zeigten sogar degenerative Läsionen, die den Läsionen von Seminomen sehr ähnelten [110]. Sowohl das Rec, als auch das Np9-Protein interagieren mit dem Promyelozytischen Leukämie Zinkfinger Protein (PLZF) [28], [81]. Transiente Co-Expression von Rec oder Np9 mit PLZF beeinträchtigte die PLZF-Funktion als negativer Regulator des Protoonkogens *c-myc* und führte zu einem Zellzyklusarrest und Apoptose [81]. PLZF ist zudem für die Regeneration der Spermatogonien in Mäusen verantwortlich und steht unter Verdacht, bestimmte humane Leukämien auszulösen [42], [67]. Aufgrund dieser Störung



**Abbildung 11: Die Interaktion von Rec bzw. Np9 mit PLZF führt zu einer Fehlregulation von c-Myc:** PLZF ist ein Repressor des c-Myc-Proteins. Es verhindert eine übermäßige Transkriptions-Aktivität von c-Myc. Binden Rec oder Np9 an PLZF, verliert das Protein seine reprimierende Wirkung. Daraus resultiert eine erhöhte c-Myc-Promotoraktivität, die mit der Fehlregulation von über 600 Zielgenen verbunden ist. N-CoR: Co-Repressor von c-Myc, TF: Transkriptionsinitiationsfaktor.

der Prozesse während der Keimzellbildung könnten HERV-K Rec und Np9 direkt mit der Ausbildung von Keimzelltumoren in Verbindung gebracht werden. Eine schematische Übersicht der Rec-PLZF-Interaktion ist in Abbildung 11 dargestellt.

Der Einfluss der anderen HERV-K Proteine auf die Zelltransformation oder Tumorerkennung durch das Immunsystem ist momentan noch nicht geklärt. Es ist jedoch möglich, dass das retrovirale Hüllprotein dabei eine Rolle spielt [84]. Einige retrovirale Hüllproteine zeigen immunsuppressive Eigenschaften. Verschiedene Gruppen berichteten bereits über immunsuppressive Eigenschaften der Transmembranproteine von  $\gamma$ -Retroviren, wie das Hüllprotein p15E des Porcinen Endogenen Retrovirus (PERV), von  $\delta$ -Retroviren und des HERV-H Env in immunokompetenten Tieren [212], [22], [213]. Ähnliche Effekte sind für das Syncytin-2 (Env von HERV-FRD), jedoch nicht für das Syncytin-1 (Env von HERV-W) beschrieben worden [23], [215]. Experimente mit Deletionsmutanten zeigten, dass die immunsuppressive Domäne (ISU) der transmembranen Untereinheit des Hüllproteins (TM) für diese Immunsuppression verant-

wortlich ist. Durch gezielte Mutagenese in dieser Region konnte ein immunsuppressives Syncytin in ein nicht-supprimierendes Syncytin gewandelt werden und *vice versa*. Der immunsuppressive Effekt ist dabei nicht nur lokal, sondern hat auch Auswirkungen auf die humorale Immunantwort. In einem „Tumor-Rejection-Assay“ bildeten Mäuse viel mehr spezifische Antikörper gegen das nicht-immunsuppressive Syncytin-1 als gegen das Syncytin-2. Ebenso bewirkte ein siRNA-knockdown des immunsuppressiven TMs eine spontane Tumorabstoßung in diesem Assay [214]. Neueste Daten zeigen, dass das HERV-K TM, ähnlich wie das HIV-1 TM gp41, die Cytokinexpression moduliert (persönliches Gespräch mit Dr. Joachim Denner). Das Herbeiführen eines anti-inflammatorischen Milieus durch einen Tumor würde die Wahrscheinlichkeit senken, dass dieser durch das Immunsystem erkannt wird und würde das Tumorwachstum begünstigen. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob sowohl das HERV-K113 Env als auch das Rec neben ihrer Funktion bei der Virusreplikation eine Rolle in der Tumorgenese spielen.

## 2 Materialien und Methoden

Dieses Kapitel dient der Aufzählung der verwendeten Materialien und der Erläuterung der angewandten Methoden.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborgeräte, Apparaturen und Hilfsmittel

Apparatur	Hersteller
AlphaImager 2200 MultiImage Light Cabinet	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Beckman L8-70M Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator C 200 für eukaryotische Zellen	Labotect, Göttingen, Deutschland
Coulter-Counter (Zellzähler)	Coulter Electronics Inc., Miami, USA
Digital Grafic Printer UP-D895	Sony Corporation, USA
DNA Engine Thermocycler	BioRad, Hercules, USA
Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System	BioRad, Hercules, California, USA
Mini-Protean 3 Electrophoresis	BioRad, Hercules, California, USA
Gene Pulser XCell + Shock Pod	BioRad, Hercules, USA
Horizontalschüttler GFL 3016	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Inkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Inverses Lichtmikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 510 META (cLSM)	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Microplate Luminometer Centro LB 960	BERTHOLD TECHNOLOGIES Bioanalytic, Bad Wildbad, Deutschland
Multifuge 1S-R	Kendro, Langenselbold, Deutschland
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
Photometer UV-1202	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Power Pac HC	BioRad, Hercules, California, USA
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, Hercules, California, USA
UV-Transilluminator	BioView, Billerica, USA

**Tabelle 2:** Geräte

#### 2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards

Chemikalien / Enzyme	Hersteller
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Chemikalien / Enzyme	Hersteller
Benzonase <sup>®</sup> Nuclease, >90 % purity	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BigDye 3.1	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Foster City, USA
Dihydrotestosteron	Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, MO, USA
dNTP's	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
EDTA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Generuler 1kb Ladder Plus	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
L-Glutamin	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare, Fairfield, USA
Ni-NTA-Sepharose	
Natriumarsenit	Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, MO, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Protease-Inhibitor (Tabletten)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 3:** Chemikalien bzw. Enzyme und ihre Bezugsquelle

### 2.1.3 Puffer und Nährmedien

Puffer/ Medium	Zusammensetzung
6 × DNA-Probenpuffer	10 mM Tris-Acetat, 50 mM EDTA, 10 % Ficoll-400 (w/v) (Serva), 0,4 % Orange-G (w/v) (Sigma) in H <sub>2</sub> O
2x YT-Medium	1 % Bacto-Trypton; 1 % Bacto Hefe Extrakt; 0,5 NaCl
LB-Medium	1 % Bacto Hefe Extrakt; 1 % NaCl, pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/l Agar
10 % SDS	(w/v) in A. bidest
SOB-Medium	20 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast-Extract, 0,186 g KCl, 0,584 g NaCl ad. 970 ml H <sub>2</sub> O, pH 7,0
SOC-Medium	9,7 Teile SOB, 0,1 Teil Mg-Mix, 0,2 Teile Glukose

Puffer/ Medium	Zusammensetzung
1 × TAE	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2
1 × TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

**Tabelle 4:** Zusammensetzung verwendeter Puffer und Medien

### 2.1.4 Kits

Kit	Bezugsquelle
Dual-Glo <sup>®</sup> Luciferase Assay System	Promega Corporation, Madison, USA
Effectene Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Luciferase 1000 Assay System	Promega Corporation, Madison, USA
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuikChange <sup>®</sup> Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
Y-DER Yeast DNA Extraction Kit	Pierce, Rockford, USA

**Tabelle 5:** Bezugsquellen verwendeter Kits

### 2.1.5 Konstrukte

Name	Bezugsquelle/Publikation
oricoEnvΔ	Philipp Kramer [133]
pSIvec1envLuc	Bannert <i>et al.</i> , [8], [142]
pCMV-Rev	Bannert <i>et al.</i> , [8]
pSVIII-KS	Bannert <i>et al.</i> , [8], [142]
HERV-KCON-GFP	Lee <i>et al.</i> , [186]
CMVoricoHERV-K113	Bannert <i>et al.</i> , n.p.
CMVoricoHERV-K113-GFP	Philipp Kramer, n.p.
ARR <sub>tk</sub> Luz	Tiley <i>et al.</i> , [43], [44]
HERV-K113 LTR-Luz	Nadine Beimforde <i>et al.</i> , 2008 [13]
HERV-K10 LTR-Luz	Nadine Beimforde, n.p.
KoRV LTR-Luz	Beimforde <i>et al.</i> , 2008 [13]
HIV-1 LTR-Luz	Beimforde <i>et al.</i> , 2008 [13]

Name	Bezugsquelle/Publikation
pCMV-AR	Tilley <i>et al.</i> , [43], [44]
pcDNA3-wtRecV5	Bannert <i>et al.</i> [13]
TIA-1-YFP	Kedersha <i>et al.</i> , [162]
DCPI $\alpha$	Kedersha <i>et al.</i> , [162]
APOBEC3G-YFP	Malim <i>et al.</i> , [113]
pTH-XMRV-coEnv	Oliver Hohn, [144]

**Tabelle 6:** Verwendete Konstrukte; n.p. nicht publiziert

### 2.1.6 Bakterienstämme

Stamm	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> Top10	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
<i>E. coli</i> XL10 Blue	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
<i>E. coli</i> KC8	Clontech Laboratories, Inc. Mountain View, USA

**Tabelle 7:** Verwendete *E. coli*-Stämme

### 2.1.7 Antibiotika

Antibiotikum	Bezugsquelle
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Geneticindisulfat (G418 Sulfat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gentamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
100 $\times$ Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

**Tabelle 8:** Verwendete Antibiotika und ihre Bezugsquelle

### 2.1.8 Antikörper

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
$\alpha$ -V5-HRP	Maus	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
$\alpha$ -V5-HRP	Ziege	Novus Biologicals, Inc., Littleton, USA
$\alpha$ -V5	Maus	AbD Serotec, MorphoSys AG, Martinsried, Deutschland
$\alpha$ -V5-Cy3	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
$\alpha$ -FLAG-HRP M2	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
$\alpha$ -FLAG	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland
$\alpha$ Maus-IgG-Cy3	Ziege	Jackson Immuno Research, Baltimore, USA
AlexaFluor <sup>®</sup> 488 $\alpha$ Maus-IgG	Ziege	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
AlexaFluor <sup>®</sup> 488 $\alpha$ Rabbit-IgG	Esel	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
AlexaFluor <sup>®</sup> 488 $\alpha$ Goat-IgG	Huhn	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
AlexaFluor <sup>®</sup> 594 $\alpha$ Maus-IgG	Ziege	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
AlexaFluor <sup>®</sup> 594 $\alpha$ Rabbit-IgG	Esel	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
AlexaFluor <sup>®</sup> 594 $\alpha$ Goat-IgG	Huhn	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
$\alpha$ Human-IgG-AP	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland
$\alpha$ Mouse IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland
$\alpha$ V5-Sepharose	Maus	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland
$\alpha$ V5-Sepharose	Ziege	Novus Biologicals, Inc., Littleton, USA
$\alpha$ -FLAG <sup>®</sup> M2 Affinity Gel	Maus	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland
HERV-K $\alpha$ Env (A-h HERV K envp79kDa IgG2a 100)	Maus	Austral Biologicals, San Ramon, USA
HERV-K $\alpha$ Gag (HERM-1811-5)	Maus	Austral Biologicals, San Ramon, USA

**Tabelle 9:** Verwendete Antikörper und ihre Bezugsquelle

### 2.1.9 Software

Software	Bezugsquelle
Adobe Photoshop <sup>®</sup> CS4	Adobe Systems Inc., San José, USA
BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.9.0	Tom Hall (1999) [131]
Nanodrop ND-1000 v3.3	Molecular Dynamics /Amersham Bioscience Nanodrop, Wilmington, USA
Berthold Luminometer Analysis Software	BERTHOLD TECHNOLOGIES Bioanalytic, Bad Wildbad, Deutschland

**Tabelle 10:** Software und ihre Bezugsquellen. Neben diesen speziellen Programmen wurden Standardprogramme wie das Microsoft Office Packet, L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X, und allgemeine Internetapplikationen bzw. Datenbanken (NCBI, ClustalW, Phylogenetic Tree Printer u.a.) verwendet.

### 2.1.10 Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten Primer sind im Anhang unter A.1 aufgelistet. Alle Primer wurden durch die Firma Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Vor Gebrauch wurden die Oligonukleotide mit A. bidest auf eine Endkonzentration von 100 pmol/ $\mu$ l verdünnt.



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Yeast Two-Hybrid System

Das Two-Hybrid-System wurde von Fields und Song entwickelt und basiert auf Arbeiten über den LexA-Repressor von *E. coli* und dem Gal4-Protein aus der Hefe [103], [39]. Eukaryotische Transkriptionsfaktoren bestehen aus zwei Domänen: der DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD), die es dem Transkriptionsfaktor ermöglicht, in räumlicher Nähe zum Transkriptionsstartpunkt zu binden, und der Aktivierungsdomäne (AD), die mit der Transkriptionsmaschinerie interagiert und damit die Transkription von Genen initiiert. In dieser Arbeit wurde das DupLEX-A<sup>®</sup> Yeast Two-Hybrid System (OriGene) verwendet, ein LexA-basiertes System, welches auch als „interaction trap“ bezeichnet wird [127]. Da LexA ein bakterielles Protein ist, kann eine Aktivierung durch die Hefe ausgeschlossen werden. Als cDNA-Bibliothek wurde eine „random primed“ Milz Bibliothek (Invitrogen) verwendet. Für größtmögliche Spezifität wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 (Invitrogen) verwendet, dessen Chromosom so verändert wurde, dass er sechs *lexA*-Operatoren vor dem Leucin2-Gen (*Leu2*) besitzt. Dieser Stamm, der zusätzlich ein  $\beta$ -Galactosidase-Reporter gen (*LacZ*) trägt, ist auxotroph für Leucin (*Leu2*), Uracil (*URA3*), Histidin (*HIS3*) und Tryptophan (*Trp*). Mit Hilfe von speziellen Mangelmedien (BD Clontech) konnte so gezielt die Plasmid-Transformation überprüft und eine Interaktion festgestellt werden (siehe Tabelle 11).

Plasmid	Selektionsmedium
Rec-Köderplasmid	HIS3 <sup>-</sup>
Bibliotheks-Beuteplasmid	TRP1 <sup>-</sup>
URA3-Reporterplasmid	URA3 <sup>-</sup>
Leu2-Reporterplasmid	LEU2 <sup>-</sup>
LacZ-Reporterplasmid	Glukose-freies Gal/Raf-Medium
LacZ-Reporterplasmid	X-Gal

**Tabelle 11:** Verwendete YTH-Selektionsmedien

Es wurden die vorgeschriebenen Minimal und Mangelmedien (sogenannte Dropout-

Medien, BD Clontech) verwendet, wobei für die Dropout-Medien 10 x Stammlösungen und für die Minimalmedien 5 x konzentrierte Lösungen eingesetzt wurden. Als Köderplasmid wurde der Vektor pEG202 (Origene) verwendet. Die cDNA-Bibliothek lag in dem Vektor pYesTrp (Invitrogen) vor.

**2.2.1.1 Hefe-Transformation** Die Transformation erfolgte mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode [117], [285]. In Gegenwart von Lithiumionen, Polyethylenglykol (PEG) und DMSO wurde die DNA mittels Hitzeschock in die Hefezellen gebracht. Die Transformation der cDNA-Bibliothek erfolgte nach dem „large scale“-Transformationsprotokoll von BD Clontech in zehn Parallelen. Die übrigen Plasmide wurden mit Hilfe des „small scale“-Transformationsprotokolls (BD Clontech) in die Hefen gebracht. Die Protokolle wurden geringfügig modifiziert. Statt eines 15 minütigen Hitzeschocks, wurden die Hefen in drei Phasen geschockt: nach acht Minuten bei 42 °C wurden die Zellen für weitere acht Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie erneut für acht Minuten bei 42 °C geschockt wurden. Weiterhin wurden die Hefezellen vor dem Ausplattieren zusätzlich für eine Stunde in 5 ml (bzw. 50 ml bei „large scale“-Transformationen) Mangelmedium bei 30 °C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Hefen zentrifugiert, in TE-Puffer resuspendiert und auf Selektionsplatten ausplattiert.

**2.2.1.2 Yeast Two-Hybrid Analyse** Für die Yeast Two-Hybrid Analyse mit dem Lex-A Yeast Two-Hybrid System (Origene) wurden zunächst der Köder mittels PCR, Restriktionsverdau und Ligation in den pEG202 Vektor kloniert. Entsprechend der Herstellerangaben erfolgte nach dem Test auf Autoaktivierung die Transformation der Bibliotheksfragmente und die Untersuchung zur Spezifität der Wechselwirkung.

- **Repressions-Assay:** Die Fusionsproteine müssen in den Zellkern gelangen, um die Funktionalität des Ansatzes zu gewährleisten. Um festzustellen, ob das Köderprotein in den Zellkern gelangt, wird zusätzlich zum pEG202-Köderplasmid das pJK101-Plasmid kotransformiert. Dieses Plasmid enthält ein Reporterplasmid, welches neben dem Reportergen einen *lexA*-Operator trägt. Gelangt das Köderfusionprotein in den Zellkern, wird durch dessen Bindung an den *lexA*-Operator

die Transkription des Reportergens gehemmt beziehungsweise vollständig unterdrückt.

- **Interaktionstest:** Die Interaktionstests erfolgten sowohl auf Glukose-haltigen als auch auf Galactose-haltigen Mangelmedien. Fehlt Glukose als Kohlenstoffquelle, so sind die transformierten Hefen, die aufgrund einer Proteininteraktion die  $\beta$ -Galactosidase exprimieren, in der Lage, Galactose als alternative Kohlenstoffquelle zu verwenden. Durch zusätzliche Gabe des Indikatorfarbstoffes X-Gal, wird die LacZ-Expression durch Blaufärbung der Kolonien sichtbar gemacht. Zusätzlich müssen die Hefen bei einer positiven Interaktion auf einem LEU2<sup>-</sup>, HIS3<sup>-</sup>, TRP1<sup>-</sup>, URA3<sup>-</sup>-Mangelmedium wachsen können.
- **Spezifitätstest:** Um eine unspezifische Interaktion auszuschließen, wurden statt des Köderplasmids der pEG202-Leervektor beziehungsweise statt der cDNA-Bibliothek das pYesTrp-Leerplasmid transfiziert. Erfolgt auch mit diesen Leervektoren eine Interaktion, handelt es sich um ein unspezifisches Signal. Auch dieser Test wurde sowohl auf Glukose- als auch auf Galactose-haltigem Medium durchgeführt.
- **Plasmidvereinzlung und Retransformation:** Da Hefen mehrere Bibliotheksplasmide gleichzeitig tragen können und es daher nicht eindeutig bestimmt werden kann, welches Expressionsprodukt für die Interaktion verantwortlich ist, wurde Plasmid-DNA aus den Hefen mit Hilfe des „Yeast Plasmid Isolation Kits“ (Pierce) isoliert und durch Transformation in *E. coli* KC8 (BD Clontech) vereinzelt. KC8-Zellen sind auxotroph für TRP1, LEU2 und HIS3 und können daher auf M9 Trp<sup>-</sup>-Minimalmedium (BD Clontech) gezielt auf Bibliotheksplasmide selektiert werden. Nach erneuter Plasmidisolation wurden diese mit AluI verdaut, um gleiche Bibliotheksfragmente festzustellen. Die verschiedenen Bibliotheksplasmide wurden nun in Hefen mit dem Köderplasmid retransformiert, um eine erneute Interaktion feststellen zu können. War diese Interaktion positiv, wurde das Bibliotheksfragment mit Hilfe von spezifischen Plasmid-Primern sequenziert.

## 2.2.2 DNA-Analytik

**2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion** Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde verwendet, um einen spezifischen DNA-Abschnitt *in vitro* zu vermehren. Der verwendete Standardansatz setzt sich aus

- 500 pg bis 100 ng Template DNA
- 5  $\mu$ l 10 x Polymerase-Puffer
- 15 pmol For/Rev-Primer
- 2,5 Einheiten Polymerase

zusammen. Die anschließende PCR-Reaktion besteht aus Denaturierungs-, Annealing- und einer Elongationsphase.

PCR-Bedingungen:

2 min 95 °C Denaturierung	}	35x
30 s 95 °C Denaturierung		
30 s 60 °C Primer-Annealing		
1 min pro kb 72 °C Elongation		
10 min 72 °C Finale Elongation		

**2.2.2.2 Expand High Fidelity PCR** Das Expand High Fidelity PCR System (Roche) basiert auf einem Gemisch aus der Taq (*Thermus aquaticus*) DNA Polymerase und dem Tgo (*Thermococcus gorgonarius*) Polymeraseenzym. Letzteres besitzt eine „proofreading“-Aktivität für eine höhere Genauigkeit der Amplifikation.

Ansatz 1		Ansatz 2	
dNTP-Mix	800 $\mu$ M	10 x Puffer	1 x
Primer_F	300 nM	Enzyme-Mix	2,5 Einheiten
Primer_R	300 nM		
Template-DNA	200 ng		

**Tabelle 12:** Verwendete Reagenzien der Expand High-Fidelity PCR

Um die Degradierung von Template oder Primern zu verhindern, wurde die PCR-Reaktion in zwei Reaktionsansätzen vorbereitet und am Ende vereint. Die Zusammensetzung der Ansätze ist in Tabelle 12 aufgeführt. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 13 dargestellt.

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1 ×
Denaturierung	94 °C	15 s	10 ×
Annealing	53 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	15 s	20 ×
Annealing	53 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2 min + 5 s	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1 ×

**Tabelle 13:** Bedingungen der Expand High-Fidelity PCR

**2.2.2.3 Mutagenese-PCR** Für den Austausch einzelner oder mehrerer Basen beziehungsweise Aminosäuren wurden Primerpaare verwendet, die so an die DNA binden, dass die zu verändernde Position genau im Zentrum der Primer lag. Bei einzelnen Mutagenesen wurde ein komplementäres Primerpaar verwendet. Mit der Pfu Turbo-DNA-Polymerase (Stratagene) wurde der komplette Vektor neu amplifiziert. Anschließend wurde der methylierte Ursprungsvektor mit 20 Einheiten DpnI für eine Stunde bei 37 °C verdaut. DpnI erkennt nur die methylierte DNA, nicht jedoch die neusynthetisierte, mutagenisierte DNA. Von diesem Ansatz wurden 1 µl in elektrokompente Top10-Zellen (Invitrogen) elektroporiert und so vermehrt. In Reaktionen, in denen mehrere Nukleotide gleichzeitig ausgetauscht werden sollten, wurden bis zu fünf Primer gleichzeitig eingesetzt. Die verwendeten Primer binden dabei ausschließlich an den selben DNA-Strang. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer wurde nach Herstellerangaben auf mindestens 75 °C eingestellt und wurde mit folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{mismatch}$$

Dabei steht % GC für den prozentualen Guanin und Cytosin-Anteil und N für die Primergesamtlänge. Der optimale GC-Gehalt des Primers sollte bei mindestens 40 %

liegen. Der typische PCR-Ansatz ist in Tabelle 14 dargestellt.

PCR-Bedingungen:	1 min 95 °C Initiale Denaturierung	} 30x
	1 min 95 °C Denaturierung	
	1 min 55 °C Primer-Annealing	
	2 min/kb 65 °C Elongation	

Komponente	Konzentration	Typischer Reaktionsansatz
10 x QuikChange Multi Reaction Buffer	1 x	2,5 $\mu$ l
Quik Solution, 25 x	1 x	0,5 $\mu$ l
Template-DNA	100 ng	2 $\mu$ l
Mutagenese Primer	1-3 Primer (à 100 ng), 4-5 Primer (à 50 ng)	0,5-1,5 $\mu$ l (je nach Primerlänge)
dNTP-Mix, 25 x	1 x	1 $\mu$ l
QuikChange Multi Enzyme Blend	2,5 Einheiten	1 $\mu$ l
A. bidest		ad. 25 $\mu$ l

**Tabelle 14:** Ansatz der Mutagenese-PCR

**2.2.2.4 Restriktion mit Endonukleasen** Zur Überprüfung von Vektoren und für Klonierungen wurden die entsprechenden DNAs mit spezifischen bakteriellen Endonukleasen verdaut. Die verwendeten Typ-2-Restriktionsendonukleasen erkennen jeweils eine palindromartige Sequenz und erzeugen Enden mit 5'-Überhang. Die Reaktion erfolgt nach Herstellerangaben (NEB). Ein Restriktionsverdau beläuft sich auf ca. zwei Stunden bei 37 °C. Anschließend wird die Qualität des Verdau per Agarosegelelektrophorese kontrolliert (siehe Abschnitt 2.2.2.7).

**2.2.2.5 Ligation** Die T4-DNA-Ligase verknüpft freie 3'-OH-Gruppen mit 5'-Phosphatresten durch Bildung von Phosphodiesterbindungen. Dieser Prozess benötigt ATP. Durch Ligation können DNA-Abschnitte in geschnittene Vektoren eingefügt werden. Die Zusammensetzung eines Ligationsansatzes ist in Tabelle 15 aufgelistet. Der Ligati-

onsansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde 1  $\mu$ l der Ligationsreaktion in elektrokompetente *E.coli* transformiert und auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen.

Komponente	Eingesetztes Volumen/Konzentration
Verhältnis Insert:Vektor	3:1 (max. 8 $\mu$ l)
Ligationspuffer, 10 x	1 $\mu$ l
T4-DNA-Ligase	0,5 $\mu$ l (100 Einheiten)
A. bidest	ad. 10 $\mu$ l

**Tabelle 15:** Ligationsansatz

**2.2.2.6 DNA-Agarosegelelektrophorese** Diese analytische Methode diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe und Ladung und ermöglichte so eine Qualitäts- und Größenkontrolle der DNA. Agarose wurde mit 1 x TAE-Puffer auf eine Endkonzentration von 0,8 bis 2 % gebracht, in einer Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen erhitzt und mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid (Sigma) versetzt [278]. Die zu untersuchende Proben wurde mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente im 1 % Agarosegel erfolgte in 1 x TAE-Laufpuffer bei einer Spannung von 50-120 V.

Als Größenstandard wurden je nach zu erwartenden Fragmentgrößen die DNA-Marker „Generuler 1 kb Ladder Plus“ oder „Generuler 100 bp Ladder“ (Fermentas) verwendet. Zur Dokumentation wurde der AlphaImager 2200 verwendet.

### 2.2.2.7 Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten

- **Aufreinigung von PCR-Produkten:** Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Hersteller-Angaben. Dabei wurden DNA-Fragmente zwischen 100 und 10.000 bp bei einem pH-Wert von  $\leq 7,5$  und hohen Salzkonzentrationen an eine Silikagelmembran gebunden, durch Waschstreps gereinigt und mit 30  $\mu$ l Aqua bidest eluiert.
- **Gelextraktion:** Mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese wurden DNA-Fragmente durch ihre Mobilität im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt und durch

Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht. Nach erfolgter DNA-Auftrennung wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt und die DNA-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die DNA-Aufreinigung erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach den Hersteller-Angaben. Dabei wird das Gel bei 50 °C in einem Lösungs- und Bindepuffer mit pH-Indikator gelöst. Das weitere Aufreinigungsprinzip ist identisch mit dem der PCR-Aufreinigung.

#### **2.2.2.8 Herstellung elektrokompetenter „One Shot“ Top10 *E. coli***

Top10 *E. coli* wurden aus einem Glycerin-Stock auf 2YT-Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie in 10 ml 2YT-Medium übertragen und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die 10 ml-über-Nacht-Kultur wurde auf vier Kolben mit 250 ml Medium verteilt und ebenfalls bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Sobald die Kulturen eine optische Dichte von 0,6 bis 0,8 erreichten, wurden je zwei Kulturen vereint und für 15 bis 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Bakterien werden anschließend bei 4000 rpm und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert und die Bakterienpellets werden in je 250 ml eiskaltem 1 mM HEPES resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Pellets mit je 125 ml 1 mM HEPES vermischt und wiederholt zentrifugiert. Es folgten die Resuspendierung der Pellets in 25 ml 1 mM HEPES/10 % Glycerin und eine erneute Zentrifugation bei 5000 rpm, 4 °C und 20 Minuten. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Bakterien in 3 ml eiskaltem 10 % Glycerin aufgenommen. Aliquots à 55 µl wurden in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren. Die Top10 *E. coli*-Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.2.9 Transformation**

Transformationen wurden sowohl chemisch, als auch durch Elektroporation durchgeführt. Bei der chemischen Transformation wurde die zu transformierende DNA zu den *E. coli* Top10 oder BL21 pipettiert und das Bakterien-DNA-Gemisch für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 20 Sekunden. Anschließend wurden die Bakterien mit 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert.





Komponente	Eingesetztes Volumen/Konzentration
5x ABI-Puffer	1 $\mu$ l
Big-Dye	2 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l (150-300 ng)
Sequenzierprimer (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
A. bidest	ad. 10 $\mu$ l

**Tabelle 16:** Reaktionsansatz für Sequenzierungen

## 2.2.3 Zellkultur

### 2.2.3.1 Puffer und Medien

Puffer und Medien	Zusammensetzung bzw. Bezugsquelle
CIP-Waschpuffer	1 % Triton-X 100; 20 mM Tris (pH 7,7); 150 mM NaCl; 0,1 % SDS
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
RPMI-1640	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
FKS (Fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin, Deutschland
2 x HEPES Buffer Saline (HBS)	5,6 ml 5 M NaCl; 10 ml 0,5 M HEPES (pH 7,1); 1 ml 0,15 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; ad. 100 ml Aqua bidest.
Isoton <sup>®</sup> II Diluent	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Zellysispuffer	1 % Triton-X 100; 20 mM Tris (pH 7,7); 150 mM NaCl
1 % Marvel	1 % Milchpulver in PBS
Phosphate buffered saline (PBS)	123 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat; pH 7,0
Trypsin/EDTA	0,05 % Trypsin (pH 7,2), 0,02 % EDTA in PBS; TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
200 mM L-Glutamin	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
100 x Penicillin/Streptomycin	10000 IE Penicillin/10000 $\mu$ g/ml Streptomycin; TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland

**Tabelle 17:** Verwendete Puffer und Medien für zellbiologische Arbeiten

### 2.2.3.2 Zellbiologische Verbrauchsmaterialien

Arbeitsmittel	Hersteller
96 Well Plates	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
6 Well Plates	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland

Arbeitsmittel	Hersteller
24 Well Plates	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
100 mm Plates	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Filter für Spritzen, 0,45 $\mu\text{m}$	Whatman Schleicher & Schuell, Springfield Mill, UK
Kryoröhrchen, 2 ml	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Lab-Tek II Chamberslides	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Spritzen, Injekt 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen UZ, Cellulose Nitrate Tubes	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Zellkulturflaschen, 75 $\text{cm}^2$	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellschaber	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland

**Tabelle 18:** Zellbiologische Verbrauchsmaterialien

### 2.2.3.3 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	verwendetes Medium
HEK 293T	humanes embryonales Nierenkarzinom	DMEM + FKS + L-Glutamin
Huh-7	humanes Hepatokarzinom	DMEM + FKS + L-Glutamin
HeLa	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	DMEM + FKS + L-Glutamin
LNCaP	humanes Prostatakarzinom	RPMI + FKS
DU 145	humanes Prostatakarzinom	EMEM + FKS
Tera-1	humanes Teratokarzinom	DMEM + FKS + L-Glutamin
GH	humanes Teratokarzinom	DMEM + FKS + L-Glutamin

**Tabelle 19:** Verwendete Zelllinien

**2.2.3.4 Zellkultivierung** Die verschiedenen Zelllinien (siehe Tabelle 19) wurden in 75  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen kultiviert und passagiert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 98 % Luftfeuchtigkeit. Die verwendeten Medien wurden vor ihrer Verwendung entsprechend der Angaben in Tabelle 19 mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin und 1 x Penicillin/Streptomycin komplementiert. Die Zellen wurden zunächst vorsichtig mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA vom Kulturflaschenboden gelöst. Entsprechend der Zellteilungsrate wurde ein Teil der Zellen weiterkultiviert und der Rest verworfen. Wurden Zellen für weiterführende Experimente benötigt, wurden die Zellen 5 Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert, in 10 ml Medium resuspendiert, die Zellzahl mit Hilfe des Coulter Counters Z2 (Coulter Electronics) bestimmt und die Zellen entsprechend ihrer Wachstumsraten in den verschiedenen Kultivierungsgefäßen

ausgesät (siehe Tabelle 20).

Zelllinie	96 Well	Chamberslide	24 Well	6 Well	100 mm Platte
HEK 293T	20.000	100.000	100.000	600.000	4.000.000
HUH-7	-	80.000	80.000	400.000	2.500.000
HeLa	-	70.000	70.000	250.000	2.000.000
LNCaP	-	125.000	125.000	650.000	4.000.000
DU 145	-	100.000	100.000	600.000	4.000.000
Tera-1	-	150.000	150.000	650.000	4.000.000
GH	-	120.000	120.000	500.000	3.000.000

**Tabelle 20:** Verwendete Zellzahlen

**2.2.3.5 Transfektion** Die Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte in Chamberslides, 24 Well- und 6 Well-Platten mit Polyfect oder Effectene (beides Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben. Wurden 100 mm Platten transfiziert, wurde die Calciumchlorid-Methode verwendet. Für diese Transfektion wurden 25  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. In Pseudotypisierungsexperimenten wurden 15  $\mu\text{g}$  SHIV-Luziferasekonstrukt (pSIvec1envLuc) [142], [8], 5  $\mu\text{g}$  pCMV-Rev [8] und 0,5  $\mu\text{g}$  Hüllprotein eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde stets das nicht funktionelle HIV-1 Env $\Delta$ KS (pSVIII-KS) verwendet [8], [142]. Der DNA-Mix wurde mit A. bidest auf 450  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 50  $\mu\text{l}$  2,5 M Calciumchlorid versetzt. Anschließend wurde dieser Ansatz vorsichtig auf 500  $\mu\text{l}$  2 x HBS getropft. Nach einer 30 minütigen Inkubation wurde der Transfektionsansatz auf die gewaschenen und mit 8 ml Medium versehenen Zellen gegeben. Nach acht bis zehn Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zur gewünschten Expressionsstärke kultiviert. In Pseudotypisierungsexperimenten wurde nach 48 Stunden der Virus-haltige Überstand abgenommen, steril filtriert und in 1 ml Aliquots bei -80 °C gelagert. Die Viruskonzentration wurde mittels p24 Gag-„enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.4.9).

**2.2.3.6 Infektionsversuche** Infektionsversuche mit den HERV-K113 Hüllprotein-konstrukten erfolgten in 6 Well-Maßstab, wohingegen XMRV-Env (pTH-XMRV-coEnv) Infektionen in 96 Well-Platten durchgeführt wurden. Vor der Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Medium versehen. Pro Well wurden in 6 Well-Platten 200  $\mu$ l Medium vorgelegt, in 96 Well-Platten wurden 50  $\mu$ l Medium gegeben. Entsprechend der p24 Gag-Konzentrationen wurden die Virusüberstände mit Medium normalisiert. In 6 Well-Platten, wurden die Zellen mit 400  $\mu$ l Virusüberstand, in 96 Well-Platten mit 100  $\mu$ l Virussuspension versetzt. In 96 Well-Platten wurden Infektionen in sechs Parallelen, in 6 Well-Versuchen in drei Parallelen durchgeführt. Nach vier Stunden wurde das Medium in 6 Well-Platten auf 1,5 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden 48 Stunden mit der Virussuspension inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und in 70  $\mu$ l „Cell lysis reagent“ (Promega) lysiert. Je zweimal 10  $\mu$ l des Zelllysats oder Verdünnungen davon wurden für das „Luciferase Assay System“ (Promega) verwendet. Die Bestimmung der Luziferaseaktivität und damit auch der Infektionsraten erfolgte nach Herstellerangaben.

In Infektionsversuchen mit SEVI oder Samenflüssigkeit wurden die Virusüberstände vor der Infektion für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit der entsprechenden SEVI- bzw. Samenkonzentration inkubiert. Sowohl SEVI als auch Samenflüssigkeit wurden von Jan Münch zur Verfügung gestellt. In Experimenten mit SEVI, wurden die Suspensionen nach der Inkubationszeit direkt zu den Zellen gegeben. In Experimenten mit Samenflüssigkeit wurden 10  $\mu$ l des Virusüberstands mit dem gleichen Volumen Samenflüssigkeit bzw. fünf-fach-Verdünnungen davon versetzt. Dieses Virus/Samen-Suspensionen wurden auf Zellen mit 280  $\mu$ l Medium gegeben und somit 15-fach verdünnt. Um weitere zytotoxische Effekte zu vermeiden, wurde der Überstand nach zwei Stunden durch frisches Medium mit 50  $\mu$ g/ml Gentamycin (Sigma) ersetzt. Nach 48 Stunden erfolgte die Bestimmung der Infektionsraten mit Hilfe des „Luciferase Assay Systems“ (Promega).

**2.2.3.7 Androgenrezeptor-Transaktivierungsassays** Für den Androgenrezeptor-Transaktivierungsassay wurden HEK 293T, HeLa, Tera-1, GH, LNCap und DU

145-Zellen in 24 Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 0,1 bis 5 ng pCMV-AR [43], 5 bis 20 ng ARR\_tkLuc-Reporterkonstrukt [43], 2 bis 100 ng pcDNA3oricoRec-V5 und 1 bis 50 ng pCMV-hSGT beziehungsweise den entsprechenden Leervektoren transfiziert. Für Normalisierungen wurden 2 ng pCMV-Renilla transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 75  $\mu$ l Passive Lysis Buffer (Promega) lysiert, wovon 50  $\mu$ l für das Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega) verwendet wurden.

In Versuchen zur Überprüfung der Androgenabhängigkeit der Virus-LTRs wurde statt des ARR\_tkLuc-Reporterkonstrukts, das entsprechende pGL3-LTR-Konstrukt verwendet. Als Kontrollplasmid diente das pGL-SV40-Konstrukt (Promega).

Zusätzlich wurden die Zellen mit Dihydrotestosteron (DHT) behandelt. DHT (Sigma) wurde entsprechend des Herstellers in Ethanol gelöst. Zwei Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen auf eine Endkonzentration von 0,1 bis 1nM DHT eingestellt. Die Kontrollen wurden mit derselben Menge Ethanol behandelt.

**2.2.3.8 Messung des RNA-Transports** Für die Messung des Rec-vermittelten RNA-Transports wurden HEK 293T-Zellen mit 100 ng Shuttle-Reporterkonstrukt, 1 bis 100 ng pBud-oricoRec und 1 bis 50 ng pCMV-hSGT beziehungsweise pCMV-Staufen-1 transfiziert. Nach fünf Stunden wurden die Zellen in 75  $\mu$ l „Cell lysis reagent“ (Promega) lysiert, wovon 50  $\mu$ l für das „Luciferase Assay Systems“ (Promega) verwendet wurden. Zur Normalisierung wurden gleichzeitig 10  $\mu$ l des Lysats für eine Proteinbestimmung nach Bradford mit dem „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce) verwendet.

## 2.2.4 Protein-Analytik

**2.2.4.1 Zellyse/Proteinextraktion** Für molekularbiologische Analysen der HERV-K-Proteine wurden die transfizierten Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in Lysispuffer resuspendiert (siehe Tabelle 17). Durch Detergenzien im Puffer, werden die Zellmembranen, jedoch nicht die Kernmembranen aufgelöst. Vor der Zellyse wurde der Lysispuffer mit einer „complete“ Protease-Inhibitor-Tablette (Roche) versetzt, um eine Degradation zu vermeiden. Für die Lyse von Zellen im 6 Well-Format wurden 100  $\mu$ l, für 100 mm Platten wurden 500  $\mu$ l Puffer eingesetzt. Die Zellysate

wurden anschließend in Reaktionsgefäße auf Eis überführt und für 10 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Für weitere Analysen wurden diese Überstände bei -20 °C gelagert oder direkt für Western Blot-Analysen verwendet und mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt (BioRad).

**2.2.4.2 Immunpräzipitation** Für die Anreicherung von Proteinen und zum Interaktionsnachweis wurden Immun- bzw. Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dafür wurden Zellysate mit 20  $\mu$ l Antikörper-konjugierter Sepahrose, zum Beispiel  $\alpha$ V5-Sepahrose (Sigma) oder  $\alpha$ FLAG-Sepahrose (Sigma), versetzt. Die Protein-Sepahrose-Gemische wurden mit CIP-Puffer (siehe Tabelle 17) auf 1 ml aufgefüllt und für vier Stunden bei 4 °C über Kopf rotiert. Anschließend wurde das Gemisch für fünf Minuten bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Pellet wurde mindestens fünfmal in CIP-Puffer mit Protease-Inhibitor gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 20  $\mu$ l Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

**2.2.4.3 Herstellung rekombinanter Proteine** Für die Herstellung rekombinanter Proteine wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen in den His-markierten pET16b (Novagen) oder in den GST-markierten pGex (GE Healthcare) umklontiert und anschließend in *E. coli* BL21 transformiert. Pro Expression wurde eine Kolonie über Nacht in 10 ml LB Ampicillin angezogen und am nächsten Morgen in 250 ml LB Ampicillin überführt. Die Proteinexpression wurde bei einer optischen Dichte (OD) von 0,6 bis 0,8 mit 0,1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) durch Stimulation des *lac*-Operons initiiert. Nach 4 Stunden wurden die Bakterien bei 4500 rpm und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert, in 50 ml PBS gewaschen und die Bakterienpellets bei -20 °C gelagert.

Der Bakterienaufschluss erfolgte in 30 ml Bakterienlysispuffer (50 mM Tris-HCl, 5 % Glycerin, 50 mM NaCl, pH 7,2 und „complete“ Protease-Inhibitor) unter Zugabe von 5 bis 10 Einheiten Benzonase (Merck). Die Suspension wurde mit drei Ultraschallpulsen

à 20 Sekunden bei 250 W und 10 sekundigen Unterbrechungen durch Inkubation auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurden nichtlösliche Bestandteile durch 30-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C von löslichem Protein getrennt. 1 ml Ni-NTA-Sepharose (Qiagen) bzw. Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) wurden dreimal in 30 ml PBS gewaschen und zu dem klaren Bakterienlysate gegeben. Das Sepharose-Protein-Gemisch wurde nun für zwei Stunden bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Protein-Sepharose-Suspensionen auf Leersäulen (PolyPrep Chromatography Columns, BioRad) überführt und viermal mit Waschpuffer gewaschen. Für His-markierte Proteine wurde ein Waschpuffer bestehend aus 50 mM Tris-HCl, 5 % Glycerin, 50 mM NaCl, 5 mM Imidazol und 0,5 % Triton X-100 (pH 7,2) verwendet. Für die folgenden Elutionsschritte wurde die Imidazolkonzentration schrittweise auf 1 M erhöht. GST-Fusionsproteine wurden stattdessen dreimal mit kaltem PBS gewaschen und mit Glutathion-Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM reduziertes Glutathion, pH 8) eluiert. Für weiterführende Versuche wurden die aufgereinigten Proteine per Dialyse gegen PBS umgepuffert und aliquotiert bei -20 °C gelagert. Die Protein-Konzentration wurde mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kits“ (Pierce) bestimmt.

**2.2.4.4 Pull Down Versuche** Mit dieser Methode ist es möglich, Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* zu detektieren. Hierfür wird rekombinant hergestelltes Protein verwendet, was auch eine Analyse von Deletionsmutanten ermöglicht. Sowohl die Glutathion- als auch die Ni-NTA-Sepharosen wurden für 20 Minuten mit 5 % Milchpulver/PBS bei 4 °C blockiert. Für die Pull Down Experimente wurden 3 µg des zu untersuchenden His-Proteins mit 3 µg GST-Protein versetzt, in 500 µl GST/Ni-Binding Buffer (1 % Triton X-100, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Bovines Serum Albumin (BSA), Proteaseinhibitor und 5 mM Imidazol im Ni-Binding Buffer) verdünnt und mit der Sepharose vermischt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 4 °C auf einem Rotator wurden die Sepharosen gründlich mit Binding Buffer/0,02 % SDS ohne BSA gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Proben in Probenpuffer resuspendiert und das gebundene Protein und sein Interaktionspartner im Western Blot analysiert.



**2.2.4.5 Ultrazentrifugation (UZ)** Die Aufkonzentrierung von Virusüberständen erfolgte per Ultrazentrifugation unter Verwendung des SW32Ti-Rotors in der Beckman Optima-L100K Ultrazentrifuge. Vor der Zentrifugation wurden die Virusüberstände sterilfiltriert und so von Zelltrümmern befreit. Anschließend wurde die Virussuspension in Ultrazentrifugationsröhrchen vorsichtig auf ein 20 % Sucrosekissen geschichtet. Die Viruspartikel wurden für drei Stunden bei 28.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Viruspellets in 100  $\mu$ l 0,05 M HEPES resuspendiert.

**2.2.4.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)** Die SDS-Page wurde verwendet, um Proteine in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufzutrennen [177]. Es wurde ein 5 % Sammelgel und ein 10 bis 15 % Trenngel verwendet. Die Konzentration des Trenngels war dabei abhängig von der zu detektierenden Proteingröße. Je kleiner ein Protein ist, desto höher sollte das Trenngel konzentriert sein. Die Vernetzung der Acrylamid-Monomere wird durch Ammonium-Persulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Sigma) katalysiert. Vor der Auftrennung werden die Proben mit einem gleichen Volumen von 2 x Lämmli-puffer mit 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (BioRad) versetzt und bei 92 °C für fünf Minuten denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 bis 180 V. Als Größenstandard wurde die „PAGERuler Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet. Die Gele wurden anschließend mit dem „Silver Stain Kit“ (BioRad) oder mit Coomassie Colloidal Blau (Sigma) gefärbt beziehungsweise für Western Blots verwendet.

**2.2.4.7 Western Blot** Im Western Blot werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Sigma) oder Nitrocellulose-Membran (BioRad) übertragen und mittels eines Antikörpers anschließend spezifisch detektiert.

Puffer und Reagenzien	Zusammensetzung und Hersteller
Acrylamid	Rotiphorese <sup>®</sup> 10 x SDS-PAGE (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
APS, 10 %	w/v in A. bidest gelöst (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Blockierungspuffer	5 % Milchpulver (Sucofin, TSI GmbH, Zeven, Deutschland) in PBS/1 % Tween

Puffer und Reagenzien	Zusammensetzung und Hersteller
Laufpuffer	2,5 mM Tris, pH 8.3, 19,2 mM glycine, 0.01 % (SDS BioRad, Hercules, California, USA)
Transferpuffer	2,5 mM Tris, 19,2 mM glycine, pH 8.3, 20 % Methanol (BioRad, Hercules, California, USA)
2 x Laemmli Probenpuffer	62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 25 % Glycerol, 0.01 % Bromphenol Blau, 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol (BioRad, Hercules, California, USA)
PBS/Tween 0,1 %	0,1 % Tween 20 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in PBS
Stripping Buffer	50 % PBS, 50 % Wasserstoffperoxid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
TEMED	BioRad, Hercules, California, USA

**Tabelle 21:** Puffer und Reagenzien für SDS-PAGE und Western Blotting

Zunächst wurde das SDS-Gel für 20 Minuten in Transferpuffer äquilibriert (siehe Tabelle 21). Der Proteintransfer erfolgte nach dem Semi-Dry-Blot-Verfahren. Dafür wurde das Proteingel als Sandwich zwischen zwei Filterpapieren (BioRad) auf die Membran aufgelegt. PVDF-Membranen wurden vorher für fünf Minuten mit Methanol aktiviert. Das Blotting erfolgte bei 20 V für 30 Minuten. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurde die Membran anschließend für eine Stunde in Blockierungspuffer geschwenkt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 x für fünf Minuten in PBS/Tween 0,1 % gewaschen und anschließend detektiert oder mit einem sekundären Antikörper inkubiert. Die Detektion des mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten Antikörpers erfolgte mit Hilfe des „Super-Signal West Dura Extended Duration Substrate“ (Pierce). Die Reaktion wurde durch Schwärzung eines Röntgenfilms (X-Ray Retina, Fotochemische Werke Berlin GmbH) sichtbar.

**2.2.4.8 Immunfluoreszenz-Färbung (cLSM)** Die Immunfluoreszenz ermöglicht es, das entsprechende Antigen durch fluoreszenzmarkierte Antikörper in der Zelle sichtbar zu machen. Dafür wurden die Zellen in ChamberSlides kultiviert und transfiziert. Nach 24 bis 48 Stunden wurden die Zellen mit 800  $\mu$ l 2 % Paraformaldehyd für 30 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Für intrazelluläre Antikörpermarkierungen wurden die Zellen mit 800  $\mu$ l 0,5 % Tri-

ton X-100 permeabilisiert. Unspezifischen Bindungen wurden mit 1 ml 1 % Marvel für 15 bis 30 Minuten blockiert (siehe Tabelle 17). Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 60 Minuten mit dem primären Antikörper bei 37 °C inkubiert. War dieser Antikörper bereits Fluoreszenz-markiert, fanden alle Arbeiten lichtgeschützt statt. Es folgten erneut drei Waschschrte mit PBS, bevor die Zellen mit dem Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann wieder gründlich gewaschen wurden. Die Zellen wurden nun mit Mowiol luftblasenfrei mit Deckgläschen eingebettet. Waren Kernfärbungen erforderlich, wurde dem Mowiol DAPI in einer 1:40.000 Verdünnung zugesetzt. Die Präparate wurden bei 4 °C dunkel gelagert und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM-510 ausgewertet. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte, gefärbte Zellen.

Für die Stressversuche wurden die Zellen eine Stunde vor der Fixierung mit 0,5 mM Natriumarsenit für eine Stunde bei 37 °C gestresst. Anschließend wurden die Zellen wie die ungestressten Zellen behandelt.

**2.2.4.9 p24 Gag-ELISA** Für die Quantifizierung von pseudotypisierten Virusüberständen wurde der p24 Gag-ELISA verwendet, mit dessen Hilfe das SIV Gag nachgewiesen werden kann. Am Vortag wurden ELISA-Platten (BD) mit dem monoklonalen  $\alpha$ -SIV Gag-Antikörper AG3.0 MP (hergestellt von Norley *et al.*) beschichtet. Am Tag der Messung wurden die Platten mit 2 % Milchpulver in PBS bei 37 °C für eine Stunde blockiert. Die zu untersuchenden Überstände wurden mit 0,2 % Tween für 10 Minuten inaktiviert und anschließend auf die ELISA-Platte aufgetragen. Als Positivkontrolle diente SIVmac Antigen (Norley *et al.*). Jede Probe wurde in mehrfachen Verdünnungsschritten mit PBS/2 % Milchpulver/0,1 % Tween (PMT) aufgetragen. Nach einer Inkubation von 60 Minuten bei 37 °C wurden die Platten dreimal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen und mit HIV-Pool-Plasma, 1:400 in PMT verdünnt, versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation und gründlichen Waschschrten, wurden die Proben für 30 Minuten bei 37 °C mit  $\alpha$ -Human-IgG (verdünnt 1:1000 in PMT, Sigma) inkubiert. Es folgten erneute Waschschrte und die Detektion des Peroxidase-markierten Antikörpers. Dafür wurden OPD-Tabletten (Sigma) entsprechend der Herstellerangaben in PBS pH 6,0

gelöst und die Reaktion mit Wasserstoffperoxid gestartet. Das Nachweisreagenz wurde in definierten Zeitabständen zu den Proben gegeben. Sobald die Positivkontrollen quittengelb gefärbt waren, wurde die Nachweisreaktion durch Zugabe von schwefliger Säure gestoppt und in einem ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 492/570 nm ausgelesen. Als Negativkontrolle dienten Überstände von nichttransfizierten Zellen.

**2.2.4.10 Cavid** Zur Bestimmung und Quantifizierung der Virusexpression wurde der „HS-Mg RT Activity Kit“ (Cavid) verwendet. Dafür wurden exakt die Vorgaben des Herstellers eingehalten.

### 3 Ergebnisse

HERV-K113 zählt zu den komplexen Retroviren, da es neben der einfach gespleißten *env*-RNA auch eine zweifach gespleißte *rec*-RNA kodiert. Diese Arbeit beschäftigt sich mit genau diesen beiden Proteinen. Obwohl die N-terminalen 87 Aminosäuren identisch sind, könnte die Funktion beider Proteine im viralen Replikationszyklus nicht unterschiedlicher sein. Das Rec-Protein ist essentiell für die frühen Phasen der Replikation und gewährleistet das richtige Verhältnis von translatierter und genomischer RNA. Das Env-Protein hingegen ist ein Protein der späten Phase und wird erst zum Ende des Replikationszyklus in die Viruspartikel eingebaut. In der Tumorgenese hingegen scheinen beide Proteine eine Rolle zu spielen.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, das Hüllprotein funktionell zu charakterisieren. Für das Rec-Protein sollten Interaktionspartner gefunden werden, die einerseits Rec in seiner Funktion als nukleozytoplasmatisches RNA-Transportprotein unterstützen oder mit der Krebsentstehung in Verbindung gesetzt werden können.

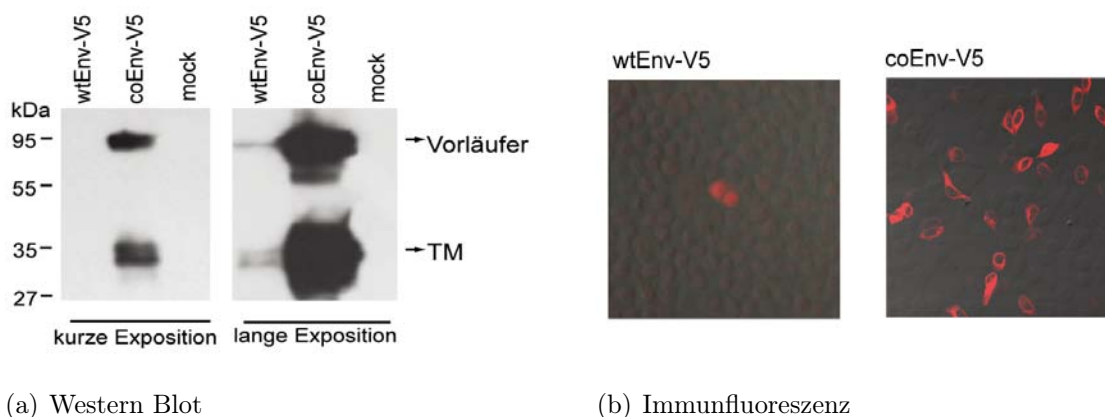
#### 3.1 Funktionelle Untersuchungen zum Hüllprotein

Die bisherige molekulare Charakterisierung des Hüllproteins von HERV-K113 gestaltete sich sehr schwierig. Eines der Hauptprobleme bei der Untersuchung des Hüllproteins ist die sehr niedrige Expressionsrate - selbst von CMV-Promotorkonstrukten. Zum anderen existierten bis vor kurzem noch keinerlei spezifische Antikörper gegen das HERV-K113 Hüllprotein, so dass man beim Nachweis auf Tags, die wiederum die Funktionalität des Hüllproteins stören können, angewiesen war. Für das HERV-K113 Env konnte bis dato keinerlei Funktionalität gezeigt werden. Daher wurde eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um die Expression und Funktionalität des Glykoproteins zu erhöhen bzw. wiederherzustellen. Zusätzlich ist seit kurzem ein Antikörper erhältlich, der gegen die Ektodomäne der TM-Untereinheit gerichtet ist.

### 3.1.1 Codonoptimierung des *env*-Gens

Das Hüllprotein der HERV-K(HML-2)-Viren wird von einem einfach gespleißten Transkript abgelesen. Zusätzlich besitzt das Transkript jedoch eine weitere Spleißstelle, die bewirkt, dass große Teile des Env-Transkripts entfernt werden und stattdessen das nukleozytoplasmatische Transportprotein Rec abgelesen wird (siehe Abbildung 7). Dieses zusätzliche Spleißereignis, der niedrige GC-Gehalt von 42 % und die Verwendung seltener Codons sind die wahrscheinlichsten Gründe dafür, dass das HERV-K(HML-2) Hüllprotein von CMV-Promotorkonstrukten nur sehr schwach exprimiert wird und deshalb nur sehr schwer funktionell zu charakterisieren ist [13].

Um dieser Limitation entgegenzuwirken, wurde die Nukleotidsequenz so optimiert, dass die Codon Usage der von Säugerzellen entspricht. Ohne dass es zu einem Aminosäure-Austausch kam, wurden 71 % der Codons verändert und der GC-Gehalt so auf 63 % angehoben. Durch die Codonoptimierung wurde gleichzeitig auch die zusätzliche Rec-Splice Stelle im *env*-Gen entfernt. Das von der Firma Geneart synthetisierte *coEnv*-Gen wurde über eine EcoRI/NotI-Klonierung in den pcDNA3-V5 Vektor gebracht und so mit einem C-terminalen V5-Tag versehen. Durch den V5-Tag wird das Molekulargewicht um 1,7 kDa erhöht. Diese Optimierung hatte drastische Effekte auf die Proteinexpression. Coimmunpräzipitationsexperimente mit Lysaten von HEK 293T-Zellen, die mit dem pcDNAwtEnv-V5 bzw. pcDNAcoEnv-V5 Konstrukt transfiziert wurden, zeigten, dass das coEnv 50-mal stärker exprimiert wird als das wtEnv (siehe Abbildung 12a). In den Western Blots konnten spezifische Banden zwischen 75 und 95 kDa sowie zwischen 32 und 38 kDa detektiert werden. Diese Größen entsprechen denen der postulierten Molekulargewichte für das glykosylierte Vorläuferprotein und für die transmembrane (TM) Untereinheit [13]. Auch in Immunfluoreszenzexperimenten mit HEK 293T-Zellen konnte die enorme Expressionsteigerung beobachtet werden (siehe Abbildung 12b). In Zellen, die mit dem wtEnv transfiziert wurden, konnte nur sehr selten und dann auch nur sehr schwach eine Env-Expression detektiert werden. Im Vergleich dazu, war die Zahl der coEnv-exprimierenden Zellen deutlich höher und die Expression selbst deutlich stärker. Dieses Ergebnis konnte sowohl mit einem  $\alpha$ V5-



**Abbildung 12: Die Codonoptimierung des HERV-K113 Hüllproteins steigert die Expressionsrate um den Faktor 50:** (a) HEK 293T-Zellen wurden mit wtEnv-V5 oder coEnv-V5 transfiziert. Mit Hilfe einer  $\alpha$ V5-Sepharose wurde V5-markiertes Hüllprotein aufkonzentriert und anschließend im Western Blot aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels eines  $\alpha$ V5-Antikörpers. (b) HEK 293T-Zellen wurden entweder mit wtEnv-V5 oder coEnv-V5 transfiziert und anschließend mittels eines  $\alpha$ V5-Cy3-Antikörpers im cLSM detektiert.

Antikörper als auch mit einem spezifischen Antikörper gegen das TM des HERV-K113-Hüllproteins ( $\alpha$ TM-Antikörper) festgestellt werden. Als Negativkontrolle wurden in beiden Experimenten untransfizierte HEK 293T-Zellen verwendet.

### 3.1.2 Rekonstitution der ursprünglichen HERV-K113 Env-Proteinsequenz

Verschiedene Gruppen berichteten bereits, dass das HERV-K113 Hüllprotein nicht in virale Partikel eingebaut wird [13], [84]. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in postinsertionalen Mutationen, die das Provirus im Laufe der Zeit nach der Integration in das humane Genom erlangt hat. Um festzustellen, welche Aminosäureaustausche stattgefunden haben, wurden die Aminosäure-Sequenz des HERV-K113 Env (AY037928) mit zehn hochkonservierten, humanspezifischen HERV-K(HML-2) Env-Sequenzen (HERV-K101 (AF164609), K102 (AF164610), K104 (AC116309), K107 (AF164613), K108 (AC072054), K109 (AC055116), K115 (AY037929), Y178333, AP000776 und AC025420) verglichen. Um zwischen authentischen Polymorphismen und tatsächlichen postinsertionalen Austauschen unterscheiden zu können, wurde die Annahme aufgestellt, dass nichtsynonyme postinsertionale Mutationen vorliegen, wenn keine oder nur eine der

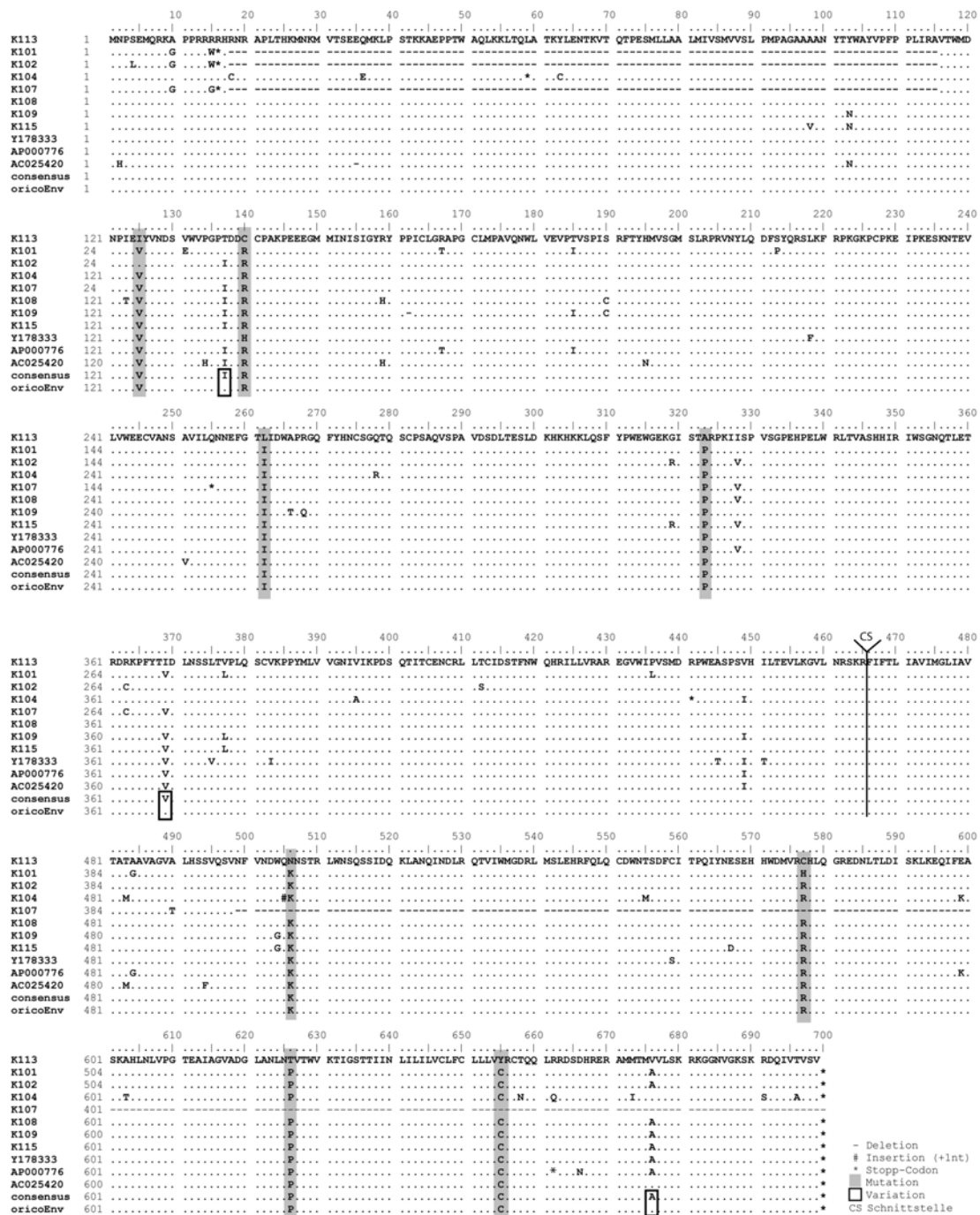


Abbildung 13: Ermittlung der Env-Sequenz zum Zeitpunkt der Intergration (oricoEnv):

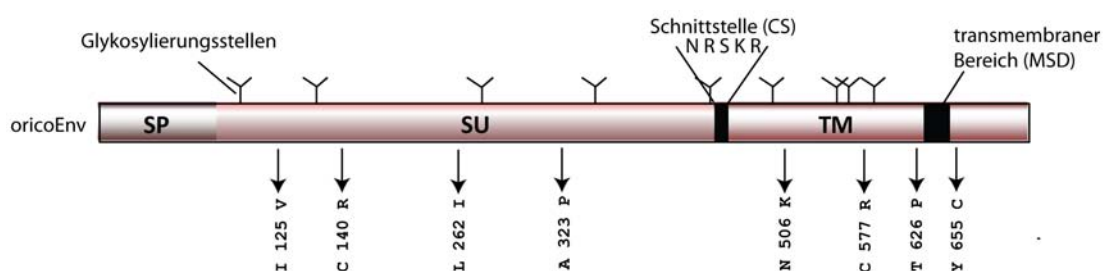
Zehn hochkonservierte, humanspezifische Env-Sequenzen (HERV-K101, K102, K104, K107, K108, K109, K115, Y178333, AP000776 und AC025420) wurden auf Aminosäure-Ebene mit dem K113 Env verglichen. Zusätzlich sind die Consensussequenz und die neu generierte oricoEnv-Sequenz dargestellt. Postinsertionale Mutationen, die korrigiert wurden, sind grau hinterlegt. Unterschiede, die HERV-K113 mit mindestens zwei anderen Proviren teilt, wurden nicht verändert und sind schwarz eingerahmt.



proviralen Env-Sequenzen mit der HERV-K113 Env-Sequenz übereinstimmen. Andererseits liegt ein Polymorphismus vor, wenn mindestens zwei weitere Env-Sequenzen an der selben Aminosäureposition wie HERV-K113 von der Consensus-Sequenz abweichen.

Wie in Abbildung 13 dargestellt gibt es drei dieser variablen Positionen (T137, I369 und V676), die unverändert blieben. Insgesamt wurden auf Aminosäureebene acht putative postinsertionale Substitutionen identifiziert. Davon liegen vier innerhalb des Oberflächenglykoproteins (SU) und vier innerhalb der transmembranen Untereinheit (TM). Mit Hilfe von gezielten Mutagenesen wurden diese acht Aminosäuren in der pcDNAcoEnv-V5 Plasmidsequenz verändert, wobei die Consensussequenz als Vorlage diente. Das dabei entstandene Konstrukt pcDNAoricoEnv-V5 repräsentiert eine V5-markierte Version der putativ ursprünglichen HERV-K113 Hüllproteinsequenz zum Zeitpunkt der Integration in den menschlichen Vorfahren. Eine schematische Übersicht des oricoEnvs mit allen gesetzten Rück-Mutationen ist in Abbildung 14 dargestellt.

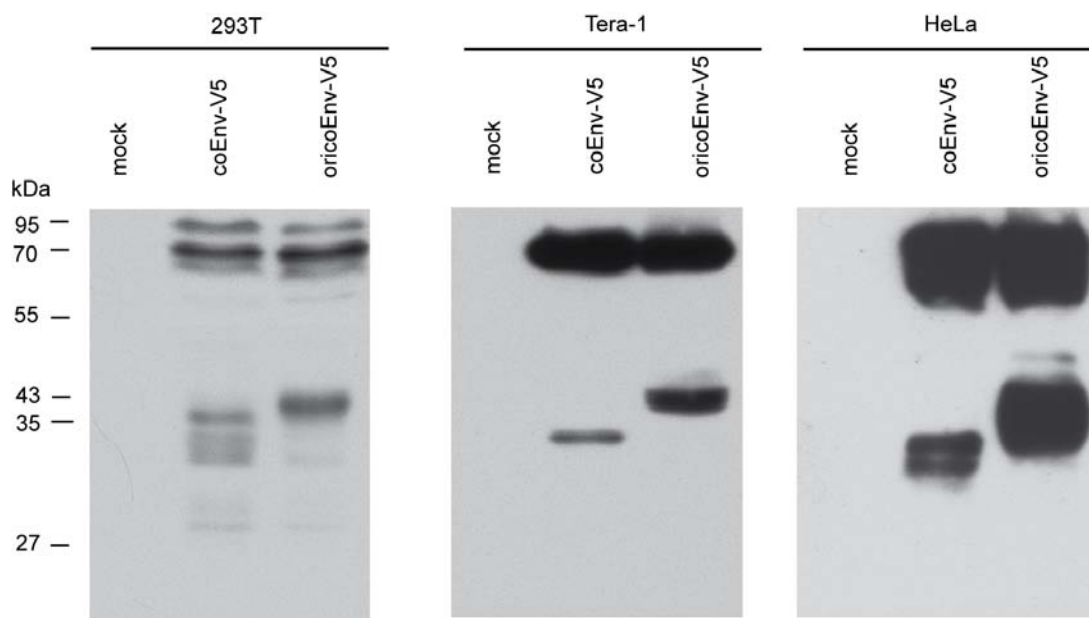
Mit Hilfe von Western Blots wurde zunächst die Expression des heutigen coEnvs mit der des originalen oricoEnvs verglichen. HEK 293T, Tera-1 und HeLa-Zellen wurden jeweils mit pcDNAcoEnv-V5, pcDNAoricoEnv-V5 oder pcDNA3-Leervektor transfiziert (siehe Abbildung 15). Obwohl die Expression beider Konstrukte vergleichbar ist,



**Abbildung 14: Schematische Darstellung von oricoEnv:** die potentiellen Glykosylierungsstellen, die Cleavage Site (CS) und die Membrane Spanning Domäne (MSD) sind dargestellt. Zusätzlich sind die Aminosäure-Austausche zur Generierung des oricoEnvs vermerkt.

sind Unterschiede in der Prozessierung der TM Untereinheit offensichtlich. Das Verhältnis von Vorläufer zu TM variiert von Lysat zu Lysat. OricoEnv wird jedoch in allen drei Zelllinien in allen Experimenten effizienter als das coEnv geschnitten. Die TM-Untereinheit des oricoEnv-V5 ist in allen getesteten Zelllinien bei 43 kDa detek-

tierbar. Im Gegensatz dazu wird das coEnv-V5 sehr ineffizient zu einem 35 kDa-Protein



**Abbildung 15: oricoEnv und coEnv zeigen Unterschiede in der Env-Prozessierung:**

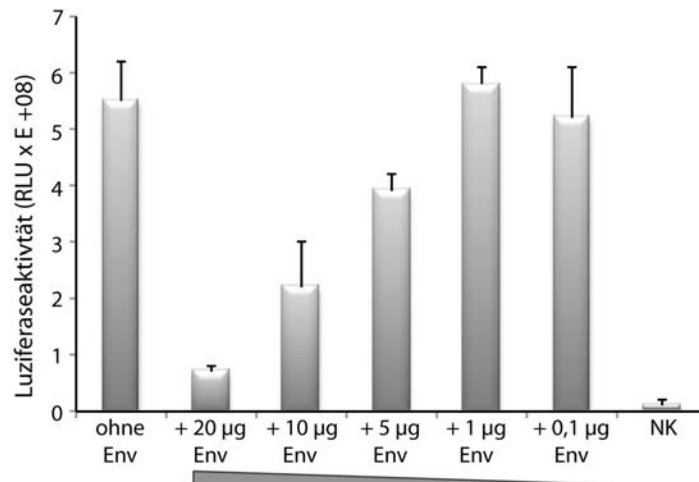
HEK 293T-, Tera-1- und HeLa-Zellen wurden mit coEnv und oricoEnv transfiziert. Die Lysate wurden im Western Blot aufgetrennt. Als Negativ-Kontrolle dienten untransfizierte Zellen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines  $\alpha$ V5-Antikörpers.

in Tera-1 Zellen und zu einer undeutlichen Doublette von circa 33 bis 35 kDa in HEK 293T und HeLa-Zellen prozessiert.

### 3.1.3 Toxizitätsbestimmung

Für verschiedene Hüllproteine ist bereits beschrieben worden, dass sie zytotoxische Effekte auf die exprimierenden Zellen haben können. Um eine optimale Expression unter möglichst geringen zytotoxischen Effekten gewährleisten zu können, wurden HEK 293T Zellen mit 5  $\mu$ g Luziferaseexpressionsvektor und steigenden Mengen pcDNAoricoEnv (bis 20  $\mu$ g) transfiziert. Die transfizierte Gesamt-DNA-Menge von 25  $\mu$ g wurde durch Zugabe von pcDNA3 Leervektor ausgeglichen.

Obwohl keine signifikante Zellsterblichkeit beobachtbar war, ist ein starker Rückgang der Luziferaseaktivität um Faktor 10 bei Zugabe von 20  $\mu$ g oricoEnv messbar (siehe Abbildung 16). Eine hohe oricoEnv Expression scheint daher toxische Effekte auf die



**Abbildung 16: Das HERV-K113 oricoEnv wirkt in hohen Konzentrationen zytotoxisch:**

HEK 293T wurden mit dem Luziferaseexpressionsvektor pGL-SV40 (Promega) und verschiedenen Konzentrationen von pcDNA3-oricoEnv transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität ermittelt. Je niedriger die Luziferaseaktivität ist, desto größer sind die zytotoxischen Effekte des HERV-K113 Hüllproteins. RLU = „relative light units“.

Zellen zu haben. Da die Toxizität bei Zugabe von weniger als 1 µg Expressionsvektor keine Rolle zu spielen scheint, wurden in nachfolgenden Pseudotypisierungsexperimenten 0,5 µg der Env-Plasmide eingesetzt.

### 3.1.4 Einbau des rekonstituierten Hüllproteins in lentivirale Partikel

Um die Funktionsfähigkeit des korrigierten Hüllproteins zu testen, wurden Versuche durchgeführt, die überprüfen sollten, ob das oricoEnv in retrovirale Viruspartikel eingebaut werden kann. Als geeignete Reporter-Vektoren dienten dabei lentivirale SHIV-Vektoren. Die verwendeten SHIV-Konstrukte enthalten neben einem stark deletierten SHIV-Genom auch ein Luziferasegen. Bei den entstehenden Partikeln handelt es sich um „Single Round-Viren“, die zwar in der Lage sind zu infizieren und zu integrieren, jedoch keine replikationskompetenten SHIV-Partikel bilden können [8].

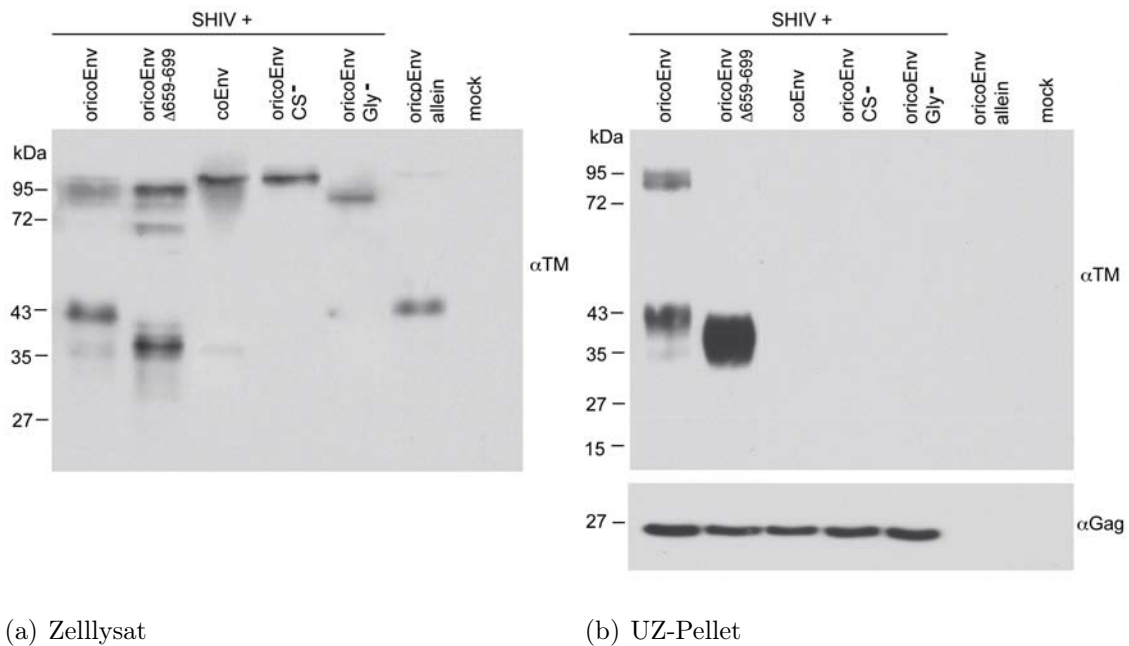
Zusätzlich zum oricoEnv wurden modifizierte Hüllproteine auf ihren Einbau getestet. Dazu gehören das oricoEnvCS-, dessen Schnittstelle nicht mehr funktionsfähig ist und die glykosylierungsdefiziente Mutante oricoEnvGly-. Beide Konstrukte wurden von Philipp Kramer aus dem RKI zur Verfügung gestellt [133]. In vorangegangenen De-

glykosylierungsstudien ist durch ihn bereits gezeigt worden, dass eine Glykosylierung essentiell für die Prozessierung ist und die Unterschiede in der Prozessierung von coEnv und oricoEnv auf eine fehlerhafte Glykosylierung des coEnv zurückzuführen ist [133]. Verschiedene Gruppen berichteten bereits, dass eine C-terminale Kürzung der zytoplasmatischen Domäne den Einbau retroviraler Hüllproteine in die Viruspartikel und/oder deren fusogene Eigenschaften beeinflussen kann [54], [58], [74]. Aus diesem Grund wur-



**Abbildung 17: Verkürzung des oricoEnv**

de die C-terminal verkürzte Mutanten oricoEnv $\Delta$ 659-699 verwendet (siehe Abbildung 17). Dieses Konstrukt ist von Philipp Kramer durch Einfügen eines Stopp-Codons in die *oricoenv*-Sequenz hergestellt worden [133]. Der Nachweis des Hüllproteins erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Antikörpers, der gegen die Ektodomäne der TM Untereinheit gerichtet ist. Wie in Abbildung 18a zu erkennen ist, ist die Expressionsstärke aller Proteine in HEK 293T Zellen ungefähr gleich. Der Unterschied in der Größe der TM Untereinheit ist bei dem Konstrukt oricoEnv $\Delta$ 659-699 gut zu erkennen. Die Kontrollkonstrukte oricoEnvCS- und oricoEnvGly- zeigen wie erwartet keinerlei prozessierte Banden. Um den Einbau der Hüllproteine in die Virionen untersuchen zu können, wurden die Überstände abgenommen, vorsichtig von Zellresten befreit und über ein 20 %iges Sucrose-Kissen per Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Die Pellets wurden im Western Blot aufgetrennt und der Grad des Env-Einbaus mit Hilfe des spezifischen TM-Antikörpers detektiert (Abbildung 18b). Weder für das coEnv, noch für die glykosylierungs- bzw. Cleavage-defizienten oricoEnv Mutanten ist ein Einbau detektierbar. Andererseits wird die oricoEnv $\Delta$ 659-699 Mutante fünfmal besser in die Partikel eingebaut als das Ursprungskonstrukt des oricoEnvs. Besonders auffällig ist, dass eine fast vollständige Trunkierung der zytoplasmatischen Domäne dazu führt, dass oricoEnv $\Delta$ 659-699 ausschließlich als vollständig prozessiertes TM eingebaut wird. Zur Kontrolle wurden die Überstände mittels eines monoklonalen  $\alpha$ SIV Gag-Antikörpers auf gleichmäßige Gag-Mengen kontrolliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Trunkie-



(a) Zelllysate (b) UZ-Pellet

**Abbildung 18: oricoEnv und die C-terminale Verkürzungsmutante oricoEnv $\Delta$ 659-699 werden in lentivirale Vektoren eingebaut:** HEK 293T-Zellen wurden mit einem SHIV-Luziferase-Reporterkonstrukt, HIV-1 Rev und verschiedenen Hüllprotein-Mutanten von HERV-K113 (oricoEnv, oricoEnv $\Delta$ 659-699, coEnv, oricoEnvCS- und oricoEnvGly-) transfiziert. Die virushaltigen Überstände wurden per Ultrazentrifugation aufkonzentriert (b) und zusammen mit den Zelllysaten (a) im Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienen Überstände von Zellen, die lediglich mit dem oricoEnv transfiziert wurden. Für die Detektion wurde ein  $\alpha$ TM-Antikörper bzw. ein SIV Gag Antikörper verwendet.

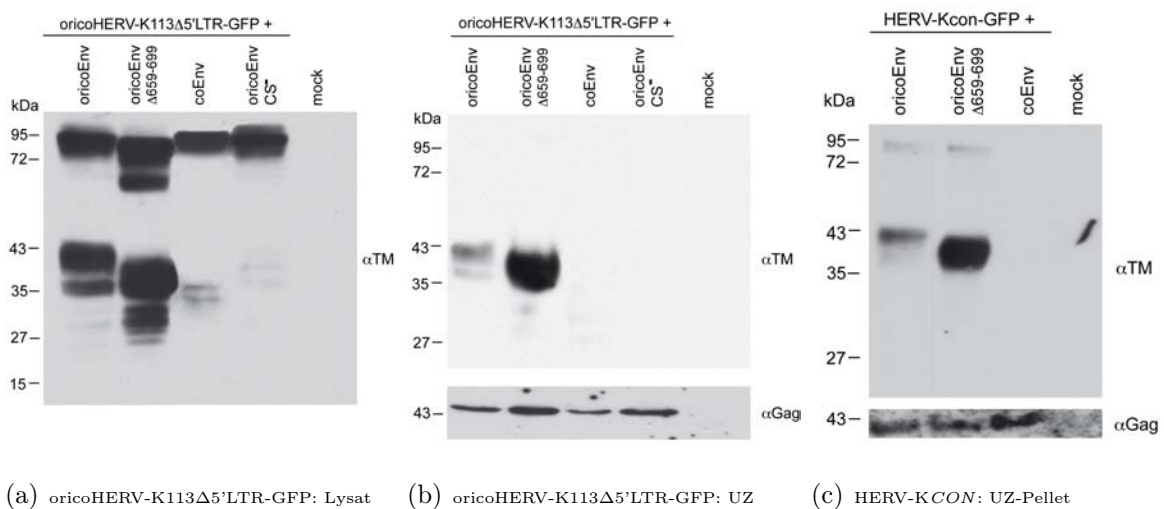
rung der zytoplasmatischen Domäne des HERV-K Hüllproteins sowohl die Prozessierung als auch den Einbau in Viruspartikel beeinflusst.

### 3.1.5 Einbau des Hüllproteins in HERV-K113-Partikel

Aufgrund der sehr niedrigen Expressionsrate von HERV-K113 ist die Verwendung eines HERV-K-basierenden Reportersystems zur Überprüfung des Einbaus in HERV-K-Partikel nahezu ungeeignet. Eine Alternative dazu stellt ein codonoptimiertes HERV-K113-Virusexpressionskonstrukt dar, dessen 5'LTR gegen einen CMV-Promotor und dessen *env*-Sequenz gegen ein *egfp*-Gen ausgetauscht wurden: CMVoricoHERV-K113-GFP. Dieses Konstrukt weist im Vergleich zur nicht-codonoptimierten Virusvariante eine erheblich höhere Proteinexpression auf, ist aber aufgrund der Zerstörung von regula-

torischen Sequenzen nicht replikationsfähig. Zusammen mit 5  $\mu\text{g}$  HERV-K113 oricoRec (siehe Abschnitt 3.2.3) und 0,5  $\mu\text{g}$  Hüllprotein (oricoEnv, oricoEnv $\Delta$ 659-699, coEnv oder oricoEnvCS-) wurde CMVoricoHERV-K113-GFP in HEK 293T-Zellen transfiziert. Die virushaltigen Überstände wurden abgenommen, über ein 20 %iges Sucrose-Kissen ultrazentrifugiert und im Western Blot mittels eines HERV-K-spezifischen  $\alpha\text{TM}$ - und  $\alpha\text{Gag}$ -Antikörpers überprüft.

Der Einbau der Hüllproteine in diese HERV-K-Partikel ist in Abbildung 19b dargestellt. Sowohl die Effizienz des Einbaus als auch der Grad der Prozessierung der einzelnen



**Abbildung 19: Der Einbau von oricoEnv in HERV-K-Partikel wird durch die zytoplasmatische Domäne beeinflusst:** (a) HEK 293T-Zellen wurden mit dem codonoptimierten CMVoricoHERV-K113-GFP, oricoRec und verschiedenen oricoEnv-Konstrukten (oricoEnv, oricoEnv $\Delta$ 659-699, coEnv oder oricoEnvCS-) transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und im Western Blot aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines  $\alpha\text{TM}$ -Antikörpers. (b) UZ-Pellets der Überstände: 48 Stunden nach Transfektion wurden die Überstände von Zellresten befreit und über ein 20 %iges Sucrose-Kissen ultrazentrifugiert. Im Western Blot wurden sowohl die Hüllproteine als auch das Capsid (Gag) nachgewiesen. (c) UZ-Pellet von HERV-KCON-GFP pseudotypisiert mit oricoEnv, oricoEnv $\Delta$ 659-699 und coEnv.

Hüllproteine ähneln dabei sehr stark den Beobachtungen des Einbaus in SHIV-Partikel. OricoEnv $\Delta$ 659-699 wird 10-mal besser eingebaut. Weder coEnv noch oricoEnvCS- sind auf den HERV-K113-Partikeln detektierbar.

Aufgrund der Codonoptimierung des CMVoricoHERV-K113-GFP könnten regulatori-

sche Sequenzen in der genomischen RNA zerstört worden sein, die für die Viruspartikelbildung und den Einbau der Hüllproteine eine wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund wurde der Einbau einzelner Hüllproteine (oricoEnv, oricoEnv $\Delta$ 659-699 und coEnv) nochmals mit Hilfe des HERV-KCON-GFP-Viruskonstrukts überprüft. HERV-KCON ist ein artifizielles HERV-K, welches aus einer Consensussequenz von zehn HERV-K(HML-2)-Proviren generiert wurde [186]. Wie bereits erwähnt, werden die nicht-codonoptimierten HERV-K-Viren und damit auch HERV-KCON nur sehr schwach exprimiert. Um ausreichend Virusmaterial zu erhalten, wurden pro Hüllprotein (oricoEnv, oricoEnv $\Delta$ 659-699, coEnv und untransfizierte Zellen) 200 ml Virusüberstand hergestellt, steril filtriert und anschließend ultrazentrifugiert. Die Pellets eines Hüllproteins wurden anschließend vereint und im Western Blot analysiert (siehe Abbildung 19c).

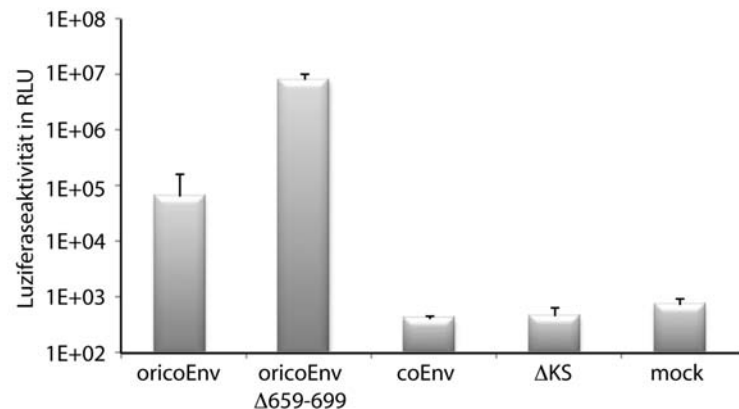
Durch diesen Versuch konnten die Ergebnisse, die durch die Pseudotypisierung von SHIV- und oricoHERV-K113-Partikel erhalten wurden, bestätigt werden. OricoEnv und oricoEnv $\Delta$ 659-699, aber nicht coEnv werden in die Viruspartikel eingebaut. Dabei erfolgt der Einbau der oricoEnv-Deletionsmutante mit der kurzen zytoplasmatischen Domäne zehnmal effektiver als mit oricoEnv.

### **3.1.6 Untersuchung der infektiösen Eigenschaften des HERV-K113 Hüllproteins**

Ob die eingebauten Hüllproteine auch vollständig funktionell sind, kann nur durch Infektionsversuche untersucht werden. Die Infektiosität wurde dabei mit Hilfe der pseudotypisierten SHIV-Luziferase-Partikel ermittelt. HEK 293T-Zellen wurden mit einem SHIV-Luziferase-Reporterkonstrukt, Rev und dem entsprechenden Env-Konstrukt transfiziert. Die Überstände wurden von Zellresten befreit und über einen quantitativen p24Gag-ELISA normalisiert. Anschließend wurden CrFK-Zellen mit diesen Überständen für 48 Stunden inkubiert und die Luziferaseaktivität der interagierten Reporterviren gemessen. Für CrFK-Zellen wurde bereits beschrieben, dass sie durch HERV-K(HML-2) infizierbar sind [186]. Als Negativkontrolle wurde ein nichtfunktio-

nelles HIV Hüllprotein ( $\Delta$ KS) eingesetzt.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, konnte für das coEnv keinerlei Infektiosität gemessen werden. Für das rekonstituierte oricoEnv hingegen konnte mit einer Infektionsrate, die



**Abbildung 20: oricoEnv und die C-terminale Verkürzungsmutante oricoEnv $\Delta$ 659-699 vermitteln die Infektion in CrFK-Zellen:** HEK 293T-Zellen wurden mit einem SHIV-Luziferase-Reporterkonstrukt, HIV-1 Rev und verschiedenen Hüllprotein-Mutanten von HERV-K113 (oricoEnv, oricoEnv $\Delta$ 659-699 und coEnv) transfiziert. Die virushaltigen Überstände wurden abgenommen, vorsichtig von Zellresten befreit, im p24Gag-ELISA normalisiert und auf naive CrFK-Zellen gegeben. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und auf Luziferaseaktivität durch integrierte SHIV-Proviren untersucht. RLU = „relative light units“.

zwei Zehnerpotenzen über dem Hintergrund liegt, eine signifikante Infektionsrate gezeigt werden. Pseudotypen mit dem oricoEnv $\Delta$ 659-699 infizierten sogar 100-mal besser als das Volllängen-oricoEnv (Abbildung 20).

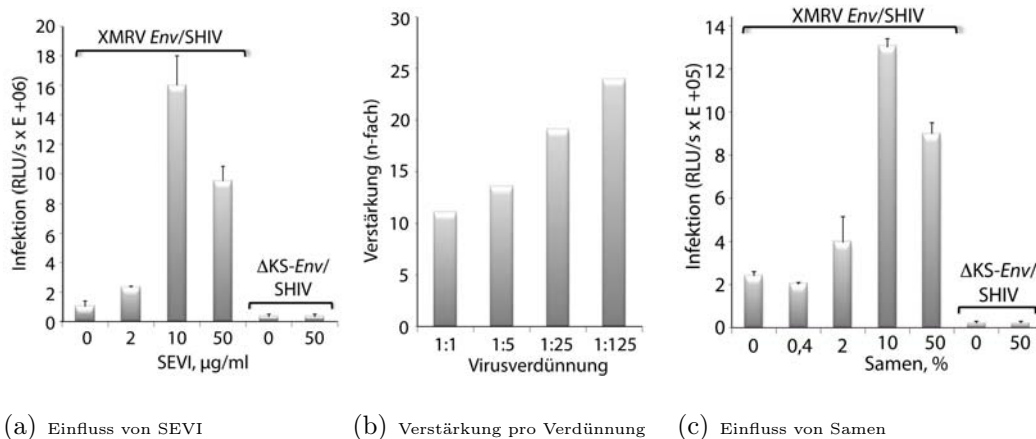
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das vermutlich ursprüngliche provirale HERV-K113 Hüllprotein im Gegensatz zu seiner heutigen Version effizient in Viruspartikel eingebaut wird und fusogene Eigenschaften besitzt. Eine Verkürzung um 42 Aminosäuren führt sowohl zu einem verbesserten Einbau in Viruspartikel als auch zu einer sehr starken Erhöhung des Virus-Eintritts in die Zelle.

### 3.1.7 Verstärkung der Infektionsrate durch SEVI

Aufgrund der sehr niedrigen Expression von HERV-K113 war es bisher unmöglich, dessen Infektiosität bzw. Replikationsfähigkeit direkt nachzuweisen. Daher wurde untersucht, ob die Infektionseffizienz durch Zugabe von Substanzen gesteigert werden



kann. Münch *et al.* publizierten 2007, dass in der Samenflüssigkeit bestimmte Fragmente der „Prostata Sauren Phosphatase“ (PAP) zu amyloiden Fibrillen aggregieren können [237]. Diese Fibrillen werden als „samen-derived enhancer of viral infection“



**Abbildung 21: SEVI und Samen verstärken den XMRV Env vermittelten Virus-Eintritt:**

(a) Verstärkung der spezifischen Infektion durch ein mit XMRV Env-pseudotypisiertes Lentivirus (XMRV Env/SHIV) in HEK 293T-Zellen durch SEVI. Die Verstärkung ist abhängig von der SEVI-Konzentration. (b) Verstärkung der Infektionsraten durch Zugabe von 10 µg/ml SEVI auf unverdünntes bzw. seriell fünffach verdünntes XMRV Env/SHIV. Als Normalisierungswert wurde die Infektionsrate mit der selben Virusverdünnung ohne SEVI bestimmt. (c) Verstärkung der Infektiosität von XMRV Env/SHIV durch verschiedene Samen-Konzentrationen. Virusüberstände wurden mit der entsprechenden Menge an Samen für 15 Minuten vorinkubiert, nochmals 15-fach verdünnt und anschließend zu den Zellen gegeben. Die Daten umfassen die Durchschnittswerte und Standardabweichungen von sechsfach Bestimmungen am Tag 2 nach der Infektion. RLU = „relative light units“.

(SEVI) bezeichnet. Für HIV konnte gezeigt werden, dass SEVI die Bindung der Virionen an die Zielzellen verstärkt und damit deren Infektiosität erheblich steigert [237]. Dieser verstärkende Effekt beruht auf der intrinsischen positiven Ladung (pI=10,21) von SEVI. Es fungiert als polykationische Brücke, die die negative Abstoßung zwischen den membranumhüllten Virionen und der Zellmembran neutralisiert [273].

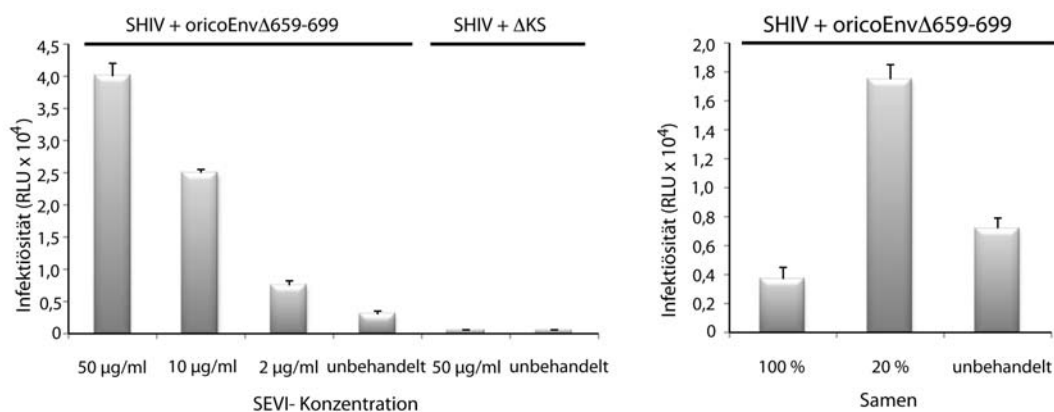
Zunächst wurde der infektionssteigernde Effekt von SEVI auf ein Hüllprotein eines nachweislich replikationskompetenten Virus untersucht. Dafür wurde die codonoptimierte Version des „xenotropic murine leukemia virus-related virus“ (XMRV) Envs

verwendet. XMRV wurde erst kürzlich in humanen Prostatageweben gefunden und ist das erste  $\gamma$ -Retrovirus, das in der Lage ist, auch den Menschen zu infizieren [315].

Für den Test wurden mit XMRV-Env pseudotypisierte SHIV-Luziferase-Reporterviren (XMRV *Env*/SHIV) in HEK 293T-Zellen generiert. Die Überstände wurden von kontaminierenden Zellresten befreit und 15 Minuten mit 0,5 bis 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SEVI vorinkubiert. Die SEVI-Virus-Suspension wurde anschließend auf naive HEK 293T-Zellen gegeben. Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden später lysiert und die Infektionsraten in einem Luziferase-Assay festgestellt. Um eine eventuelle unspezifische Virusaufnahme messen zu können, wurden zusätzliche SHIV-Partikel eingesetzt, die das nicht funktionelle HIV-1 Env  $\Delta\text{KS}$  tragen.

In Abbildung 21a ist zu erkennen, dass SEVI dosisabhängig und sehr effizient die Infektionsrate von XMRV *Env*/SHIV steigert (bis Faktor 25). Im Gegensatz dazu bleibt HIV-1 $\Delta\text{KS}$ /SHIV weiterhin nicht-infektiös. Das zeigt, dass SEVI die Effizienz des Viruseintritts durch das XMRV-Hüllprotein erhöht. Dabei ist der verstärkende Effekt invers korrelierend zur viralen Dosis (Abbildung 21b). Je niedriger die Viruskonzentration ist, desto stärker ist Infektions-steigernde Effekt. Aufgrund der Detektion von XMRV in epithelialen Geweben, die an Prostatatumore angrenzen, liegt die Vermutung nahe, dass XMRV auch sexuell übertragen werden könnte. Daher wurde der Effekt von Samenflüssigkeit auf die Infektiosität getestet. Die Abbildung 21c zeigt, dass eine Vorinkubation der Viren mit 10 %iger Samenflüssigkeit zu einer fünffachen Erhöhung der XMRV *Env*/SHIV-Infektiosität führte. Höhere Konzentrationen von Samenflüssigkeit bewirkten aufgrund zytotoxischer Effekte niedrigere Infektionsraten.

In einem weiteren Experiment wurde der SEVI-Effekt auf das HERV-K113 Hüllprotein getestet. Aufgrund seiner deutlich effektiveren Infektiosität gegenüber dem Voll-längenkonstrukt wurde das oricoEnv $\Delta\text{659-699}$  verwendet. Auch für das HERV-K113 oricoEnv $\Delta\text{659-699}$  kann eine erhöhte Infektiosität unter SEVI-Zugabe gemessen werden (siehe Abbildung 22). Abhängig von der SEVI-Konzentration infizieren Pseudotypen mit dem HERV-K113 Hüllprotein HEK 293T-Zellen bis zu zehnmal besser, wenn sie zuvor mit SEVI vorinkubiert wurden. Dieser Effekt ist Env-spezifisch, wie die Kontrollen mit dem nicht-funktionellen HIV-1  $\Delta\text{KS}$ -Env zeigen.



(a) Einfluss von SEVI auf HERV-K113 oricoEnvΔ659-699      (b) Einfluss von Samen

**Abbildung 22: SEVI und Samen verstärken den durch HERV-K113 oricoEnvΔ659-699-vermittelten Viruseintritt:** (a) SHIV-Partikel pseudotypisiert mit oricoEnvΔ659-699 infizieren HEK 293T-Zellen bis zu 10-mal besser, wenn sie zuvor mit SEVI vorinkubiert wurden. Diese Steigerung ist abhängig von der eingesetzten SEVI-Konzentration. In der Negativkontrolle mit dem HIV-1 ΔKS-Env ist keine Steigerung festzustellen. (b) Verstärkung der Infektiosität durch 15-minütige Vorinkubation der oricoEnvΔ659-699/SHIV-Virusüberstände mit Samenflüssigkeit. Die Daten umfassen die Durchschnittswerte und Standardabweichungen von sechsfach Bestimmungen am Tag 2 nach der Infektion. RLU = „relative light units“.

Wie für XMRV ist es auch für HERV-K(HML-2) Viren vorstellbar, dass sie sexuell übertragen werden können. Aus diesem Grund wurde ebenfalls der Effekt von Samenflüssigkeit auf die Infektionseffizienz untersucht. Wie Abbildung 22b zeigt, wird die Infektiosität der Pseudotypen nach Inkubation mit 20 %iger Samenflüssigkeit um das vierfache verstärkt. Höhere Samenkonzentrationen erwiesen sich als zytotoxisch. Demnach sind die gemessenen Effekte von SEVI auf die Infektiosität des HERV-K113 oricoEnvΔ659-699 ähnlich stark wie in XMRV.

## 3.2 Funktionelle Untersuchungen zum Rec-Protein

Es ist wahrscheinlich, dass das Rec-Protein zur Ausübung seiner Funktion mit verschiedenen Wirtszellfaktoren interagieren muss. Zudem ist die Rolle des Rec-Proteins während des Replikationszyklus noch nicht vollständig aufgeklärt. Für das HIV-1 Rev Protein sind bereits eine Vielzahl von Interaktionspartnern bekannt. Es verdichten sich zudem Hinweise, dass die RNA-Transportproteine neben dem nukleozytoplasmatischen Transport auch andere Funktionen während der Replikation haben.

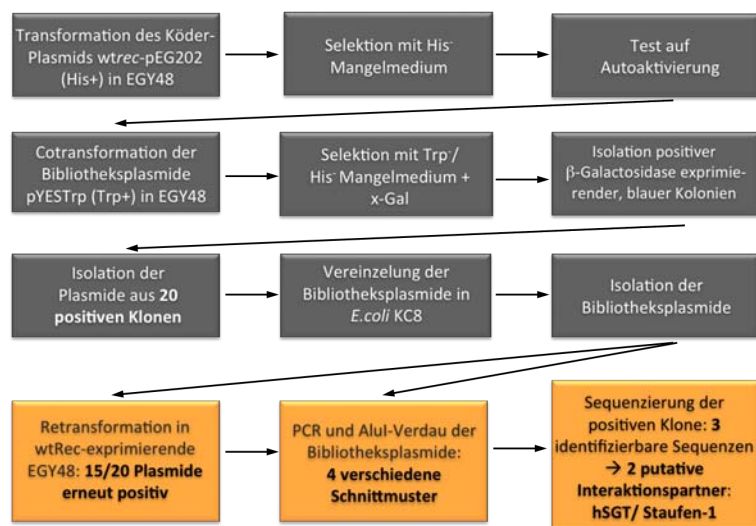
Für das Rec-Protein sind außer dem Kerntransportfaktor Crm1 keinerlei Wirtsfaktoren bekannt, die das Protein in seiner Funktion unterstützen. Eine Analyse der Interaktionspartner könnte daher die Funktionsweise des Recs näher beleuchten und auch Rückschlüsse für andere komplexe Retroviren, wie HIV-1, zulassen. Ein weiterer Aspekt ist die Assoziation des Transportproteins mit Tumorerkrankungen. Wie unter Abschnitt 1.2.5 beschrieben, interagiert Rec mit zellulären Proteinen, wie beispielsweise dem PLZF-Protein, und führt zu einer regulatorischen Fehlfunktion dieser Proteine. Dies wiederum resultiert in einer Störung des empfindlichen Gleichgewichts der zellulären Stoffwechselwege. Durch Identifizierung neuer Interaktionspartner könnten daher weitere Mechanismen beleuchtet werden, die zu einer Entartung der Zelle aufgrund der Rec-Expression führen könnte.

Mit Hilfe eines Yeast Two-Hybrid-Versuchs (YTH) konnten zwei Rec-Interaktionspartner identifiziert werden. Für eine bessere Übersichtlichkeit werden Experimente, wie Interaktionsstudien, die mit beiden Proteinen gleichermaßen durchgeführt worden sind, gemeinsam vorgestellt. Da beide Proteine jedoch im Wirtsstoffwechsel unterschiedliche Funktionen bekleiden, werden weiterführende Experimente bezüglich der pathogenetischen oder physiologischen Konsequenzen der Interaktionen einzeln behandelt.

### 3.2.1 Identifikation von Interaktionspartnern des Rec-Proteins mittels eines „Yeast Two-Hybrid“-Systems

Zunächst wurde ein Yeast Two-Hybrid-Screen durchgeführt, um erste Hinweise auf potentielle Interaktionspartner zu erlangen. Eine schematische Übersicht über den Verlauf

dieses Screens ist in Abbildung 23 dargestellt. Zunächst wurde eine mit Randomprimern hergestellte Milzbibliothek „in frame“ an die Aktivierungsdomäne (AD) des Hefetranskriptionsfaktors B42 kloniert. Die *wtrec*-Sequenz wurde in das pEG202-Köderplasmid kloniert, das die DNA-Bindedomäne (BD) des LexA-Transkriptionsfaktors besitzt und welche durch Interaktion mit der B42-Aktivierungsdomäne einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor bilden kann. Interagiert das wtRec mit einem Protein bzw. einem Peptid aus der Milzbibliothek, dann kommen die Aktivierungs- und Bindedomäne des Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe zueinander und können die Transkription von Reportergenen initiieren. In dem verwendeten System, wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 eingesetzt. Dieser Stamm verfügt über ein *Leu2*-Reportergen

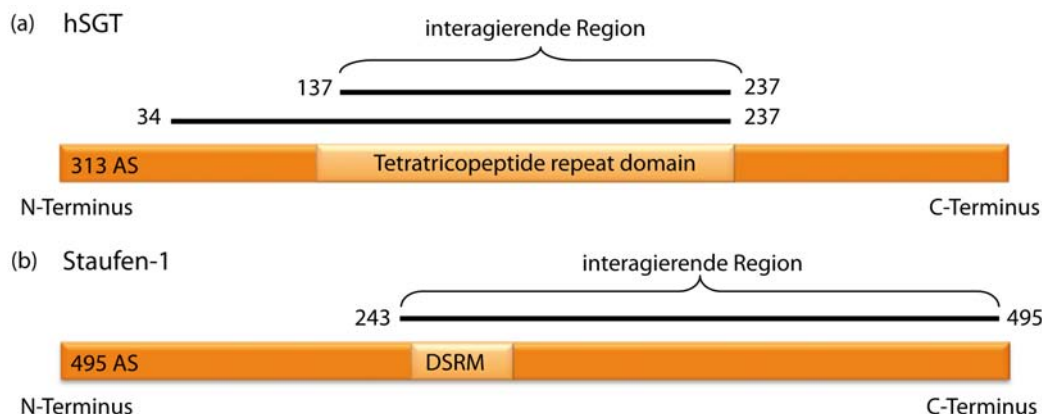


**Abbildung 23: Schematische Übersicht des YTH-Versuchs:** Ablauf des Hefe-Zwei-Hybrids-Versuchs, der zur Identifizierung zweier neuer, putativer Interaktionspartner führte: Staufen-1 und hSGT.

auf dem Chromosom und ein  $\beta$ -Galactosidase-Reportergen (LacZ) auf einem URA3-Plasmid. Zusätzlich ist EGY48 auxotroph für HIS3 und Trp, um auf das Vorhandensein des wtRec-LexA-Plasmids und die Bibliotheks-B42-Plasmide testen zu können. Werden die transformierten Hefen auf Mangelmedium-Platten ausplattiert, können nur solche Klone wachsen, die aufgrund einer Proteininteraktion mit dem wtRec die entsprechenden Aminosäuren selbst synthetisieren können. Als zusätzliche Kontrolle kann X-Gal dem Medium zugesetzt werden, das bei Aktivierung der  $\beta$ -Galactosidase zu einem blau-

en Farbstoff gespalten wird.

In Vorexperimenten wurde ausgeschlossen, dass die EGY48-Hefen unspezifisch durch die wtRec-Expression autoaktiviert werden und dass das Rec-Konstrukt in den Kern transportiert wird. Innerhalb des Screens, bei dem  $5 \times 10^5$  Ausgangsklone eingesetzt wurden, sind insgesamt 108 Transformanten untersucht worden. Die Kultivierung auf verschiedenen Mangelmedien mit und ohne X-Gal ergab, dass von diesen Transformanten 20 Klone potentiell positiv sind. Da eine Hefe mehrere Bibliotheksfragmente enthalten kann, mussten diese vereinzelt werden. Dazu wurde aus den positiven Klonen DNA isoliert und in *E. coli* KC8-Zellen elektroporiert. Diese Bakterien, die auf einem Minimalmedium kultiviert werden, dem die essentielle Aminosäure Trp fehlt, können immer nur eine Plasmid-DNA aufnehmen. Mit Hilfe des Trp-Mangelmediums wurden die Bibliotheksfragmente gezielt selektiert. Erneut wurden die Bibliotheksfragmente isoliert und aufgereinigt. Zur Bestätigung der Interaktion wurden diese dann zusammen mit dem BD-wtRec bzw. einem BD-Leerplasmid als Negativkontrolle in die EGY48 Hefen retransformiert und über X-Gal enthaltende Mangelmedien auf Interaktion getestet. Dieser Retransformationsversuch bestätigte die Köder/Beute Interaktion von 15 der 20 Klone. Restriktionsanalysen mit dem Enzym AluI wiesen darauf hin, dass vier verschiedene Sequenzen gefischt worden sind. Die anschließende Sequenzierung zeigte, dass vier der 15 Klone die letzten 251 C-terminalen Aminosäuren des humanen Staufen-1 Proteins enthielten (Abbildung 24). Fünf Klone enthielten Sequenzen für den N-proximalen und zentralen Bereich des humanen „Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein“ (hSGT) beziehungsweise für dessen zentrale „Tetratricopeptide repeat (TPR)“-Domäne (TPD) und sechs weitere Klone enthielten Sequenzen für die extrazytoplasmatische Domäne des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR). Aufgrund der extrazellulären Lokalisation dieser Domäne wurde der EGFR als falsch positiver Interaktionspartner ausgeschlossen. Alle identifizierten Fragmente waren „in frame“ in die Bibliotheksvektoren kloniert worden und wurden somit als korrekte Peptide in den Hefen exprimiert.

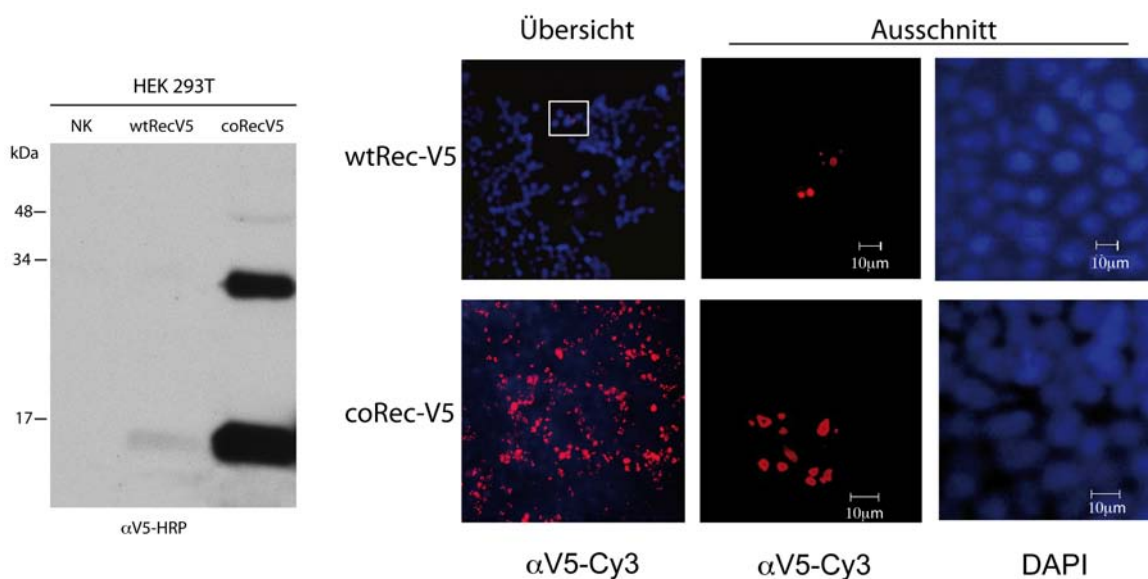


**Abbildung 24: Schematische Übersicht der Rec-interagierenden Domänen von hSGT und Staufen-1:** (a) Für hSGT wurden zwei Sequenzen identifiziert, die beide die „Tetratricopeptide repeat domain“ (TPD) umfassen. Die entsprechenden Aminosäure-Bereiche sind dargestellt. (b) Der interagierende Bereich von Staufen-1 liegt im Bereich von Aminosäure 243 bis 495 und umfasst das „double strand RNA binding motif“ (DSRM).

### 3.2.2 Optimierung der Rec-Expression

Wie das HERV-K113 *env*, besteht das *rec*-Gen aus Codons, die typisch für die kodierenden Regionen des HERV-K113 sind, jedoch in hoch-exprimierten Genen des Säuger-genoms unterrepräsentiert sind. Die wtRec Expression ist daher sehr schwach. Mittels Fusions-PCR wurde eine synthetische Gensequenz hergestellt, deren Codons an die Codon Usage der Säugerzellen angepasst wurde. Die Aminosäure-Sequenz blieb davon unbeeinträchtigt. Die so neusynthetisierte *corec*-Nukleotidsequenz besitzt eine 75 %ige Identität zur *wtRec*-Sequenz. Von insgesamt 105 Codons wurden 60 Codons (das entspricht 57 %) optimiert. Der GC-Gehalt wurde von 50 % auf 66 % angehoben.

Aus Detektionsgründen wurden sowohl das wtRec als auch das coRec mit einem V5-Tag versehen, der das Molekulargewicht um 1,7 kDa erhöht. Mit Hilfe von Western Blots wurde analysiert, welche Effekte die Codonoptimierung auf die Rec-Expression hatte. Wie in Abbildung 25a erkennbar, ist das coRec-V5 in HEK 293T-Zellen 80-mal stärker exprimiert als das wtRec. Dieser Effekt konnte auch in anderen Zelllinien beobachtet werden. Abzüglich des Molekulargewichts des V5-Tags stimmt die detektierte Molekülgröße mit dem theoretischen Molekulargewicht von 14 kDa überein. Zusätzlich sind beim coRec-V5 weitere Banden bei 28 kDa (32 kDa im Westen Blot) und 42 kDa



(a) Western Blot

(b) Immunfluoreszenz

**Abbildung 25: Effekt der Codonoptimierung von wtRec:** (a) HEK 293T-Zellen wurden mit wtRec-V5 bzw. coRec-V5 transfiziert. Die Lysate wurden im Western Blot aufgetrennt und mit einem  $\alpha$ V5-HRP Antikörper detektiert. (b) Mit wtRec-V5 bzw. coRec-V5 transfizierte HEK 293T-Zellen wurden mit einem  $\alpha$ V5-Cy3 Antikörper gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI nachgewiesen.

(48 kDa) detektierbar, was auf eine Di- bzw. Trimerisierung schließen lässt.

Die Ergebnisse der Codonoptimierung konnten mit Hilfe von Immunfluoreszenzexperimenten bestätigt werden. Wie die Abbildung 25b zeigt, wird das coRec im Gegensatz zum wtRec in einer Vielzahl der HEK 293T-Zellen exprimiert. Obwohl eine diffuse Expression auch im Zytoplasma erkennbar ist, ist der Großteil des Recs in „Spots“ innerhalb des Zellkerns lokalisiert. Die Lokalisation von wtRec und coRec ist in allen getesteten Zelllinien, darunter Tera-1, HeLa, Huh-7 Zellen, absolut identisch.

### 3.2.3 Rekonstitution der originalen Rec-Sequenz

Wie bereits in der Einleitung und unter Abschnitt 3.1.2 beschrieben, hat die provirale HERV-K113 Sequenz eine Reihe postinsertionaler Mutationen erfahren. Auch Rec ist von diesen Mutationen betroffen. Zur Detektion dieser Austausche wurde die Aminosäure-Sequenz des Rec-Proteins mit der von zehn verwandten humanspezifischen

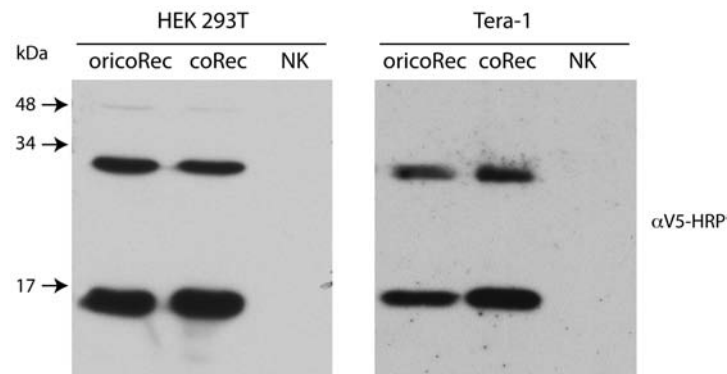


	Exon 1										Exon 2		
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			
K113	MNPSEMQRKA	PPRRRRHRNR	APLTHKMNM	VTSEEQMKLP	STKKAEPPTW	AQLKKLTLA	TKYLENTKVT	QTPESMLLAA	LMIVSMVSTG	VPNSDETAT	IENGP*		
K101	.....G	...W*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.....A	.....E	.....*		
K102	..L....G	...W*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.....A	.....E	.....*		
K104	.....C	.....C	.....E	.....L	.....C	.....C	.....C	.....A	..T..K	.....*			
K107	.....G	...G*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.....A	.....E	.....*		
K108	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.....E	.....*		
K109	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.....E	.....*		
K115	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	..L..E	.....*		
Y178333	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.....E	.....*		
AP000776	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.....E	.....*		
AC025420	.H.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.....E	.....*		
consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.....E	.....*		
oricoRec	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.....E	.....*		

**Abbildung 26: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von 11 HERV-K (HML-2) Rec-Proteinen:** Sequenzen von HERV-K101 (AF164609), K102 (AF164610), K104 (AC116309), K107 (AF164613), K108 (AC072054), K109 (AC055116), K115 (AY037929), Y178333, AP000776 und AC025420 wurden mit der K113 (AY037928) wtRec Sequenz verglichen. Sowohl die Consensus-Sequenz als auch die putative originale Sequenz (oricoRec) sind dargestellt. Das wtRec wurde an beiden Positionen, an denen es sich von der Consensus-Sequenz unterscheidet, verändert (grau hinterlegt). (\*) Stopp-Codon, (-) Deletion

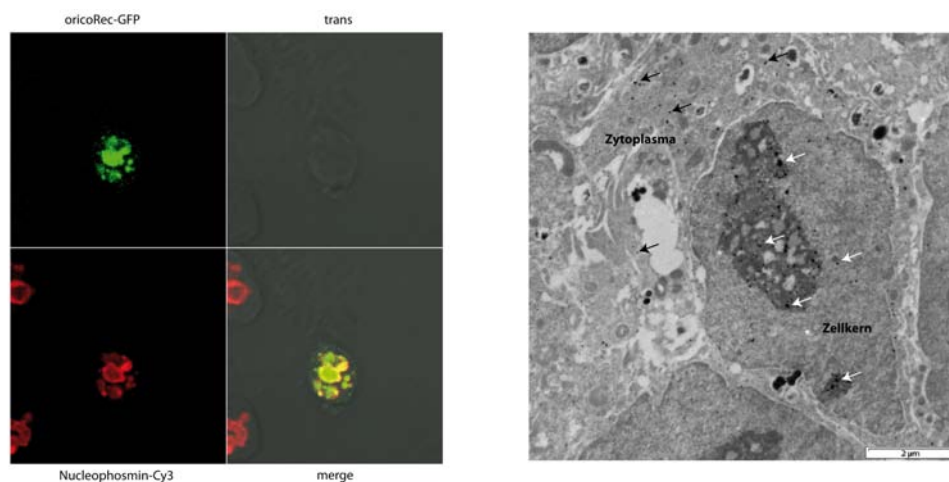
HERV-K(HML-2) Proviren (K101, K102, K104, K107, K108, K109, K115, Y178333, AP000776 und AC025420) verglichen (siehe Abbildung 26). Insgesamt gibt es zwei Aminosäure-Austausche in der wtRec Sequenz des HERV-K113, die in keiner der anderen Sequenzen zu finden sind und daher wahrscheinlich postinsertionell entstanden sind. Diese Austausche liegen an Position 89 (Austausch eines Alanin gegen ein Threonin) und Position 96 (Austausch von Glutamat gegen ein Aspartat). Beide Punktmutationen liegen innerhalb des zweiten Exons. Mit Hilfe von gezielten Mutagenesen wurde die Nukleotid-Sequenz an den entsprechenden Positionen korrigiert. Anschließend wurden Western Blot Analysen durchgeführt, die die Expression des oricoRec-V5 im Vergleich zum coRec-V5 überprüfen sollten. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, ist die Expressionsstärke des oricoRec-V5 in HEK 293T- und Tera-1 Zellen der des coRec-V5 nahezu identisch. Beide Proteine zeigen das selbe Bandenmuster. Neben der 16 kDa Bande ist eine weitere Bande bei 32 kDa detektierbar. In HEK 293T-Zellen ist zudem eine 48 kDa Bande sichtbar.

Weiterhin wurde die Lokalisation von oricoRec innerhalb der Zelle überprüft. Immunfluoreszenz-Experimente mit dem oricoRec-GFP zeigen, dass dieses Protein (wie das



**Abbildung 27: coRec und oricoRec werden gleichermaßen in HEK 293T- und Tera-1 Zellen exprimiert:** Western Blot einer Immunpräzipitation von coRec-V5 und oricoRec-V5 mit einer  $\alpha$ V5-Sepharose. Dargestellt ist die Expression in HEK 293T- und Tera-1 Zellen. Die Detektion erfolgte mittels  $\alpha$ V5-HRP Antikörper.

coRec) primär in punktförmigen Strukturen innerhalb des Zellkerns vorzufinden ist. Da diese Punkte in einer Färbung mit dem Nukleolimarker Nucleophosmin colokalisie-



(a) Lokalisation in den Nukleoli

(b) Transmissions-Elektronmikroskopie

**Abbildung 28: oricoRec lokalisiert primär in den Nukleoli:** (a) Coimmunfluoreszenz von oricoRec-GFP und Cy3-markiertem Nucleophosmin in HEK 293T-Zellen (b) Immuno-EM-Aufnahme von HEK 293T-Zellen, die mit Rec-GFP transfiziert wurden und nach der Fixierungen/ Einbettung mit einem  $\alpha$ -EGFP-Gold-Antikörper immunogoldmarkiert wurden. Schwarze Pfeile weisen auf spezifische Färbung im Zellkern (dunkelgrau), weiße markieren spezifische Färbungen im Zytoplasma. Die Färbung innerhalb des Zytoplasmas ist als spezifisch zu erachten, da angrenzende Zellen keine Markierung aufweisen.

ren, kann davon ausgegangen werden, dass sich auch das oricoRec-Protein vor allem

in den Nukleoli akkumuliert (Abbildung 28a). Immunoelektronmikroskopische Aufnahmen bestätigen die starke Lokalisation im Zellkern (schwarze Pfeile), zeigen aber auch eine leicht diffuse Verteilung im Zytoplasma (weiße Pfeile) (Abbildung 28b).

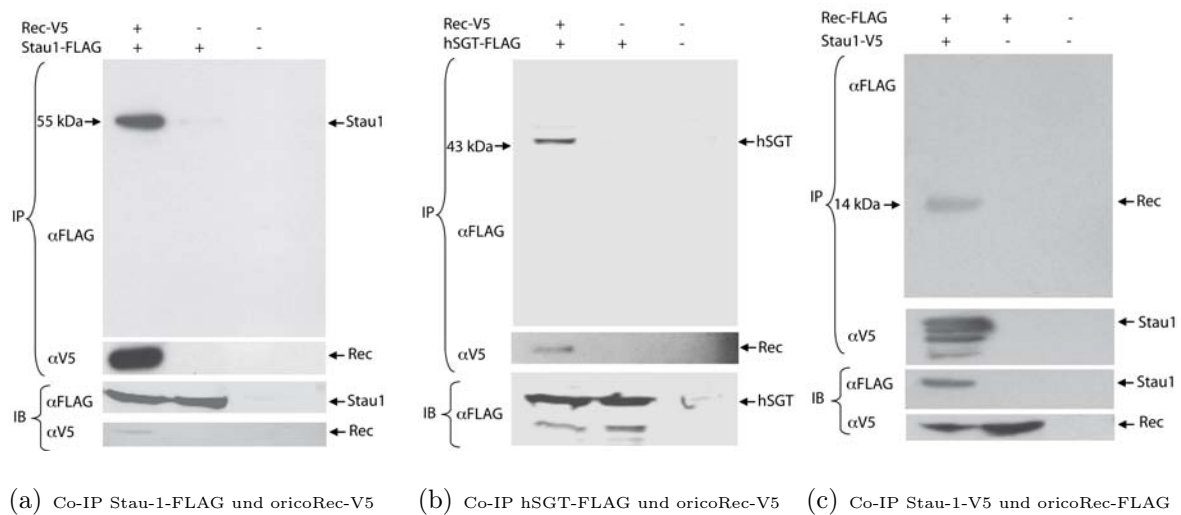
### 3.2.4 Bestätigung der Interaktion des oricoRecs mit Staufen-1 und hSGT im YTH-Versuch

Um zu überprüfen, ob das oricoRec im YTH-System ebenfalls mit Staufen-1 bzw. hSGT interagiert, wurde das oricoRec in den Vektor pEG202 kloniert und zusammen mit den pYesTrp-Staufen bzw. pYesTrp-hSGT in die EGY48 Hefen transformiert. Wie zu erwarten war, bildeten nur die Hefen blaue Kolonien, die mit beiden Plasmiden transformiert wurden. Zellen, die in Kontrollreaktionen mit dem BD-oricoRec und AD-NK bzw. BD-NK und AD-Staufen-1 cotransformiert wurden, zeigten keinerlei Interaktion und bildeten keine bzw. ausschließlich weiße Kolonien.

### 3.2.5 Bestätigung der Interaktion mittels Coimmunpräzipitation

Das Hefesystem ist ein geeigneter Ansatz, um Interaktionspartner zu detektieren. Aufgrund der Unterschiede im Aufbau und in der Komplexität der Hefezellen gegenüber den Säugerzellen ist es jedoch notwendig, die gefundenen potentiellen Interaktionspartner auch unter physiologischeren Bedingungen zu überprüfen. Aus diesem Grund wurden Coimmunpräzipitationen durchgeführt. Dafür wurden HEK 293T-Zellen mit Staufen-1-FLAG beziehungsweise hSGT-FLAG und oricoRec-V5 bzw. pcDNA3-V5 als Negativkontrolle cotransfiziert. Die Zellysate wurden anschließend mit  $\alpha$ V5-Sepharose inkubiert und mit Hilfe von Western Blots auf Expression von Staufen-1/ hSGT und oricoRec untersucht. Wie in den Abbildungen 29a und 29b erkennbar ist, sind nur in den Proben, wo sowohl oricoRec als auch Staufen-1/hSGT exprimiert wurden, Staufen-1 bzw. hSGT nachweisbar. Wurde statt des oricoRec-V5 der Leervektor pcDNA3-V5 eingesetzt, war kein Signal detektierbar.

Die Spezifität der Staufen-1 Interaktion wurde zusätzlich in *vice versa* Experimenten mit Staufen-1-V5 und oricoRec-FLAG bestätigt (Abbildung 29c). Diese Experimente



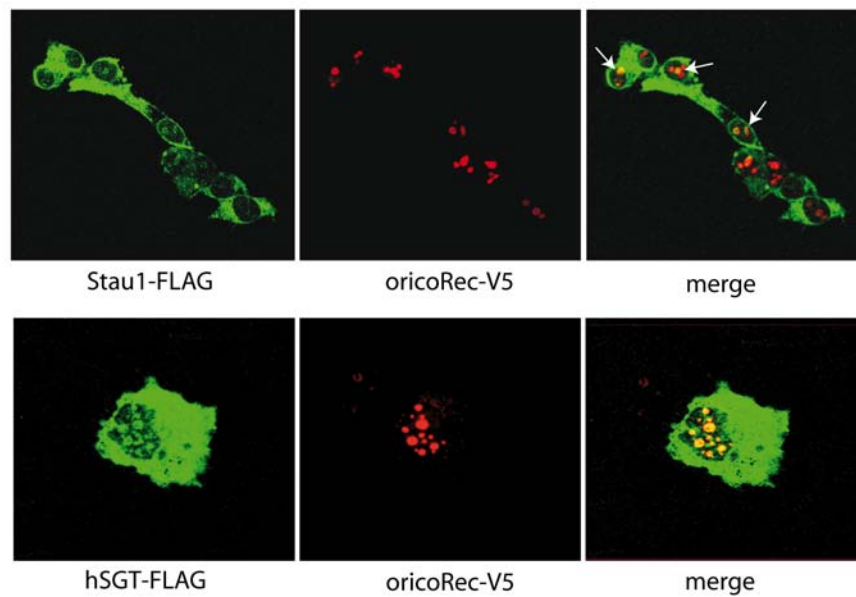
**Abbildung 29: Coimmunpräzitationsexperimente zum Nachweis einer Interaktion zwischen Stau1 (Stau1) bzw. hSGT und oricoRec:** (a) Stau1-FLAG und oricoRec-V5 wurden in HEK 293T-Zellen transfiziert. Die Zellysate wurden mit  $\alpha$ V5-Sepharose inkubiert. Nur wenn Stau1 mit oricoRec interagiert, ist ein Stau1-FLAG-Signal detektierbar. (b) Co-IP von hSGT-FLAG mit oricoRec-V5 unter Verwendung einer  $\alpha$ V5-Sepharose. (c) Umkehrexperiment mit oricoRec-FLAG und Stau1-V5 mit  $\alpha$ V5-Sepharose. IB = Immunoblot der Zellysate, IP = Immunpräzitation mit  $\alpha$ V5-Sepharose.

zeigen, dass die Interaktion zwischen Rec und Stau1 bzw. Rec und hSGT in Säugerzellen von physiologischer Natur ist und keine Hefe-spezifischen Faktoren benötigt.

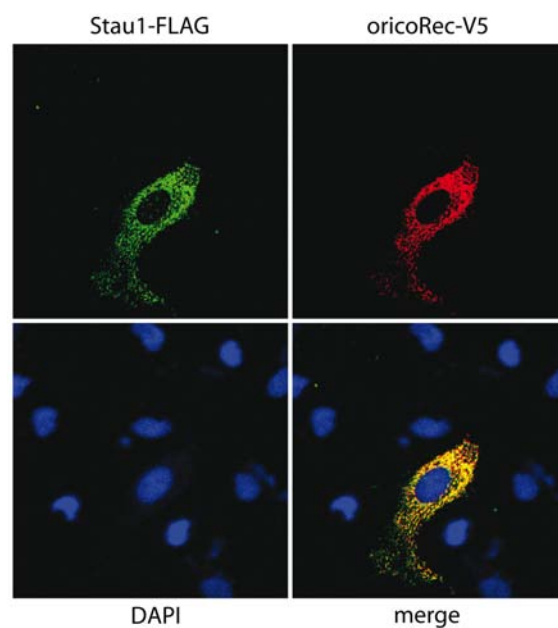
### 3.2.6 Untersuchungen zur Colokalisation

Mit Hilfe von Colokalisationsexperimenten wurde als nächstes untersucht, ob Stau1 bzw. hSGT innerhalb der Zelle in räumlicher Nähe zum Rec-Protein zu finden sind. Dazu wurden Huh-7 Zellen mit Stau1-FLAG/ hSGT-FLAG und oricoRec-V5 cotransfiziert, mit einem Maus  $\alpha$ V5-Cy3 und Kaninchen  $\alpha$ FLAG/  $\alpha$ rabbit IgG-FITC Antikörpern gefärbt und mit Hilfe des confokalen Laser Scanning Mikroskops (cLSM) untersucht.

Wie zu erwarten war, ist der Großteil des oricoRecs in den Nukleoli exprimiert. Obwohl sowohl Stau1 als auch hSGT hauptsächlich im Zytoplasma exprimiert sind, colokalisieren sie dennoch auch mit dem oricoRec im Zellkern (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Colokalisation von oricoRec-V5 mit Stau1 (Stau1) bzw. hSGT in Huh-7 Zellen:** (Reihe 1) Stau1-FLAG und oricoRec-V5 wurden in Huh-7-Zellen transfiziert, nach 24 Stunden fixiert und mit  $\alpha$ V5-Cy3 sowie  $\alpha$ FLAG/  $\alpha$ Kaninchen-IgG-FITC Antikörpern gefärbt. Eine Colokalisation von Stau1 mit oricoRec-V5 im Zellkern wird durch weiße Pfeile hervorgehoben. (Reihe 2) Eine Colokalisation von oricoRec-V5 und hSGT-FLAG findet im Zellkern statt.

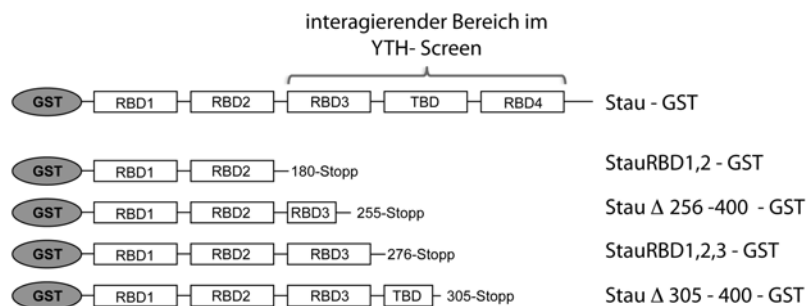


**Abbildung 31: Zytoplasmatische Colokalisation von Stau1 und Rec:** Eine Colokalisation von oricoRec-V5 und Stau1-FLAG im Zytoplasma war deutlich seltener zu beobachten.

Überraschenderweise gibt es unter den Staufen-1-exprimierenden Zellen auch vereinzelte Zellen, in denen sich das Expressionsmuster vollständig verändert hatte. In diesen Zellen waren weder oricoRec noch Staufen-1 im Zellkern detektierbar. Stattdessen bildeten sich innerhalb des Zytoplasmas punktförmige Strukturen, wo eine starke und beinahe vollständige Colokalisation der beiden Proteine zu beobachten ist (Abbildung 31).

### 3.2.7 Identifikation der oricoRec-interagierenden Domäne

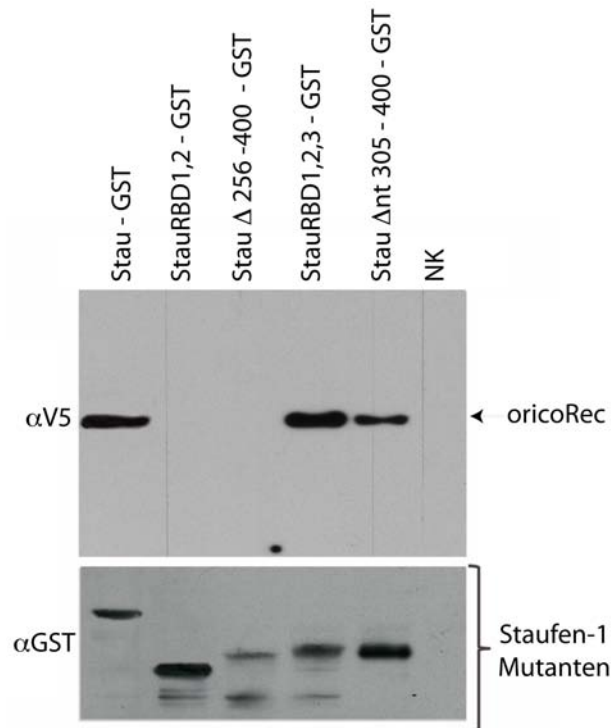
Der nächste Schritt in der Analyse der Interaktion ist die Identifizierung der bindenden Bereiche. Um die interagierenden Domänen zu bestimmen, wurden Deletionsmutanten durch Einfügen von Stoppcodons oder durch das Herausloopen von Regionen hergestellt. Alle Expressionskonstrukte wurden mit einem N-terminalen GST- oder His-Tag versehen und rekombinant in *E. coli* BL21 hergestellt. Die oricoRec-Konstrukte besitzen zusätzlich noch einen C-terminalen V5-Tag. Mit den aufgereinigten Proteinen wurden Pull Down-Experimente durchgeführt.



**Abbildung 32: GST-markierte Deletionsmutanten von Staufen-1:** Staufen-1 besteht aus vier RNA-bindenden Domänen (RBD1 bis RBD4) und einer Tubulin-bindenden Domäne (TBD). Entsprechend der Ergebnisse des YTH-Screens wurde Staufen-1 durch Einfügen von Stopp-Codons systematisch C-terminal verkürzt. In der RBD3-Domäne liegt im N-proximalen Bereich der dsRNA-Bindungsbereich. Diese Region ist in der Mutante Stau $\Delta$ 256-400 jedoch nicht in der Mutante StauRBD1,2-GST enthalten.

Sowohl Staufen-1 als auch hSGT besitzen verschiedene funktionelle Domänen. Staufen-1 besteht aus der RBD1-, RBD2-, RBD3-, TBD- und RBD4-Domäne [40]. Für die Interaktion mit dem HIV-1 Gag-Protein ist die RBD3-Domäne verantwortlich [57]. Die im Staufen-1 gefundene interagierende Region liegt zwischen Aminosäure 243 und Ami-

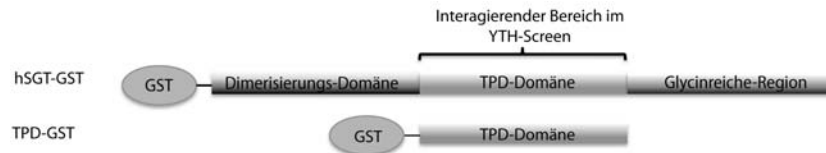
nosäure 494 und umfasst somit den gesamten C-terminalen Bereich ab der RBD3-Domäne. Daher wurden verschiedene C-terminal deletierte Konstrukte hergestellt: Stau-RBD1,2-GST, Stau $\Delta$ 256-400-GST, StauRBD1,2,3-GST und Stau $\Delta$ 305-400-GST (siehe Abbildung 32).



**Abbildung 33: Staufen-1 interagiert über seine RBD3-Domäne mit oricoRec:** Pull Down von Staufen-1-GST mit His-oricoRecV5. Staufen-1-GST und His-markiertes oricoRecV5 wurden rekombinant in *E. coli* BL21 hergestellt und aufgereinigt. Gleiche Mengen an Protein wurden für Pull Down Versuche mittels GST-Sepharose eingesetzt. Der Nachweis erfolgte über  $\alpha$ V5-HRP und  $\alpha$ -GST/ $\alpha$ -Kaninchen-IgG-HRP Antikörper.

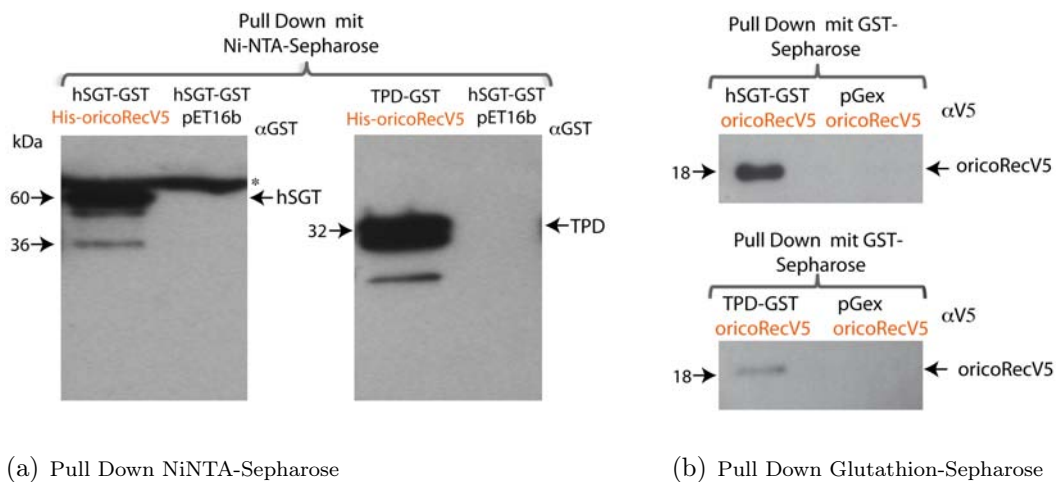
Wie der Staufen-1 Pull Down in Abbildung 33 zeigt, liegt die mit Rec-interagierende Region innerhalb des C-terminalen Bereichs der RBD3-Domäne von Staufen-1. Fehlt dieser Bereich in den rekombinanten Proteinen, erfolgt keine Rec-Bindung (Spuren 2 und 3). Die RBD3-Region wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen als funktionelle Domäne beschrieben. In dieser Region liegen sowohl die HIV-1 Gag-Interaktionsregion sowie das Zn-Fingermotiv, dass für die Bindung von Staufen an die humane RNA notwendig ist [57]. Ein falsch positives Interaktionssignal aufgrund der Bindung von Staufen-1 und Rec an die selbe RNA ohne eine direkte Interaktion beider Proteine

miteinander kann ausgeschlossen werden, da das RNA-Bindungsmotiv von Stau-1 im N-terminalen Bereich der RBD3-Domäne liegt und dieses Motiv in der Mutante *Stau* $\Delta$ 256-400-GST noch aktiv ist. Außerdem wurde das Bakterienlysat zur Vermeidung von Nukleinsäurekontaminationen mit einem DNase/ RNase-Gemisch behandelt.



**Abbildung 34: GST-markierte hSGT-Konstrukte für Pull Down-Versuche:** hSGT besteht aus drei Regionen: der N-terminalen Dimerisierungsdomäne, der zentralen TPD-Domäne und dem C-terminalen glycinreichen Bereich. Im YTH-Screen wurde die TPD-Region bereits als interagierender Bereich bestimmt.

Wie in der Abbildung 34 dargestellt, besteht das hSGT-Protein aus drei funktionellen Untereinheiten: der N-terminalen Dimerisierungsdomäne, der zentralen TPD-Untereinheit und der glycinreichen Domäne. Die TPD-Untereinheit setzt sich aus drei



(a) Pull Down NiNTA-Sepharose

(b) Pull Down Glutathion-Sepharose

**Abbildung 35: Der Rec-interagierende Bereich von hSGT liegt innerhalb der TPD-Domäne:** (a) NiNTA-Pull Down mit rekombinant hergestelltem His-oricoRecV5 und hSGT-GST/TPD-GST. Für die Pull Down mit der NiNTA-Sepharose wurden äquivalente Mengen an Protein eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mittels GST-Antikörper. (b) GST-Pull Down von His-oricoRecV5 mit hSGT/TPD-GST. Der Nachweis erfolgte über einen  $\alpha$ V5-HRP Antikörper. (\*) unspezifische Bande

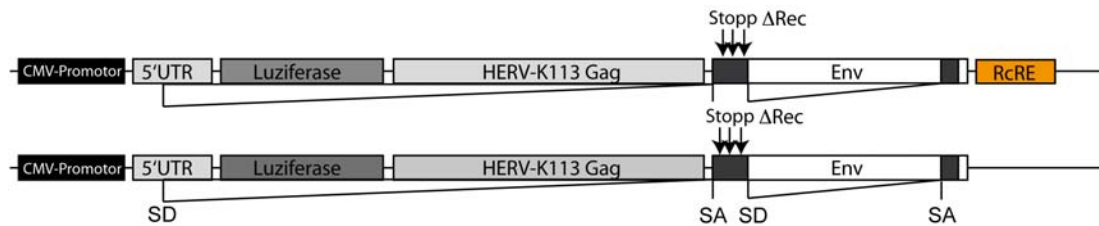
Tetratricopeptid-Wiederholungsmotiven zusammen und stellt die Hauptfunktionsdo-



mäne des Proteins dar. Für die Mutantenkonstruktion wurden die Ergebnisse des YTH-Screens zu Grunde gelegt. Für das hSGT wurde während des YTH-Screens die TPD-Region als interagierender Bereich gefunden. Zur Bestätigung der TPD-Domäne als Rec-interagierender Bereich wurde für die Pull Down-Experimente zusätzlich eine TPD-GST Mutante verwendet. Die Experimente zur Bestätigung der TPD-Domäne als Rec-interagierende Region von hSGT sind in Abbildung 35 dargestellt. Auch in den Pull Down-Experimenten bestätigt sich die TPD-Domäne als Rec-interagierender Bereich. Sowohl das Volllängen-hSGT als auch die TPD-Domäne interagieren mit Rec in zwei unabhängigen Ansätzen. Wurde statt des Interaktionspartners der entsprechende Leervektor eingesetzt, erfolgte keine Bindung. Die Interaktion konnte in beide Richtungen bestätigt werden. Unter Verwendung der His-Rec bindenden NiNTA-Sepharose konnte hSGT-GST beziehungsweise TPD-GST nachgewiesen werden. Im *vice versa* Experiment mit Glutathion-Sepharose, die den GST-Tag bindet, konnte Rec spezifisch angereichert werden.

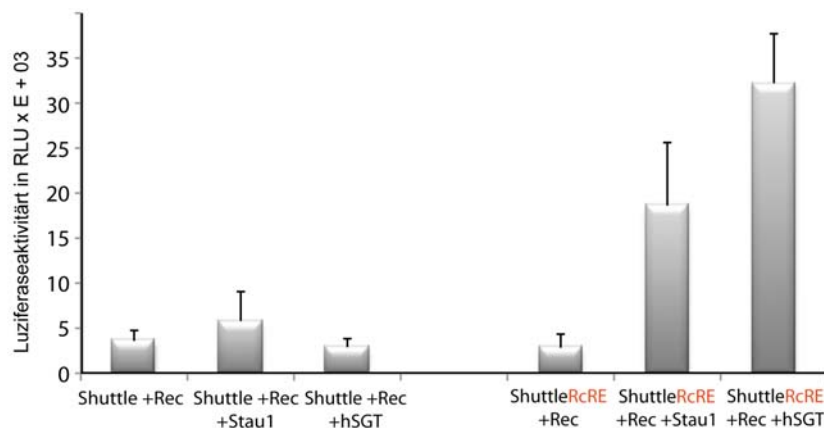
### 3.2.8 Einfluss von Staufen-1 und hSGT auf den viralen RNA-Transport

Das HERV-K Rec-Protein fungiert primär als RNA-Transportprotein der verschiedenen viralen RNA-Populationen. Es wurde nun überprüft, ob einer der beiden gefundenen Interaktionspartner diesen RNA-Transport positiv oder negativ beeinflusst. Dafür wurden zwei Luziferase-basierende Reporterstrukture hergestellt (siehe Abbildung 36). Diese Konstrukte setzen sich aus den Nukleotidsequenzen der HERV-K113 5'UTR, einem „Firefly“-Luziferasegen, sowie den HERV-K113 *gag* und *env*-Sequenzen zusammen. Für das HIV-1 Rev Protein sind neben dem RRE weitere Transportregulatorische Regionen beschrieben worden. Diese umfassen die Spleiß-Donor- (SD) und -Akzeptorstellen (SA) des proviralen Transkripts [69], [32]. Aus diesem Grund wurden die equivalenten Regionen des genomischen HERV-K113-Transkripts (SA und SD) in die Shuttle-Konstrukte eingefügt. Beide Konstrukte unterscheiden sich lediglich in der Präsenz des RcRE, welches für die Erkennung durch das Rec-Protein essentiell ist [206]. Das Konstrukt ohne RcRE fungiert als Negativkontrolle, um eine Rec-



**Abbildung 36: Reporterkonstrukte für Shuttle-Experimente:** Die Shuttle-Konstrukte bestehen aus den Nukleotid-Sequenzen der HERV-K113 5'UTR, einem Luziferasegen, sowie der HERV-K113 *gag*- und *env*-Region. Zusätzlich besitzt eines der beiden Konstrukte die Rec-Bindungsregion der RNA: das RcRE. Die intrinsische Expression von Rec wird durch das Einführen von drei Stopp-Codons in die Rec-Sequenz beider Konstrukte verhindert. Beide Shuttle-Konstrukte besitzen weiterhin die für den Transport putativ regulatorischen Regionen im Bereich der Spleiß-Donor- (SD) und -Akzeptorstellen (SA).

unabhängige Luziferaseaktivität bestimmen zu können. Aufgrund der Integration der Spleißstellen in die Reporterkonstrukte kann der spezifische Transport ungespleißter RNA gemessen werden. Das Luziferasegen kann nur abgelesen werden, wenn es nicht aus der Konstrukt-RNA im Zellkern heraus gespleißt wird. Je höher die Luziferaseaktivität ist, desto mehr ungespleißte Reporter-RNA ist aus dem Kern transportiert worden.



**Abbildung 37: Staufen-1 und hSGT verstärken den Rec-vermittelten RNA-Transport:**

HEK 293T-Zellen wurden mit einem Shuttle-Konstrukt, Rec und Staufen-1/ hSGT/ pCMV-Leervektor transfiziert. Nach vier Stunden wurden die Proben lysiert und die Luziferaseaktivität festgestellt. Die Versuche wurden im 96-Well Format durchgeführt. Jeder Wert setzt sich aus dem Mittelwert von sechs unabhängigen Messungen zusammen.

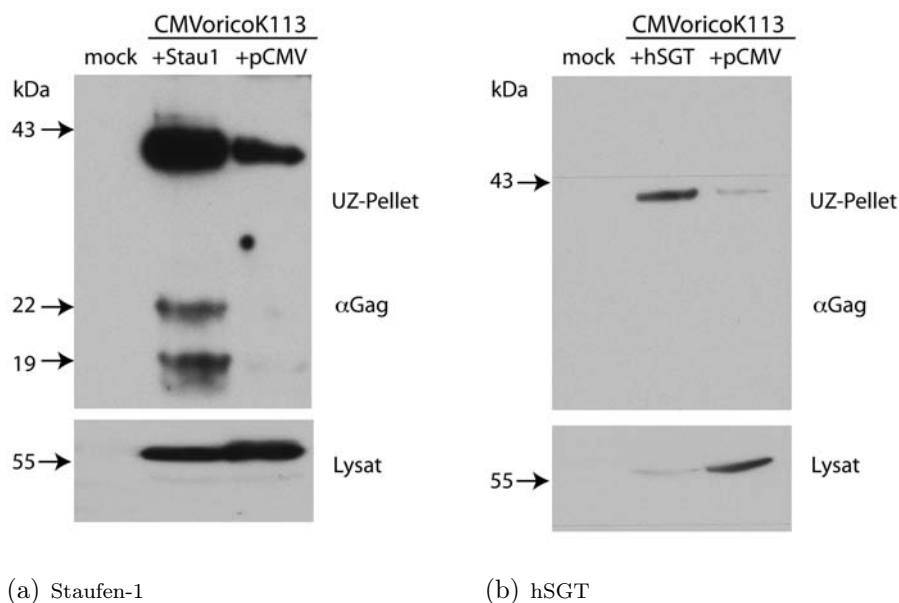
Die Konstrukte wurden zusammen mit oricoRec-V5 und Staufen-1-FLAG bzw. hSGT-

FLAG in HEK 293T-Zellen transfiziert. Um Unterschiede in der Transfektionseffizienz zu vermeiden, wurde den Kontrollen statt der Interaktionspartner pCMV-Leervektor zugesetzt. Wie die Abbildung 37 zeigt, verstärken beide Proteine den durch Rec-vermittelten RNA-Transport. Durch Staufen-1 wird die Rec-vermittelte Transportaktivität um Faktor 3 erhöht. Durch Zugabe von hSGT ist eine Zunahme der Luzifera-seaktivität um Faktor 16 messbar. Dieser Effekt ist nur mit dem RcRE-Konstrukt feststellbar. Fehlt diese Erkennungssequenz in der Ziel-RNA ist keine Erhöhung der Transportaktivität nachweisbar.

### 3.2.9 Einfluss von Staufen-1 und hSGT auf die virale Partikelbildung

Aufgrund des durch Staufen-1 und hSGT erhöhten viralen RNA-Transports ist es vorstellbar, dass dies auch Effekte auf die Partikelbildung hat. Aus diesem Grund wurden Western Blot-Analysen durchgeführt, in denen ultrazentrifugierte Überstände aus virusproduzierenden HEK 293T-Zellen in Gegenwart von Staufen-1, hSGT bzw. pCMV-Leervektor verglichen wurden. Da HERV-K113 nur sehr wenig Viruspartikel produziert, wurde das codonoptimierte Viruskonstrukt CMVoricoHERV-K113 verwendet, welches eine stark erhöhte Virusprotein-Produktion aufweist und dessen 5'LTR gegen einen CMV-Promotor ausgetauscht worden ist.

Für die Untersuchung wurden HEK 293T-Zellen mit CMVoricoHERV-K113, Rec und Staufen-1-FLAG/hSGT/pCMV transfiziert. Die Überstände wurden 48 Stunden später abgenommen, steril filtriert und per Ultrazentrifugation aufkonzentriert. In Abbildung 38 wird deutlich, dass sowohl durch die Überexpression von Staufen-1 als auch von hSGT die Partikelbildung verstärkt wurde. Die spezifische HERV-K Gag-Bande bei circa 40 kDa erscheint unter Staufen-1/hSGT-Zugabe deutlich stärker gegenüber dem Leervektor. Unter Einbeziehung der zusätzlich prozessierten Gag-Banden im Experiment mit Staufen-1 (19 und 22 kDa), beträgt die Erhöhung Faktor 5. Durch die hSGT-Überexpression werden achtmal mehr Viruspartikel in den Überstand abgegeben.



(a) Staufen-1

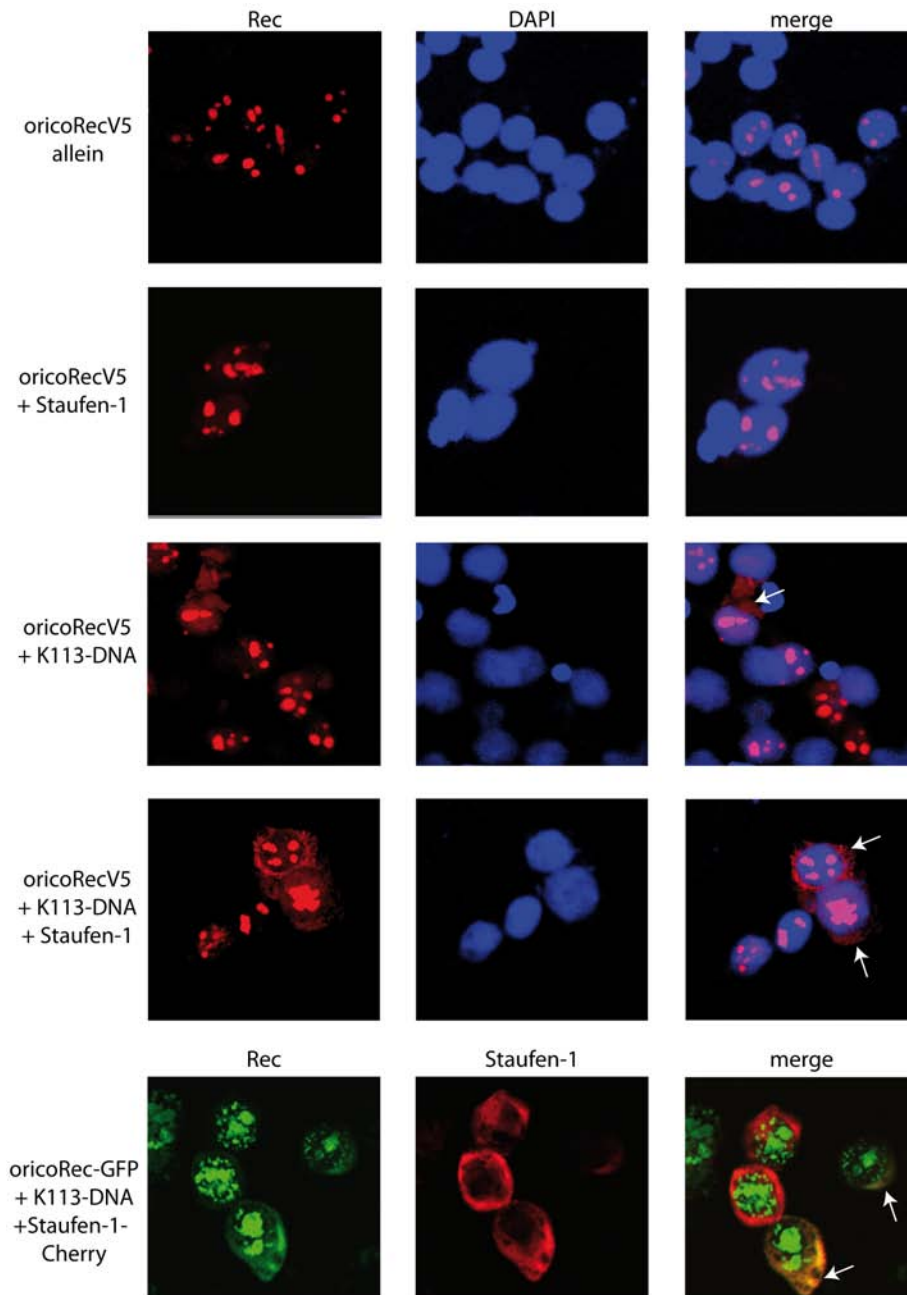
(b) hSGT

**Abbildung 38: Die Expression von Staufen-1 und hSGT erhöht die Freisetzung von HERV-K113 Partikeln:** (a) HEK 293T-Zellen wurden mit pCMVoricoHERV-K113, Rec und Staufen-1 bzw. pCMV-Leervektor transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Überstände abgenommen, von Zellresten befreit und ultrazentrifugiert. Das UZ-Pellet wurde zusammen mit dem Zelllysate im Western Blot mit einem HERV-K Gag-Antikörper auf Gag-Expression und Freisetzung in den Überstand untersucht. (b) Untersuchung der Partikelfreisetzung unter hSGT-Einfluss. Die Ergebnisse wurden in vier unabhängigen Experimenten bestätigt.

### 3.2.10 Die Interaktion von Rec mit Staufen-1 hat Einfluss auf Prozesse nach dem nukleozytoplasmatischen Transport und die Virus-RNA-Verteilung

Anfängliche Coimmunfluoreszenzanalysen mit Rec und Staufen-1 zeigten seltene, aber dennoch reproduzierbare Ereignisse, bei denen oricoRec größtenteils bzw. ausschließlich im Zytoplasma in Colokalisation mit Staufen-1 zu finden war. Da in diesen Zellen Ereignisse aufgetreten sein könnten, die auf eine weitreichendere Funktion von Rec hinweisen, wurde versucht herauszufinden, in welchem Zustand sich diese Zellen befinden.

**Die Zugabe von HERV-K113 DNA verändert Staufen-1-abhängig die Rec-Verteilung innerhalb der Zelle** Erste Experimente, in denen HEK 293T- oder HeLa-Zellen mit oricoRec-V5 und Staufen-1-FLAG bzw. mit den Fluoreszenzplasmidi-

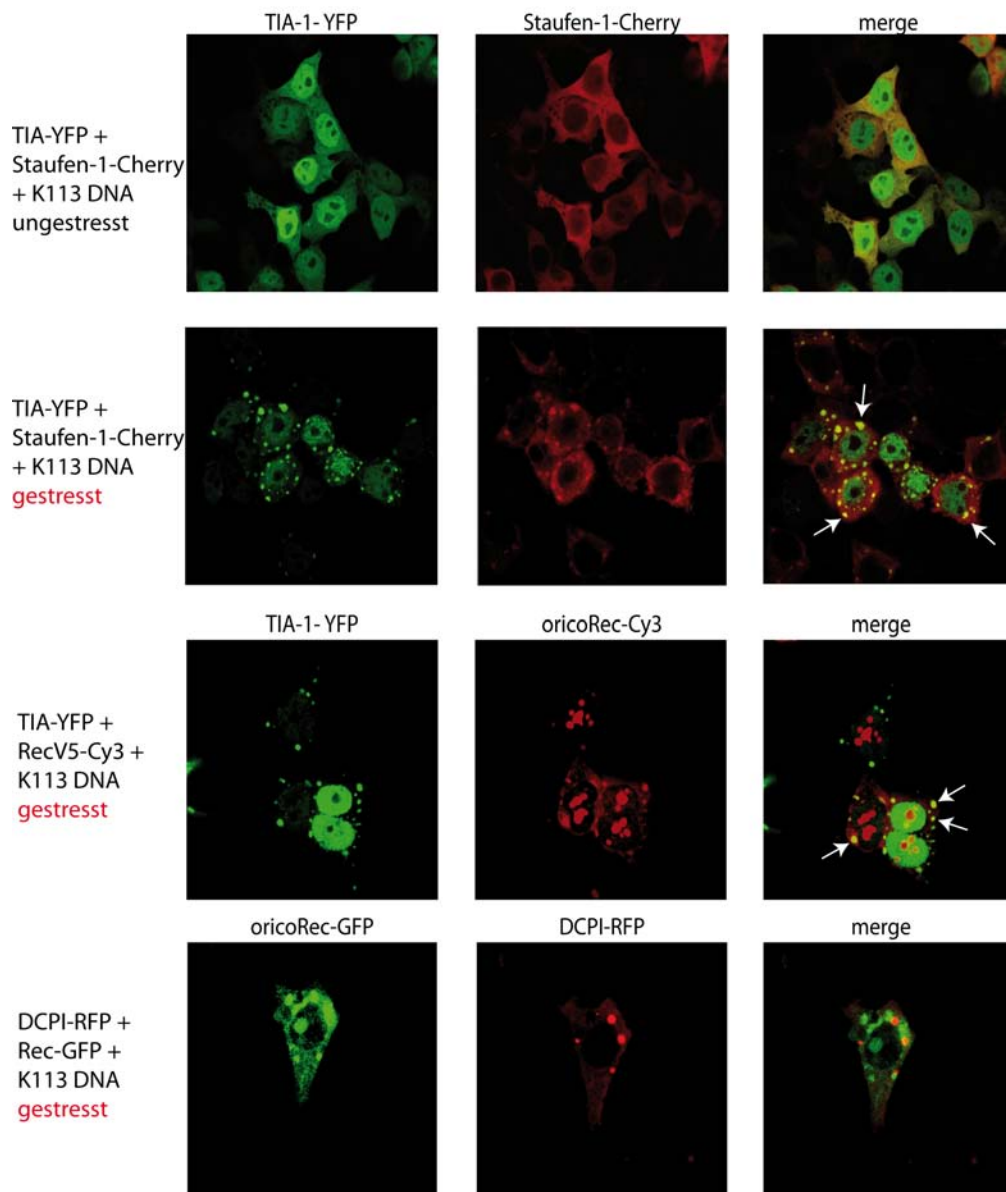


**Abbildung 39: Genomische HERV-K113 RNA beeinflusst die Rec-Verteilung in Abhängigkeit von Staufen-1:** HEK 293T-Zellen wurden mit oricoRec-V5 bzw. oricoRec-GFP und verschiedenen Kombinationen von Staufen-1-FLAG/ Staufen-1-Cherry/ HERV-K113 DNA/ Leervektor transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und gegebenenfalls mit einem  $\alpha$ V5-Cy3-Antikörper gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt. Die Detektion erfolgte mittels cLSM. Eine zytoplasmatische Lokalisation von oricoRec-V5 wird durch weiße Pfeile markiert.

den oricoRec-GFP und Staufen-1-Cherry cotransfiziert und 24 Stunden später gefärbt wurden, zeigten zunächst nur äußerst selten eine Veränderung der Rec-Verteilung außerhalb des Zellkerns. Das legt nahe, dass weitere Faktoren bei der Verteilung von Rec eine Rolle spielen. Für das HIV-1 Rev-Protein ist bekannt, dass es erst durch Bindung seiner Ziel-RNA seine Konformation ändern, multimerisieren und mit Kernexportfaktoren wie Crm1 interagieren kann [204], [209], [310]. Ein ähnliches Konzept ist auch für das HERV-K Rec-Protein vorstellbar. Aus diesem Grund wurde zusätzlich Vollängen-Virus-DNA (wtHERV-K113 oder oriHERV-K113-Plasmid-DNA) transfiziert.

In Abbildung 39 ist der Effekt durch Zugabe der Virus-DNA dargestellt. Neben oricoRec wurden verschiedene Kombinationen von HERV-K113 DNA und Staufen-1 transfiziert. In Reihe 1 und Reihe 2 wird ersichtlich, dass oricoRec-V5 auch unter Staufen-1 Zugabe fast ausschließlich im Zellkern zu finden ist. Wird zum oricoRec-V5 zusätzlich HERV-K113 DNA zugesetzt, zeigen einige Zellen neben dem Kernsignal auch ein diffuses Signal im Zytoplasma (Reihe 3). Eine deutliche Veränderung tritt jedoch auf, wenn zum oricoRec-V5 und der viralen genomischen DNA Staufen-1 transfiziert wird (Reihe 4). In circa 40 % der Zellen ist ein deutliches Rec-Signal auch außerhalb des Zellkerns detektierbar. Das Rec-Signal ist dabei diffus im Zytoplasma verteilt. Auch Staufen-1 ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (Reihe 5). Es gibt Regionen, in denen sich sowohl das Rec als auch Staufen-1 vermehrt akkumulieren. Ein konkreter Grad der Colokalisation ist aufgrund der diffusen Signale jedoch schwer feststellbar. Auffällig ist weiterhin, dass einige Zellen trotz starker Expression von Rec und Staufen-1 eine klare Trennung beider Signale aufweisen. Vermutlich wird in diesen Zellen keine genomische HERV-K113 RNA gebildet.

**Staufen-1 und Rec colokalisieren in der Stressgranula in Abhängigkeit von HERV-K Provirus RNA** Verschiedene Publikationen weisen darauf hin, dass Staufen-1 unter bestimmten Bedingungen in die zelluläre Stressgranula einwandert [308], [309], [37]. Die Bildung der Stressgranula erfolgt unter verschiedensten Stressbedingungen, in denen die Translation der mRNAs zweitrangig ist. In den hier vorgestellten Experimenten wurden die transfizierten Zellen nach 24 Stunden für eine Stunde mit



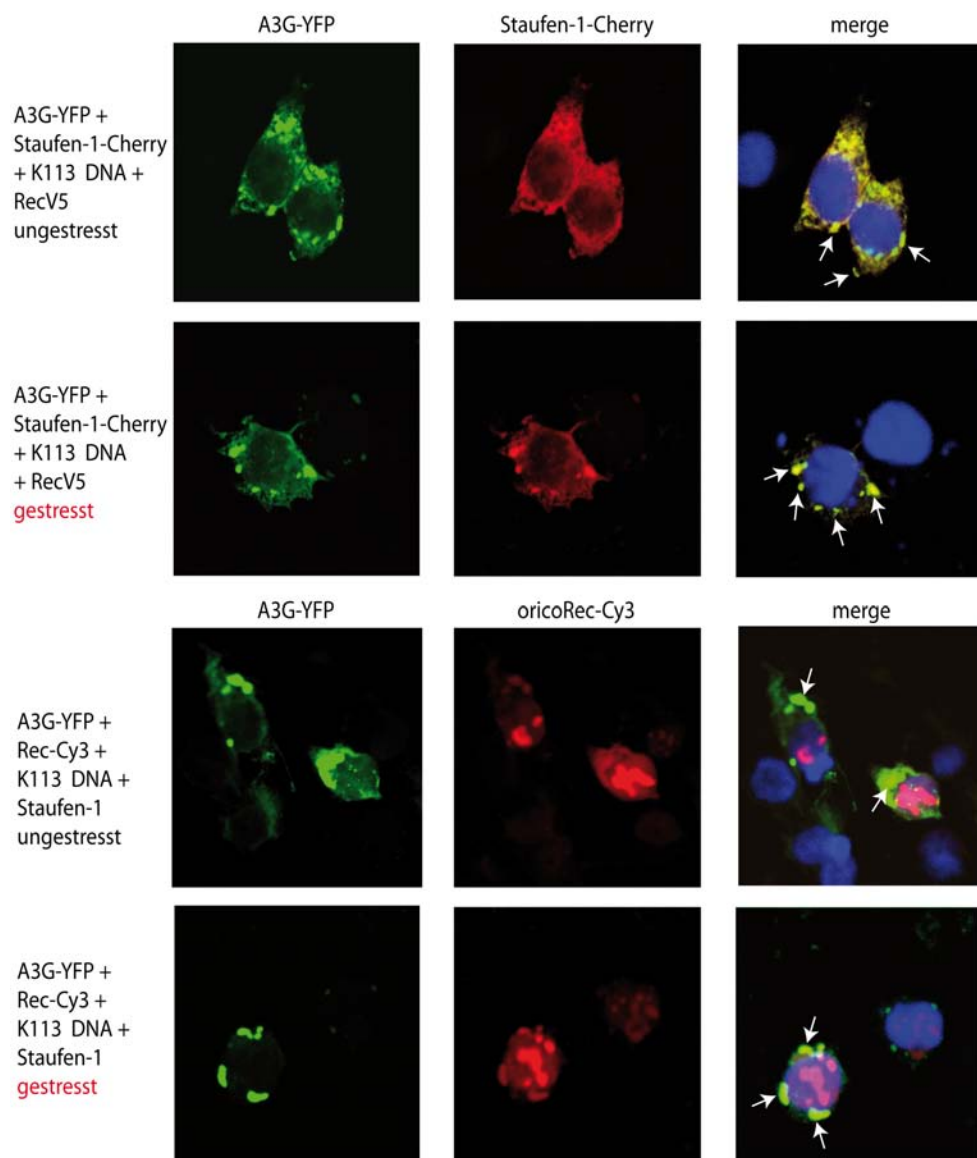
**Abbildung 40: oricoRec und Staufen-1 akkumulieren gemeinsam bei Stress in der Stressgranula:** HEK 293T-Zellen wurden mit HERV-K113 DNA, oricoRec-V5/oricoRec-GFP und Staufen-1-FLAG/Staufen-1-Cherry transfiziert. Zum Nachweis der Stressgranula wurde TIA-1-YFP transfiziert. P-Bodies wurde mit DCPI $\alpha$ -RFP nachgewiesen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5 mM Natriumarsenit gestresst, fixiert und gegebenenfalls mit einem  $\alpha$ V5-Cy3-Antikörper gefärbt. Die Detektion erfolgte mittels cLSM. Eine zytoplasmatische Colokalisation von oricoRec/Staufen-1 mit TIA-1-YFP wird durch weiße Pfeile markiert. Marker-Protein für die ebenfalls stressinduzierbaren P Bodies ist DCPI $\alpha$ .

0,5 mM Natriumarsenit gestresst und anschließend im cLSM untersucht. Natriumarsenit bewirkt einen sogenannten ER-Stress, bei dem Translationsereignisse am rauhen ER arretiert werden und unvollständig synthetisiertes Protein akkumuliert. Es wurde daher als nächstes überprüft, ob unter Natriumarsenitzugabe die diffusen RNA/Staufen-1/Rec-Aggregate in die Stressgranula einwandern. In der Stressgranula sind mRNAs akkumuliert, deren Translationsinitiation blockiert ist. Es werden dynamische Aggregate nicht-translatierter RNAs gebildet, die mit bestimmten Translationsinitiationsfaktoren, der 40s ribosomalen Untereinheit und verschiedenen RNA-bindenden Proteinen, wie dem PolyA-Binding-Protein (PABP), TIA-1, TIA-R und G3BP assoziiert sind [2]. Vor allem die RNA-bindenden Proteine TIA-1, TIA-R und G3BP interagieren mit sich selbst und tragen so zur Bildung der Stressgranula bei. Sie können daher als Stressgranula-Markerproteine verwendet werden.

Um nachzuweisen, dass der HERV-K113 RNA/Staufen-1/Rec-Komplex unter Stressbedingungen in der Stressgranula akkumuliert, wurden HEK 293T-Zellen mit TIA-1-YFP, HERV-K113 Provirus-DNA, Staufen-1-Cherry/ Staufen-1-FLAG sowie oricoRecV5 cotransfiziert. Abbildung 40 zeigt deutlich, dass sowohl Rec (Reihe 3) als auch Staufen-1 (Reihe 2) unter Stressbedingungen mit TIA-1 colokalisieren. Liegt kein Stress vor, bleiben sowohl die TIA-1 Signale als auch die Staufen-1 Signale diffus im Zytoplasma verteilt (Reihe 1). Da TIA-1 ein RNA-bindendes Protein ist und in den Zellkern einwandern kann, ist auch ein starkes Kernsignal detektierbar. Das TIA-1 Signal spart dabei die Nukleoli aus (Reihe 3). Interessanterweise erfolgt eine solche Colokalisation nur mit TIA-1, nicht aber mit RNA-abbauenden Proteinen, wie DCPI $\alpha$ , die in den sogenannten Processing Bodies (P Bodies) vorkommen (siehe Abbildung 40 Reihe 4).

**Rec und Staufen-1 colokalisieren mit APOBEC3G** Trotz der Kompartimentierung der Zelle findet permanent eine dynamische und hoch-regulierte Bewegung der mRNAs zwischen den Polysomen, der Stressgranula und den P Bodies statt. Interessanterweise wurde in den P Bodies auch High Molecular Mass (HMM) APOBEC3G (A3G) gefunden, welches unter Stressbedingungen in die Stressgranula überwandert. Die Mitglieder der APOBEC Familie sind zelluläre Cytidin-Deaminasen, die das Erb-





**Abbildung 41: oricoRec und Staufen-1 colokalisieren mit APOBEC3G (A3G):** HEK 293T-Zellen wurden mit HERV-K113 DNA, oricoRec-V5 und Staufen-1-FLAG/ Staufen-1-Cherry transfiziert. Zusätzlich wurde YFP-A3G transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5 mM Natriumarsenit gestresst, fixiert und gegebenenfalls mit einem  $\alpha$ V5-Cy3-Antikörper gefärbt. Die Detektion erfolgte mittels cLSM. Eine zytoplasmatische Colokalisation von oricoRec/ Staufen-1 mit YFP-A3G wird durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

gut eines Retrovirus so mutieren können, dass dieses nicht mehr funktionell ist. Damit stellen sie eine Gruppe von Proteinen dar, die Resistenz gegen Infektionen durch exogene Retroviren verleihen und die Zelle vor endogenen Retroelementen schützen. Für

HMM A3G wurde gezeigt, dass es die Retrotransposition von ALU-Sequenzen hemmt und so wahrscheinlich die Zelle vor übermäßiger Retrotransposition eigener endogener Retroelemente schützt.

Die Tatsache, dass HMM A3G während Stressphasen in die Stressgranula einwandert, könnte für HERV-K113 bedeutsam sein, wenn sich dort auch die retroviralen RNA-Komplexe befinden. Aus diesem Grund wurden Colokalisationsexperimente mit YFP-A3G durchgeführt (Abbildung 41). Dafür wurden HEK 293T-Zellen mit YFP-A3G, HERV-K113 Provirus-DNA, Staufen-1-Cherry und unmarkiertem oricoRec-V5 transfiziert. In den Rec-Versuchen wurde statt Staufen-1-Cherry unmarkiertes Staufen-1-FLAG hinzugegeben und oricoRec-V5 mit einem  $\alpha$ V5-Cy3 Antikörper markiert. Es wurden sowohl gestresste als auch ungestresste Zellen analysiert.

In Abbildung 41 wird deutlich, dass A3G unter Stressbedingungen in Aggregaten akkumuliert. Sowohl Staufen-1-Cherry (Reihe 2) als auch Cy3-markiertes oricoRec-V5 (Reihe 4) werden ebenfalls in diesen Aggregaten angehäuft. Die virale RNA und A3G kommen unter Stressbedingungen also in räumliche Nähe zueinander. In ungestressten Zellen sind die Signale im gesamten Zytoplasma verteilt. Überraschenderweise scheinen aber auch hier Colokalisationen in einigen Regionen (markiert mit weißen Pfeilen) zwischen A3G mit Staufen-1 bzw. oricoRec zu Stande zu kommen (Reihe 1 und 3). Während diese Colokalisation mit Staufen-1 das gesamte Zytoplasma umfasst, scheint es in der Colokalisation mit Rec nur einzelne hochkonzentrierte Punkte zu geben.

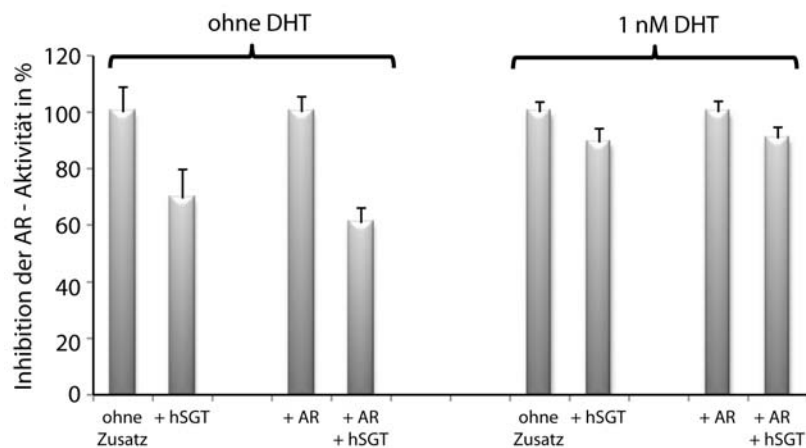
### 3.2.11 Pathogenetische Effekte der Rec-hSGT-Interaktion

Im Gegensatz zum Staufen-1 ist für hSGT keine Funktion im RNA-Transport und der Transportgranulabildung beschrieben, sondern es übernimmt zellregulatorische Aufgaben. Das ubiquitär exprimierte Protein besitzt eine wichtige Checkpoint-Funktion während der Mitose. Wandert das Protein nicht in den Zellkern ein, kann kein Übergang von der Metaphase in die Anaphase erfolgen [337]. Außerhalb des zellulären Replikationszyklus ist hSGT als Regulator des Androgenrezeptors (AR) beschrieben worden [43]. Der Androgenrezeptor wird beim Menschen in den meisten Gewebetypen produ-

ziert. Die trotzdem sehr unterschiedliche Aktivität ist auf eine Vielzahl von Proteinen zurückzuführen, die als Coaktivatoren oder Corepressoren des Rezeptors wirken. In Hinblick darauf, dass in Keimzelltumoren eine erhöhte HERV-K-Expression feststellbar ist und dass in diesen Zellen der AR eine entscheidende regulatorische Aufgabe während der funktionellen Organdifferenzierung und Spermatogenese spielt, liegt der Fokus der Rec-hSGT-Interaktion auf einer möglichen Dysregulation des AR in diesem oder ähnlichen Geweben. Zudem ist der AR für die initiale Proliferation von Prostatakarzinomen (PCA) notwendig.

**oricoRec erhöht die Aktivität des Androgen-Rezeptors** Der Androgen-Rezeptor gehört zur Superfamilie der Kernrezeptoren. Diese werden in der Regel im Zytoplasma in einem inaktiven monomeren Zustand gehalten. Bindet der Ligand, kommt es zu einer Konformationsänderung, die es dem Rezeptor ermöglicht, in den Kern zu wandern. Dort bindet er als dimeres Protein an seine Erkennungssequenzen.

hSGT ist ein Co-Chaperon, das dazu beiträgt, den AR sowohl während seiner Synthese als auch als funktionsfähiges Molekül in einem inaktiven Zustand zu halten [43]. Erst

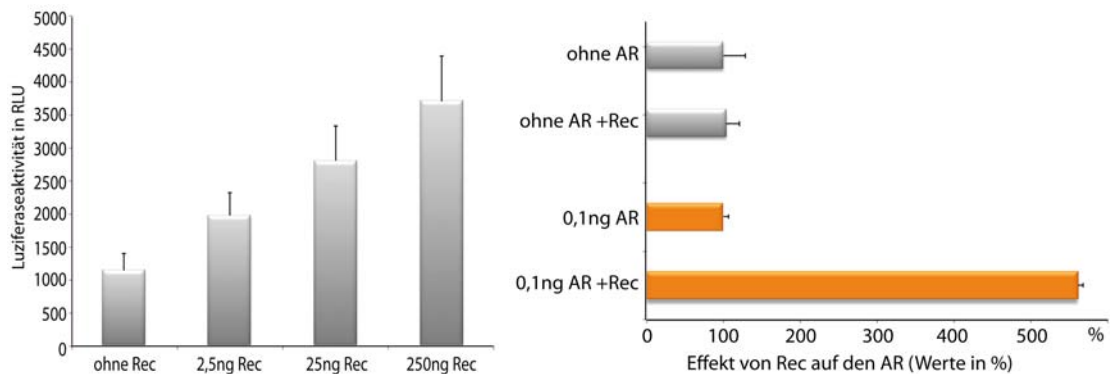


**Abbildung 42: Vorversuch zum ARR<sub>1</sub>-tkLuc-Reporterkonstrukt:** LNCaP-Zellen wurden mit dem ARR<sub>1</sub>-tkLuc-Reporterkonstrukt und AR beziehungsweise Leervektor transfiziert. Zusätzlich wurde hSGT-FLAG bzw. pCMV-Leervektor hinzugegeben. Die durch hSGT vermittelte Inhibition wurde sowohl unter Einfluss von 1 nM Dihydrotestosteron (DHT) als auch ohne Zugabe von DHT untersucht. Der inhibierende Effekt von hSGT wurde relativ zur jeweiligen Kontrolle ohne hSGT dargestellt.

wenn androgene Liganden, wie Testosteron oder das synthetische Dihydrotestosteron (DHT) am Rezeptor binden, dissoziiert hSGT vom AR und ermöglicht so dessen Aktivierung.

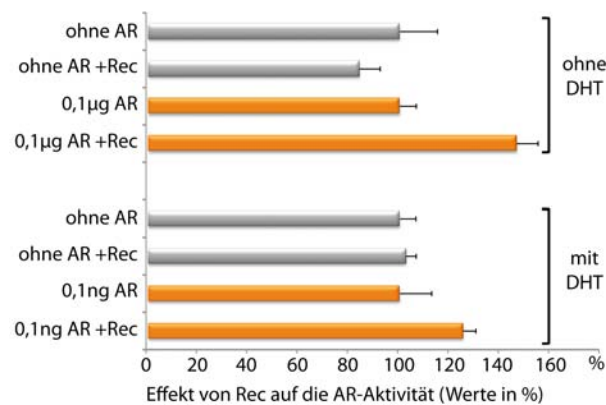
Um einen Effekt von Rec auf die Aktivität von hSGT und damit auch auf den AR messen zu können, wurde ein Luziferase-Reporterkonstrukt verwendet, welches die Promotorsequenz des streng AR-regulierten *psa*-Gens (Prostata-spezifisches Antigen) enthält und hier als ARR\_tkLuc bezeichnet wird [43]. Mit Hilfe dieses Reporterkonstrukts konnten Buchanan *et al.* 2007 zeigen, dass hSGT in Abwesenheit von DHT eine inhibierende Wirkung auf den AR-Rezeptor hat und daher auch die Transkription der AR-abhängigen Gene indirekt negativ reguliert [43]. In einem ersten Kontrollexperiment wurde die Aktivität des ARR\_tkLuc-Konstrukts in Abhängigkeit vom AR, DHT und hSGT untersucht (siehe Abbildung 42). Die Luziferaseaktivität nimmt unter Zugabe von hSGT ab. In Gegenwart von 1 nM DHT, dem natürlichen Liganden des ARs, ist der inhibierende Effekt durch hSGT geringer.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Expression von Rec die AR-Aktivität beeinflusst. Das Reporterkonstrukt wurde zusammen mit verschiedenen Kombinationen von oricoRec-V5, pCMV-AR [43] und hSGT-FLAG in die Prostatazelllinien LNCaP und DU-145 transfiziert. Als Kontrollzelllinie wurden HEK 293T-Zellen verwendet. In Abbildung 43 wird gezeigt, dass die oricoRec-Expression zu einem Anstieg der AR-abhängigen Luziferaseaktivität führt. In den androgenabhängigen LNCaP-Zellen erfolgen Aktivitätssteigerungen um das Vierfache gegenüber Zellen, die nicht mit Rec transfiziert worden sind (Abbildung 43a). Je mehr oricoRec transfiziert wurde, desto stärker ist dabei der Anstieg in der AR-abhängigen Luziferase-Aktivität. Vergleichbare Experimente mit den androgenunabhängigen Zelllinien DU-145 und HEK 293T zeigen, dass dieser Effekt AR-spezifisch ist. Erst wenn AR *in trans* cotransfiziert wird, ist ein Anstieg der Luziferaseaktivität messbar (orange unterlegte Balken in Abbildung 43b und 43c). Alleinige oricoRec-Expression hat in diesen Zelllinien keine Auswirkungen. Um den Effekt von oricoRec auf die AR-Aktivität besser darstellen zu können, wurden die Messwerte ohne Rec auf 100 % gesetzt. Der prozentuale Rec-vermittelte Anstieg wurde anschließend über Relativierung mit diesen Werten ermittelt. Die ARR\_tkLuc-



(a) LNCaP-Zellen

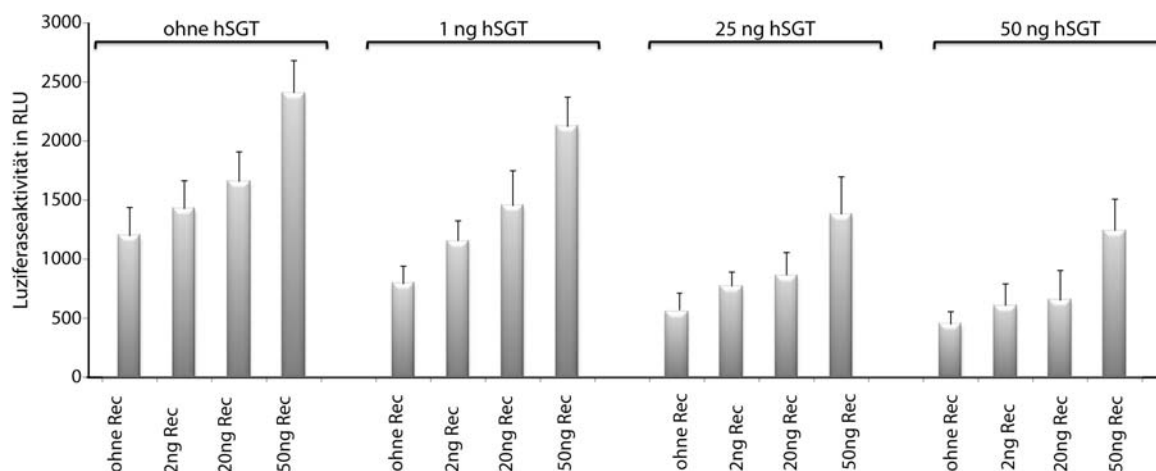
(b) DU-145-Zellen



(c) HEK 293T-Zellen

**Abbildung 43: oricoRec-Expression stimuliert spezifisch den AR:** (a) Androgenabhängige LNCaP-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt ARR\_tkLuc und verschiedenen Mengen oricoRec-V5 transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die Luziferaseaktivität bestimmt. Eine Normalisierung erfolgte mittels cotransfizierter Renilla-Luziferase. (b) Untersuchung des Rec-Effekts in der androgenunabhängigen Prostatazelllinie DU-145. Nur wenn AR in *trans* zugegeben wird, kann oricoRec das Reporterkonstrukt stimulieren. (c) HEK 293T-Zellen besitzen keine AR-Aktivität. Werden 0,1 µg AR zusätzlich transfiziert, erfolgt eine Rec-abhängige Stimulation des AR und damit eine erhöhte Luziferaseaktivität. Der Effekt wurde sowohl in Gegenwart von DHT als auch ohne DHT-Zugabe bestimmt. Die Experimente wurden im 24-Well-Format durchgeführt. Jeder Messwert setzt sich aus mindestens vier Einzelmesswerten zusammen. DHT= Dihydrotestosteron. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden die Werte ohne Rec (unabhängig von ihrer Höhe) auf 100 % gesetzt und die Rec-abhängigen Daten darüber normalisiert.

Aktivität steigt in AR-transfizierten DU-145 Zellen auf 562 % gegenüber Zellen, die nicht mit oricoRec transfiziert wurden. In HEK 293T-Zellen erfolgt ein Aktivitätsan-

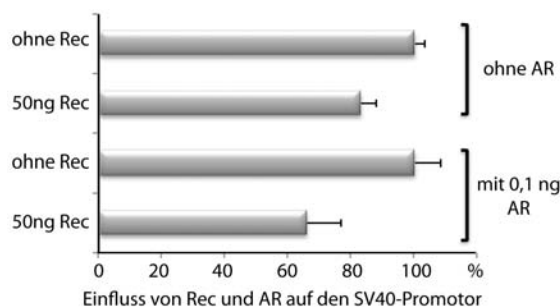


**Abbildung 44: oricoRec und hSGT beeinflussen den Androgenrezeptor komplementär:**

AR-aktive LNCaP-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt ARR\_tkLuc und verschiedenen Mengen oricoRec-V5/pcDNA3V5 und hSGT-FLAG/ pCMV-FLAG transfiziert. Zusätzlich wurde ein Renilla-Luziferaseplasmid transfiziert, um die Messwerte auf Transfektionseffizienz relativieren zu können. Nach 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität der Lysate überprüft. Das Experiment wurde im 96-Well-Format durchgeführt. Die dargestellten Werte setzen sich aus sechs Einzelmessungen zusammen.

stieg auf 147 %. Eine zusätzliche DHT-Gabe hatte in HEK 293T-Zellen keinen erhöhten stimulatorischen Effekt.

Um zu testen, ob dieser Effekt aufgrund der Bindung von Rec an hSGT erfolgt, wurden Titrationsversuche mit oricoRec-V5 und hSGT in Lncap-Zellen durchgeführt. In Ab-



**Abbildung 45: oricoRec-V5 Expression hat keinen Einfluss auf das Kontrollplasmid**

**pGL-SV40:** LNCaP-Zellen wurden mit dem Kontrollreporterplasmid pGL-SV40 und verschiedenen Kombinationen von oricoRec-V5, AR, pcDNA3, pCMV und Renilla-Luziferase transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Versuche wurden im 24-Well-Format durchgeführt.

bildung 44 sind diese Ergebnisse dargestellt. Je höher die eingesetzte Menge an hSGT ist, desto niedriger ist die AR-Aktivität (Reduktion um bis zu 65 %). Im Gegensatz dazu kann durch steigende Mengen oricoRec-V5 die inhibierende Wirkung von hSGT zumindest teilweise wieder aufgehoben werden (Abbildung 44). Dass diese Effekte spezifisch sind, zeigt ein Test mit dem Luziferase-Konstrukt pGL-SV40, welches statt des ARR-Elements einen SV40-Promotor trägt (Abbildung 45). Wird dieses Konstrukt transfiziert, sind keine Effekte durch Rec und hSGT messbar. Rec weist sogar einen inhibierenden Effekt auf, was auf eine Toxizität durch Überexpression zurückzuführen sein könnte.

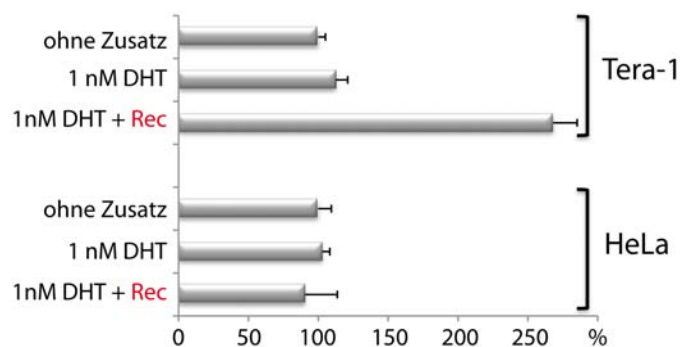
**HERV-K113 profitiert von einer erhöhten AR-Aktivität** Als nächstes stellte sich die Frage, in wie fern die HERV-K113 Transkription von einer Erhöhung der AR-Aktivität profitiert. Da der AR an spezifische Erkennungssequenzen der DNA bindet, wurde nun getestet, ob das Provirus von HERV-K113 in seiner 5'LTR ein solches Bindungsmotiv enthalten könnte.



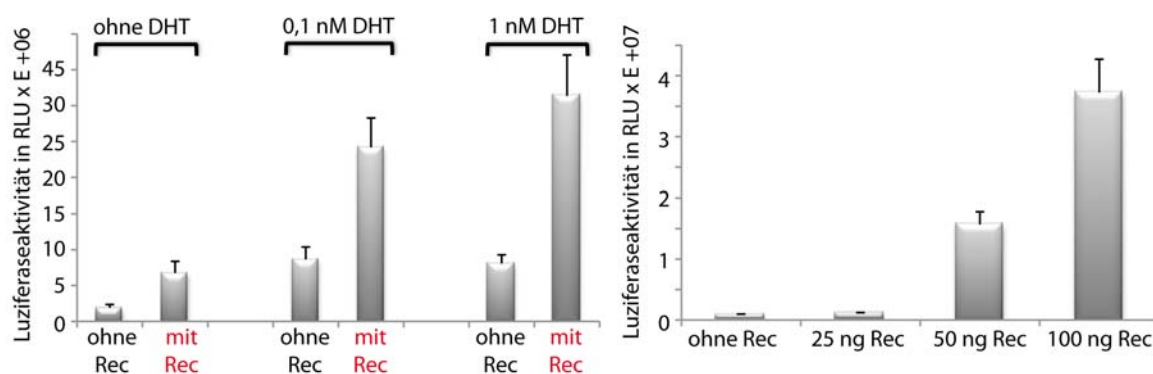
**Abbildung 46: Reporterkonstrukt zur Bestimmung der HERV-K113 LTR-Aktivität:** Die HERV-K113 5'LTR wurde so vor ein Luziferasegen kloniert, dass stimulatorische Effekte auf die LTR-Aktivität gemessen werden können.

Um eine solche Aktivierung zu ermitteln, wurde ein Luziferase-Reporterkonstrukt verwendet, dessen Promotor durch die 5'LTR von HERV-K113 ersetzt wurde [13]. Der schematische Aufbau des Konstrukts ist in Abbildung 46 dargestellt. Dieses Reporterkonstrukt wurde zusammen mit verschiedenen Kombinationen von oricoRec-V5 und hSGT-FLAG bzw. Leervektoren in die Teratokarzinomzelllinien Tera-1 und GH, in die AR-unabhängige Prostatazelllinie DU-145 und in HeLa-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde der Effekt von Dihydrotestosteron gemessen.

Tatsächlich ist ein stimulierender Effekt von Rec und DHT auf das LTR-Konstrukt in GH- und Tera-1 Zellen messbar (Abbildung 47). Sowohl in GH-Zellen als auch in den Tera-1 Zellen wird die Reporteraktivität allein durch DHT-Gabe leicht erhöht. Ein signifikanter Luziferaseanstieg erfolgt bei zusätzlicher Rec-Gabe. In Tera-1 Zellen



(a) Tera-1 und HeLa-Zellen



(b) GH-Zellen

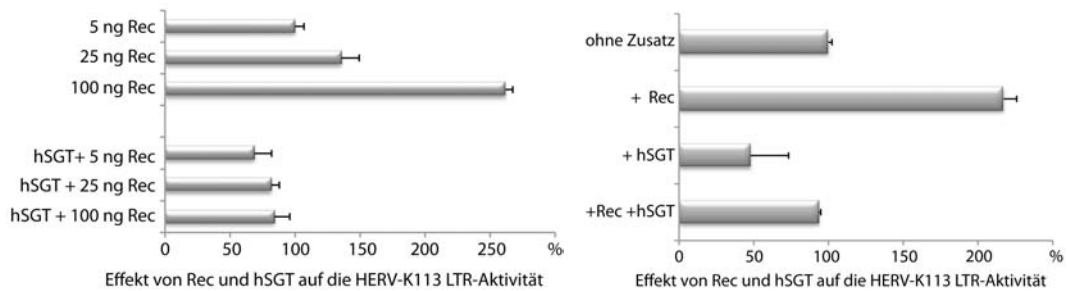
(c) GH Zellen

**Abbildung 47: oricoRec-Expression stimuliert die Aktivität der HERV-K113-LTR:**

(a) Tera-1 und HeLa-Zellen wurden mit dem HERV-K113 LTR-Luziferasekonstrukt und 50 ng oricoRec-V5 bzw. Leervektor transfiziert. In Parallelansätzen wurden die Zellen zusätzlich mit 0,1 nM DHT behandelt. Nach 24 Stunden wurde die Luziferaseaktivität bestimmt. (b) GH-Zellen wurden mit 75 ng oricoRec-V5/ Leervektor transfiziert und mit verschiedenen DHT-Konzentrationen behandelt. (c) oricoRec-V5-Titrationsreihe in GH-Zellen, die mit 1 nM DHT behandelt wurden.

beträgt dieser Anstieg Faktor 2,6; in GH-Zellen abhängig von der zugesetzten DHT-Menge bis zu Faktor 15 (Abbildung 47b). In AR-unabhängigen HeLa-Zellen konnte weder ein Effekt durch DHT noch durch Rec gemessen werden (Abbildung 47a). Der Rec-vermittelte Anstieg ist konzentrationsabhängig. GH-Zellen, die mit einer steigenden Menge oricoRec-V5 transfiziert wurden, weisen eine zunehmende Luziferaseaktivität auf. Bei Zugabe von 100 ng oricoRec-V5 DNA beträgt der Luziferaseunterschied im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Rec transfiziert wurden, Faktor 18 (Abbildung 47c). In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von hSGT auf die LTR-Aktivität un-





(a) Tera-1 Zellen

(b) DU-145 Zellen

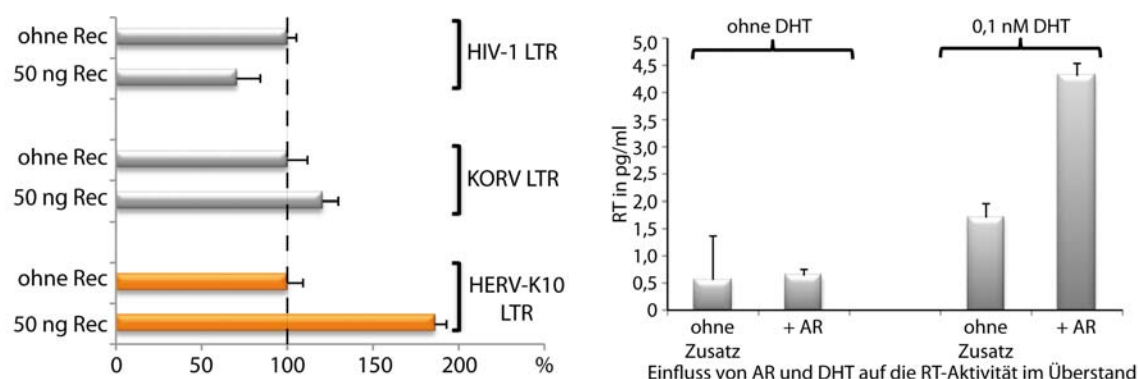
**Abbildung 48: oricoRec und hSGT sind Gegenspieler in der Regulation der HERV-K113**

**LTR-Aktivität:** (a) Tera-1 Zellen wurden mit steigenden Rec-Konzentrationen transfiziert. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit 30 ng hSGT transfiziert. Die Zellen wurden mit 0,1 nM DHT behandelt. (b) Transfektion von DU-145 Zellen mit 0,1 ng AR und verschiedenen Kombinationen von 50 ng Rec und 30 ng hSGT bzw. entsprechenden Leervektoren. Die Zellen wurden in Gegenwart von 0,1 nM DHT kultiviert.

tersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 dargestellt. Sowohl in Tera-1 Zellen als auch in mit AR-transfizierten DU-145 Zellen ist eine Reduktion der Luziferaseaktivität nach hSGT-Transfektion messbar. Dieser inhibierende Effekt kann durch zusätzliche Transfektion mit Rec teilweise wieder aufgehoben werden (Abbildung 48b). Die Experimente wurden in Gegenwart von 0,1 nM DHT durchgeführt, da die LTR unter diesen Bedingungen sowohl auf die Rec-Expression als auch auf die hSGT-Expression deutlich anspricht.

**AR-Abhängigkeit anderer Retrovirus LTRs** In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob auch andere retrovirale LTRs von der verstärkenden Wirkung durch Rec profitieren. Dafür wurden LNCaP-Zellen mit Luziferasekonstrukten transfiziert, die durch die LTRs von HERV-K10, HIV-1 bzw. KoRV kontrolliert werden. Die Messwerte sind in Abbildung 49a dargestellt. Weder die HIV-1 LTR noch die KoRV LTR profitieren in ihrer Aktivität von einer oricoRec-Zugabe. Die HIV-1 LTR verliert durch Rec-Zugabe sogar an Aktivität. Im Gegensatz dazu erfährt die HERV-K10 LTR eine Aktivitätserhöhung um Faktor 2.

Parallel dazu wurde die RT-Aktivität in den Überständen von Tera-1 Zellen überprüft. Die Stimulation der HERV-LTRs könnte auch zu einer allgemein erhöhten Partikelbil-



(a) LTR-Aktivität in % in LNCap-Zellen

(b) RT Aktivität im Überstand von Tera-1 Zellen

**Abbildung 49: oricoRec-V5 stimuliert die HERV-K10 LTR, nicht jedoch die HIV-1**

**LTR:** (a) LNCap-Zellen wurden mit Luziferasekonstrukten transfiziert, die die LTRs von HIV-1/KoRV/HERV-K10 besitzen. Zusätzlich wurden 50 ng oricoRec-V5 bzw. Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden mit 0,1 nM DHT behandelt. Nach 24 Stunden wurde die Luziferaseaktivität ermittelt. (b) Cavid-Assay von Tera-1 Überständen: Durch DHT und den AR wird die RT-Aktivität im Überstand erhöht.

dung und -freisetzung führen. Damit würde sich der Anteil der reversen Transkriptase im Überstand erhöhen, die mit dem Cavid-Assay gemessen werden kann. Dafür wurden Überstände von Tera-1 Zellen genommen, die zuvor mit AR oder Leervektor transfiziert und mit 1 nM DHT behandelt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49b dargestellt. Die Expression von AR allein genügt nicht, um eine erhöhte RT-Aktivität im Überstand zu messen. Wird jedoch DHT zugegeben, erhöht sich die RT-Aktivität um das vier- bis achtfache. Wird AR in den Zellen exprimiert, ist der stimulatorische Effekt durch DHT zusätzlich erhöht.

## 4 Diskussion

### 4.1 Das HERV-K113 Hüllprotein

Der Eintritt eines Retrovirus in die Zelle wird durch eine spezifische Interaktion des viralen Glykoproteins mit einem oder mehreren Rezeptormolekülen in der zellulären Membran initiiert. Dabei bestimmt das zelluläre Rezeptorexpressionsprofil maßgeblich, welche Zellen von einem Virus infiziert werden können. Obwohl das Hüllprotein von HERV-K(HML-2) auf vielen gesunden und auch maligne entarteten Geweben exprimiert wird, ist bisher nur sehr wenig darüber bekannt [253], [84]. Dies ist vor allem auf zwei Ursachen zurückzuführen: die äußerst schwache Proteinexpression in Säugerzellen, auch unter einem starken Promotor, und die Möglichkeit, dass das Hüllprotein durch postinsertionale Mutationen funktionell beeinträchtigt worden sein könnte [314]. Im Jahr 2005 konnte gezeigt werden, dass das HERV-K108 Glykoprotein noch immer funktionell ist [84]. Darüber hinaus ist ein aus einer *in silico* generierten HERV-K-Consensus Sequenz gebildeter HERV-K-Prototyp in der Lage, Viruspartikel zu bilden und Zellen zu infizieren [85], [186].

In dieser Arbeit sollten Strategien entwickelt werden, um zum Einen die schwache Expression zu steigern und zum Anderen mögliche postinsertionelle Veränderungen zu beseitigen. Dies sollte es ermöglichen, das Hüllprotein in dem Zustand zu untersuchen, in dem es vor über 600.000 Jahren die Keimbahninfektion initiieren konnte [313]. Das HERV-K113 Provirus ist eines der am bestuntersuchten ERVs. Es besitzt für alle viralen Proteine offene Leserahmen, ist jedoch durch postinsertionelle Mutationen verändert und damit auch in seiner Funktionalität beeinträchtigt worden [140], [9]. Auch das Hüllprotein ist von diesem evolutionären Prozess betroffen gewesen.

#### 4.1.1 Rekonstitution des Hüllproteins

Mit Hilfe einer synthetischen DNA-Sequenz, deren Codons an den tRNA-Gebrauch von Säugerzellen angepasst wurden, konnte die Expression des HERV-K113 Hüllproteins um das über 50-fache gesteigert werden. Codonoptimierungen sind bereits mehrfach

erfolgreich durchgeführt worden, um die Expression verschiedener retroviraler Proteine, darunter auch Glykoproteine, zu verstärken [80], [224]. Die Ursachen für die schwache Genexpression sind vielfältig. Die retroviralen Gene eines Provirus müssen fein-abgestimmt exprimiert werden, damit eine optimale Replikation stattfinden kann. Einige virale Proteine können auch zytotoxisch sein und so Zellviabilität vermindern. Andererseits stehen die viralen DNAs, RNAs und Proteinsequenzen unter einem permanenten Selektionsdruck. Vor allem virale RNAs sind Ziel der antiviralen Abwehr, die spezifisch Transkripte degradiert und somit zu einer niedrigeren Proteinexpression beiträgt. Erst kürzlich sind einige microRNAs identifiziert worden, die exogene und endogene Retroviren, darunter auch HERV-K, als Ziel haben [130]. Zudem weisen die HERV-K Env-Nukleotidsequenzen eine Vielzahl seltener Codons auf und der GC-Gehalt ist im Vergleich zu humanen Sequenzen sehr niedrig. Hinzu kommt, dass durch instabile RNAs und durch internes, alternatives Spleißen der *rec*-RNA die Translation weiter vermindert wird.

Aufgrund der deutlich effizienteren Env-Expression war es nun möglich, den Einfluss der postinsertionellen Mutationen zu untersuchen. Dafür wurden die entsprechenden Aminosäureaustausche identifiziert und korrigiert. Das so wiederhergestellte „altertümliche“ Hüllprotein eines infektiösen Retrovirus konnte nun mit dem heutigen Env verglichen werden. Es ist denkbar, dass diese Sequenzänderungen bereits vor der Integration stattgefunden haben, beispielsweise durch Fehler bei der reversen Transkription und/oder durch antivirale Proteine, wie die APOBEC-Deaminasen. APOBEC führt zu Deaminierungen von Cytidinen zu Uracil während der reversen Transkription und damit zur sogenannten „G zu A“-Hypermutation der proviralen Genome [187], [307], [134], [97]. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es unwahrscheinlich ist, dass die Reverse Transkriptase mehr als einen oder zwei Fehler pro Replikationsrunde macht und dass typische genomische Veränderungsmuster durch APOBEC in einer aktuellen Studie für HERV-K113 nicht belegbar waren, ist es wahrscheinlich, dass die meisten, wenn nicht sogar alle, Mutationen nach der Integration aufgetreten sind [186].

Ähnliche Strategien zur Identifizierung postinsertioneller Veränderungen wurden bereits von anderen Gruppen verwendet, wie beispielsweise bei der Konstruktion der

HERV-K Consensus-Sequenzen [85], [186]. Durch den hier verwendeten Ansatz war es jedoch möglich, zwischen potentiellen Mutationen und Polymorphismen zu unterscheiden, die nur bei einer kleinen Zahl von Elementen auftreten [140]. Für das Alignment wurden die Sequenzen von 11 sehr jungen HERV-K-Elementen verwendet. Evolutionär gesehen sind diese erst kürzlich in das humane Genom gelangt. Es ist sehr unwahrscheinlich, wenn auch nicht vollständig ausschließbar, dass die geteilten Polymorphismen durch unabhängige Mutationsereignisse an der gleichen Position oder durch ektopische Rekombinationen zwischen dem HERV-K113 Env und mindestens zwei anderen retroviralen Elementen entstanden sind [148]. Im Vergleich zwischen der wiederhergestellten oricoEnv-Sequenz und der Consensus-Sequenz lassen sich drei dieser Polymorphismen zeigen (Abbildung 13). Im Gegensatz dazu gibt es acht Aminosäureaustausche, die ausschließlich im heutigen HERV-K113 Env vorkommen bzw. nur in einem weiteren HERV-K auftreten. Die entsprechenden nicht-synonymen Mutationen wurden daher als postinsertionell betrachtet und in der Originalsequenz korrigiert. Bereits im Western Blot wiesen Unterschiede im Molekulargewicht der transmembranen Untereinheiten auf eine unvollständige Glykosylierung des heutigen Hüllproteins hin. Obwohl durch die Mutagenesen sogar eines der putativen Glykosylierungsmotive (N506K) des modernen Envs verloren gingen, konnte beim oricoEnv eine Erhöhung des Molekulargewichts nachgewiesen werden. Eine fehlerhafte Faltung und ein gestörter Transport durch das ER-Golgi-Netzwerk sind die wahrscheinlichsten Gründe für die eigentümliche Glykosylierung und die verminderte Stabilität des modernen HERV-K113 Env. Diese Annahme wird auch durch das sehr niedrige Expressionsniveau auf der Oberfläche und durch den mangelnden Einbau in Viruspartikel gestützt [84]. Im Gegensatz dazu erreicht die transmembrane Untereinheit des rekonstituierten oricoEnvs die Zelloberfläche und wird effizient in Viruspartikel eingebaut. Verschiedene Arbeitsgruppen berichteten bereits über die Wichtigkeit einer vollständigen SU- und TM-Glykosylierung in Hinblick auf Faltung, Transport, Prozessierung, Fusogenität und Immunogenität verschiedener retroviraler Hüllproteine [160], [258], [266]. Für das stark glykosylierte HIV-1 gp41 wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Mutation in einer der Glykosylierungsstellen zu erheblichen Einschränkungen im Env-Transport, in der

Prozessierung und fusogenen Aktivität führt [79], [101], [320]. Die Ursache dafür liegt in dem fast vollständigen Arrest des Proteins im Golgi-Apparat [101]. Auch HERV-W Hüllproteine bleiben im sekretorischen Kompartiment als fehlgefaltete Proteine zurück, wenn sie nicht glykosyliert werden [58].

An der fehlerhaften Glykosylierung des heutigen coEnvs und der damit verbundenen mangelhaften Inkorporation in Viruspartikel und Infektiosität sind zwei der acht Aminosäureaustausche maßgeblich beteiligt [13], [84], [133]. Untersuchungen im Rahmen der Diplomarbeit von Sandra Seeher am RKI zeigten, dass zwei Arginin zu Cystein-Austausche (R140C und R577C) hauptverantwortlich für die fehlerhafte Faltung des coEnvs sind [133]. Vor allem diese beiden Aminosäuresubstitutionen führen zu einer nichtfunktionellen Glykosylierung, was zwangsläufig den Nichteinbau in Viruspartikel nach sich zieht. Im Gegensatz dazu ist die Pseudotypisierung mit dem ursprünglichen oricoEnv sehr effizient. Das Protein vermittelt effektiv den Viruseintritt in die Zielzellen, was beweist, dass das Hüllprotein funktionell wieder hergestellt wurde. Sobald im oricoEnv die putativen Orte der N-Glykosylierung oder die Prozessierungsstelle zerstört werden, kann das Protein nicht mehr in Viruspartikel eingebaut werden.

#### **4.1.2 Der Einfluss C-terminaler Modifikationen auf die Eigenschaften des Hüllproteins**

Das HERV-K(HML-2) Env hat eine relativ kurze zytoplasmatische Domäne von nur 44 Aminosäuren [84]. Es ist bereits von anderen Retroviren bekannt, dass Verkürzungen des zytoplasmatischen Bereichs den Partikeleinbau und die Fusogenität eines Hüllproteins beeinflussen können [54], [74], [165]. Für MLV und verwandte  $\gamma$ -Retroviren ist ein sogenanntes R-Peptid beschrieben worden. Dieses kurze C-terminale Peptid des Hüllproteins wird durch die virale Protease während der Reifung abgespalten. Erst dadurch erlangt das Env seine vollständige Fusogenität. Obwohl es keinen Beweis dafür gibt, dass das HERV-K(HML-2) Env ein solches R-Peptid besitzt, wurde untersucht, ob eine C-terminale Verkürzung durch Einführen eines Stopp-Codons die inkorporativen und infektiösen Eigenschaften des HERV-K113 Hüllproteins beeinflusst. Eine Verkürzung

um 41 Aminosäuren, bei der nur drei Aminosäuren an der zytoplasmatischen Domäne verbleiben, führt zu einem fünffach stärkeren Partikeleinbau und erhöht die Infektiosität der pseudotypisierten SHIV-Partikel um das fast 100-fache gegenüber dem unverkürzten oricoEnv. Der verbesserte Einbau der Verkürzungsmutante konnte auch in HERV-K-Partikeln beobachtet werden. Auch wenn der dafür verantwortliche Mechanismus unbekannt ist, ist es denkbar, dass eine starke Verkürzung des zytoplasmatischen Anteils eine höhere Env-Dichte im knospenden Partikel zulässt. Die verkürzten Envs weisen eine geringere Interferenz zwischen dem Matrixprotein der entstehenden Gag-Hülle und dem zytoplasmatischen Bereich auf [74], [108], [217]. Gerade für SIV-Partikel ist bereits beschrieben worden, dass Hüllproteine mit einem kurzen zytoplasmatischen Anteil besser in SIV-Partikel eingebaut werden [156], [265]. Es ist jedoch auch vorstellbar, dass durch die Verkürzungen die Transport- und Reifungskinetiken verbessert bzw. die Endozytoseraten vermindert werden. Dies würde ebenfalls in einer höheren Env-Konzentration auf der Partikeloberfläche resultieren.

C-terminale Verkürzungen erhöhen die Fusogenität einiger retroviraler Hüllproteine [54], [235], [272]. Die fast vollständige Inkorporation der Deletionsmutante in SHIV- (und auch HERV-K-) Partikel ist wahrscheinlich ein Grund für die deutlich höhere Infektiosität in den lentiviralen Pseudotypisierungsversuchen. Ein weiterer Grund könnte die erhöhte Mobilität der Envs in der viralen Membran und die damit verbundene verbesserte Zusammenlagerung der Env-Proteine während der Fusion sein [340]. Aufgrund der Verkürzung kann es auch zu einer strukturellen Veränderung der TM Ektodomäne kommen, die die Fusogenität des Proteins verbessert [94]. Erst durch weitere Experimente können die tatsächlichen Ursachen für diese Verstärkung ermittelt werden.

#### 4.1.3 Der Einfluss von SEVI auf die Infektiosität

Einen weiteren Teil der Arbeit stellte die Optimierung der Infektiosität durch infekti-onssteigernde Substanzen dar. Im Jahr 2007 publizierten Münch *et al.*, dass von der Prostata „prostatic acid phosphatase“ (PAP)-Fragmente (PAP248-286) ins Sperma sekretiert werden, die sich zu amyloiden Fibrillen zusammenlagern und so die Infektio-

sität von HIV-1 stark erhöhen [237]. Diese Fibrillen werden als „Semen derived enhancer of Infection“ (SEVI) bezeichnet. Der infektionssteigernde Effekt beruht dabei auf der stark positiven Ladung und dem  $\alpha$ -helikalen Aufbau der Fibrillen [273], [38]. Aufgrund ähnlicher negativer Ladungsverhältnisse stoßen sich die Virusmembran und die zelluläre Membran ab. Durch SEVI wird diese elektrostatische Abstoßung gesenkt und es dem Virus erleichtert, die zelluläre Membran mit ihren Rezeptoren zu erreichen. Hinzu kommt, dass PAP(248-286) selbst die Integrität der Membran schwächen kann [38].

**XMRV-Env** Der infektionssteigernde Effekt von SEVI wurde zunächst anhand des stark infektiösen und replizierenden  $\gamma$ -Retrovirus XMRV untersucht. XMRV ist das erste  $\gamma$ -Retrovirus, für das gezeigt werden konnte, dass es menschliche Zellen infiziert. Aufgrund des tumorigenen Potentials der Familie der  $\gamma$ -Retroviren steht auch XMRV unter Verdacht, an der Krebsentstehung, vor allem bei Prostata Tumoren, beteiligt zu sein [286], [166], [315]. Vor allem in Nordamerika, nicht aber in nord- und mitteleuropäischen Ländern wie Deutschland, ließ sich XMRV in Patientenmaterial von Prostata Tumoren nachweisen [315], [286], [143], [104]. Die XMRV-Infektion ist weiterhin gehäuft in Patienten mit dem chronischen Müdigkeitssyndrom nachweisbar [192].

Um den stimulatorischen Effekt von SEVI zu untersuchen, wurden mit XMRV-Env pseudotypisierte SHIV-Partikel verwendet. Der Vorteil der „single round“ Pseudotypen ist, dass die Viruspartikel nach erfolgreicher Infektion und Integration keine neuen Viren bilden können und somit tatsächliche Infektionsraten unabhängig von der zellulären Replikation quantitativ ermittelt werden können. Sowohl durch SEVI als auch durch Samenflüssigkeit konnten die Infektionsraten erheblich verstärkt werden. Diese steigernden Effekte ließen sich in Prostatazelllinien und Nichtprostatazelllinien nachweisen [144]. Dabei war der infektionssteigernde Effekt von SEVI dosisabhängig. Eine optimale Verstärkung ließ sich bei Konzentrationen von 10 bis 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erreichen. In früheren Studien mit HIV-1 wurde gezeigt, dass der SEVI-Effekt bei niedrigen Virusdosen am stärksten ist [237]. Auch für das XMRV-Env konnte ein solcher Zusammenhang gefunden werden. Dies ist vor allem deshalb interessant, weil die niedrigen Virusdosen der physiologischen Situation am nächsten kommen [315].



Die Ergebnisse mit den SHIV-Pseudotypen verdeutlichen auch, dass der SEVI-Effekt spezifisch für das Hüllprotein ist. Das Hüllprotein muss funktionell sein und die Zelle infizieren können. In Versuchen, in denen das infektiionsdefiziente  $\Delta$ KS-Hüllprotein von HIV-1 verwendet wurde, war weiterhin keine Infektiosität feststellbar. Der SEVI-Effekt verstärkt also nur die spezifische Virusanlagerung und Rezeptorbindung. Auch mit Samenflüssigkeit konnten Erhöhungen der Infektionsraten erreicht werden. Diese beruhen wahrscheinlich auf dem Vorhandensein von SEVI im Sperma. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch weitere Faktoren einen verstärkenden Effekt ausüben.

**HERV-K113 Env** In einem weiteren Versuch wurde der Effekt von SEVI auf das HERV-K113 Hüllprotein untersucht. Dies ist aus zweierlei Sicht interessant. Zum einen konnte das ursprüngliche HERV-K113 Env Keimbahnzellen infizieren. Dies könnte durch sexuelle Übertragung erreicht worden sein. Zum anderen konnte für die HERV-K-Familie bisher keine Replikation nachgewiesen werden. Die Verwendung von infektiionsstimulierenden Agenzien wäre daher eine Möglichkeit, die Infektionsbedingungen weiter zu verbessern.

Auch für das HERV-K113 Env konnte eine erhebliche Verstärkung der Infektionsraten unter SEVI festgestellt werden. Diese betrug je nach SEVI-Konzentration bis zu Faktor 10 gegenüber den unbehandelten Überständen. Bei einer SEVI-Konzentration von 50  $\mu$ g/ml ist der verstärkende Effekt am höchsten. Damit sind die SEVI-vermittelten Steigerungsraten des HERV-K113 Envs mit denen des XMRV Envs nahezu identisch. Auch in mit Samenflüssigkeit behandelten Überständen ließ sich ein verstärkender Effekt von Faktor 4 messen.

Eine SEVI-vermittelte Steigerung der Infektionsrate konnte für HERV-K113 nur in einem lentiviralen Pseudotypen-System gezeigt werden. Da die Replikationsrate von HERV-K113 auch unter SEVI Zugabe unterhalb der Nachweisgrenze lag, konnten keine diesbezüglichen Daten ermittelt werden (unpublizierte Daten, Bannert *et al.*).

Dennoch sind die HERV-K Env vermittelten Infektionsraten sehr schwach. Ein lentivirales Reportersystem könnte nicht die optimalen Bedingungen für eine Pseudotypisie-

rung mit dem HERV-K113 Env bieten, da zu wenig Env-Protein in das Virus eingebaut wird. Zwar reicht laut Aussage von Yang *et al.* ein funktionelles Trimer aus, um eine Zelle mit HIV-1 zu infizieren [344], [343]. Einige andere Gruppen berichteten jedoch, dass neben der Rezeptorerkennung durch ein Env-Trimer, weitere Trimere aktiv sind, um die umliegenden zellulären Rezeptoren an dem Ort der Infektion zu konzentrieren [112], [295]. Für HERV-K113 ist aber weder der Rezeptor noch die Stöchiometrie, über die das Env eine Infektion vermittelt, bekannt. Weiterhin wurde beobachtet, dass andere retrovirale Hüllproteine deutlich höhere Infektionsraten im SHIV-Pseudotypen-System erreichen. So waren die gemessenen Infektionsraten durch das VSV-Env oder das XMRV-Env ein bis drei Logstufen höher als beim HERV-K113 Env. Dass das virale System, mit dem HERV-K Envs pseudotypisiert werden, eine wichtige Rolle spielt, konnte bereits durch Dewannieux *et al.* gezeigt werden [84]. Das funktionelle HERV-K108 Hüllprotein ließ sich am besten auf SIV-Partikel einbauen. Pseudotypisierte HIV-Partikel zeigten eine viermal schwächere Infektiosität, MLV-Partikel zeigten keinerlei Infektionsraten. Dies untermauert die Notwendigkeit, ein gut exprimierendes HERV-K-basierendes Reportersystem zu etablieren.

## 4.2 Funktionelle Charakterisierung des HERV-K Rec-Proteins

### 4.2.1 Optimierung der Expression

Das HERV-K113 Rec-Protein ist ein akzessorisches Protein, welches in der frühen Replikationsphase gebildet wird. Es besitzt eine Kernlokalisationssequenz, die es ihm ermöglicht, nach der Bildung im Zytoplasma in den Zellkern, genauer gesagt in die Nukleoli, einzuwandern [205]. Dort bindet es an die entstehenden HERV-K-Transkripte, die ein RcRE besitzen [207], [206]. Über seine Kernexportsequenz (NES) bindet es wahrscheinlich an das Exportprotein Crm1 und bewirkt so, dass der Komplex aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert wird.

Da das HERV-K113 Rec und das Hüllprotein in den ersten 87 Aminosäuren identisch sind, überrascht es nicht, dass auch das wtRec nur sehr schwach exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde eine Codonoptimierung durchgeführt. Die Expressionssteigerung

war enorm. Das codonoptimierte coRec wird 80-mal stärker als das wtRec exprimiert. Beide Proteine sind hauptsächlich in den Nukleoli lokalisiert. Auffällig ist jedoch in Western Blots, dass das coRec eine deutlich höhere Affinität besitzt zu multimerisieren. Boese *et al.* konnten 2001 zeigen, dass für eine Rec-Multimerisierung ein Bereich zwischen Aminosäure 47 und 87 genügt. Absolut essentiell ist aber der Bereich zwischen der 75. und 87. Aminosäure [27]. Diese Region umfasst auch die zweite Leucin-reiche Domäne des Recs, welche sowohl mit dem PLZF interagiert, als auch unter Verdacht steht, die NES in ihrer Exportfunktion zu unterstützen [27], [81], [128]. Da die Aminosäuresequenz in beiden Proteinen jedoch absolut identisch ist, kann die verstärkte Multimerisierung nur konzentrationsbedingt sein. Im retroviralen Replikationszyklus ist die Akkumulation der RNA-Transportproteine ein wichtiges Signal, um von der frühen in die späte Replikationsphase überzugehen [261], [301]. Erst wenn ausreichend RNA-Transportprotein im Zellkern akkumuliert, darf das Shuttle-Protein an die virale Vollängen-RNA bzw. Env-RNA binden, damit ein vorzeitiges Spleißen verhindern und so die Translation der Strukturproteine bzw. den Transport der genomischen Virus-RNA initiieren [261], [301].

Aminosäuresequenzvergleiche des HERV-K113 Rec mit den Rec-Protein-Sequenzen aus zehn nahe verwandten HERV-K Proviren zeigten, dass auch das Rec-Protein von post-insertionellen Mutationen betroffen ist. Es haben zwei einzigartige Aminosäureaustausche stattgefunden: an der Position A89T und E96D. Beide Substitutionen liegen im zweiten Exon, für das noch keine intrinsische Funktionalität beschrieben worden ist. Um dennoch sicher zu gehen, dass das HERV-K113 Rec auch wirklich funktionell sein kann, wurden beide Aminosäuresubstitutionen rückgängig gemacht. Sowohl in der Expression, der Oligomerisierung als auch der Lokalisation verhalten sich das coRec und das neu gebildete oricoRec nahezu identisch. Da das oricoRec jedoch der Consensus-Sequenz aus allen verglichenen HERV-K Rec-Sequenzen entspricht, wurde mit diesem Konstrukt durchgängig weiter gearbeitet.

Die vornehmliche Lokalisation des Recs in den Nukleoli ist wahrscheinlich entscheidend für dessen Funktionalität. Die Nukleoli sind hochdynamische, sphärische Strukturen, in denen Proteine und RNAs (vielleicht auch DNAs) dicht gepackt sind (zusammenge-

fasst in [1]). Sie sind essentiell für die Synthese, Assemblierung und Speicherung von Makromolekülen, die eine wichtige Rolle bei der Genexpression spielen. Zudem sind sie mit Abschnürungen der Chromosomen, den sogenannten „nucleolar organizers“, assoziiert, die eine wichtige Rolle bei der Synthese der ribosomalen RNAs spielen. Darüber hinaus finden sich zahlreiche regulatorische RNAs, wie snRNAs (small nuclear RNAs) oder snoRNAs (small nucleolar RNAs), in den Nukleoli. Diese regulatorischen RNAs sind in den Aufbau verschiedener Ribonukleopartikel (RNP) wie den „heterogenous ribonucleoproteins“ (hnRNP), den snRNPs und snoRNPs, involviert. Die gebildeten Ribonukleopartikel bestehen aus RNAs und sechs bis zehn verschiedenen Proteinen. Die Zusammensetzung dieser Partikel ist entscheidend für das spätere Schicksal der verpackten RNAs.

#### 4.2.2 Die Suche nach weiteren Interaktionspartnern

Im Gegensatz zum HIV-1 Rev oder dem HTLV-1 Rex-Protein ist über das Rec-Protein nur sehr wenig bekannt. Die funktionelle Forschung fußte bisher hauptsächlich auf dem Rec-vermittelten RNA-Transport. Außer dem Crm1-Protein ist kein weiteres Protein bekannt, das das HERV-K113 Rec in seiner Funktion unterstützt. Wie bereits unter Abschnitt 1.2.5 erwähnt, wird eine Rec-Expression mit einer Reihe von Tumoren in Verbindung gesetzt [198], [200], [236], [47]. Transgene Mäuse, die Rec exprimierten, zeigten beispielsweise eine gestörte Keimzellentwicklung und einige Tiere zeigten sogar degenerative Läsionen, die den Läsionen von Seminomen sehr ähnelten [110]. Vor allem die Interaktion von Rec mit dem PLZF steht unter Verdacht, Keimzelltumore auszulösen [28], [81].

Um die Funktionsweise des Recs genauer zu beleuchten und um weitere Hinweise zu erhalten, wie Rec den Wertsstoffwechsel beeinflussen kann und somit zur Tumorentstehung beiträgt, wurden „Yeast Two-Hybrid“-Versuche durchgeführt. In einer Milzbibliothek wurde nach potentiellen Interaktionspartnern für das HERV-K113 wtRec gesucht. In 108 getesteten Klonen wurden drei putative Interaktionspartner identifiziert: eine extrazelluläre Domäne des „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR), das humane

Staufen-1 Protein und das hSGT. Keines der gefundenen Proteine erscheint auf der Liste der häufig als falsch positiv identifizierten Interaktionspartner, die unter <http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html> zu finden ist. Aufgrund seiner extrazellulären Lokalisation, wurde die Domäne des EGFRs jedoch als Interaktionspartner des Rec-Proteins ausgeschlossen. Die Bindung der beiden anderen Proteine wurde durch YTH-Spezifitätstests bestätigt. In einem weiteren Versuch wurde sichergestellt, das auch das synthetisch hergestellte oricoRec mit Staufen-1 und hSGT im „Yeast Two Hybrid“-Ansatz interagiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden nun die Interaktionen zwischen dem HERV-K oricoRec und Staufen-1 bzw. hSGT näher untersucht.

#### 4.2.3 Rec-Interaktion mit Staufen-1

**Das humane Staufen-1 Protein** Im „Yeast Two-Hybrid“-Versuch wurden vier Klone identifiziert, die den kompletten C-terminalen Bereich (Aminosäure 243 bis 495) von Staufen-1 als Rec-Interaktionspartner enthielten. Staufen-1 stellt ein *bona fide* RNA Transportprotein dar, dessen Funktion von den niedrigen bis hin zu den hohen Eukaryonten konserviert ist. Entdeckt wurde das Protein bei Untersuchungen der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster*, bei der es entscheidend bei der Determination der anteroposterior Achse mitwirkt und so die Ausbildung der Zellsymmetrie während der Zellteilung und Differenzierung reguliert [287], [271]. Es spielt zudem eine wichtige Rolle in der Lokalisierung verschiedener mRNAs in *Drosophila melanogaster*, indem es entweder direkt mit den Ziel-RNAs interagiert oder Bestandteil von RNP-Komplexen ist [176], [211].

Das humane Staufen-1 Protein ist ein RNA-bindendes Protein, das sowohl an ssRNAs als auch an dsRNAs bindet. Voraussetzung dafür ist eine umfangreiche dsRNA-Sekundärstruktur [218], [335]. Das Protein setzt sich aus vier Doppelstrang RNA-Bindedomänen (dsRBD) zusammen, wobei nur eine dieser Domänen, die dsRBD3-Region, effizient an dsRNA bindet [335]. Die dsRBD3-Region besitzt eine kompakte  $\alpha\beta\beta\alpha$ -Struktur, über die die ausgeprägte dsRNA-Sekundärstruktur erkannt wird [268]. Zu-

sätzlich wird es Staufen-1 durch eine Tubulin-bindende Domäne ermöglicht, mit dem zellulären Transportnetzwerk zu interagieren [335].

Das humane Staufen-1 wurde zunächst vor allem in Dendriten und differenzierten Neuroblasten untersucht. Es interagiert dort mit einer Vielzahl von Proteinen und realisiert über die Bildung von RNA-Transport-Granula den neuronalen Transport in die Dendriten [164], [176], [303], [89], [159]. Es häufen sich jedoch zunehmend Berichte, dass Staufen-1 ubiquitär in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert wird und dort in den mRNA-Transport involviert ist. In verschiedenen Zelllinien lokalisiert Staufen-1 im Zytoplasma in Assoziation mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum [218]. Dies impliziert, dass die mRNA über das Mikrotubuli-Netzwerk zum rER transportiert wird, dem Ort der Translation. Zusätzlich besitzt Staufen-1 translationsregulatorische Aufgaben [172], [168], [167]. Das Protein stimuliert beispielsweise die Translation reprimierter mRNAs, die in ihrer 5'UTR ein bestimmtes Erkennungsmotiv tragen [168]. Andererseits ist Staufen-1 auch ein wesentlicher Bestandteil eines erst kürzlich entdeckten RNA-Abbau-Mechanismus [167].

Interessanterweise interagiert Staufen-1 mit viralen Proteinen. So bindet es an das p55Gag-Vorläuferprotein von HIV-1 und beeinflusst die Gag-Multimerisierung [57], [56], [55]. Außerdem wird es zusammen mit der HIV-1 RNA in Viruspartikel verpackt, was impliziert, dass Staufen-1 am viralen mRNA-Transport beteiligt ist [57].

**Bestätigung der Rec-Staufen-1-Interaktion** Mit dem HERV-K Rec wird nun in dieser Arbeit ein zweites retrovirales Protein beschrieben, das mit Staufen-1 interagiert. Mit Hilfe von Coimmunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass Rec und Staufen-1 auch in humanen Zellen aneinander binden und dass diese Interaktion von keinen Hefe-spezifischen Faktoren abhängig ist. Coimmunfluoreszenz-Experimente zeigten, dass beide Proteine in räumliche Nähe zueinander kommen. Dies geschieht zum Einen im Zellkern und zum Anderen im Zytoplasma. Eine physiologische nukleoläre Lokalisation von Staufen-1 ist bisher von keiner Gruppe beschrieben worden (persönliches Gespräch mit Andrew Mouland). Für das nah verwandte Homolog Staufen-2, welches im Gegensatz zum ubiquitären Staufen-1 primär in Neuronen exprimiert wird, konnte

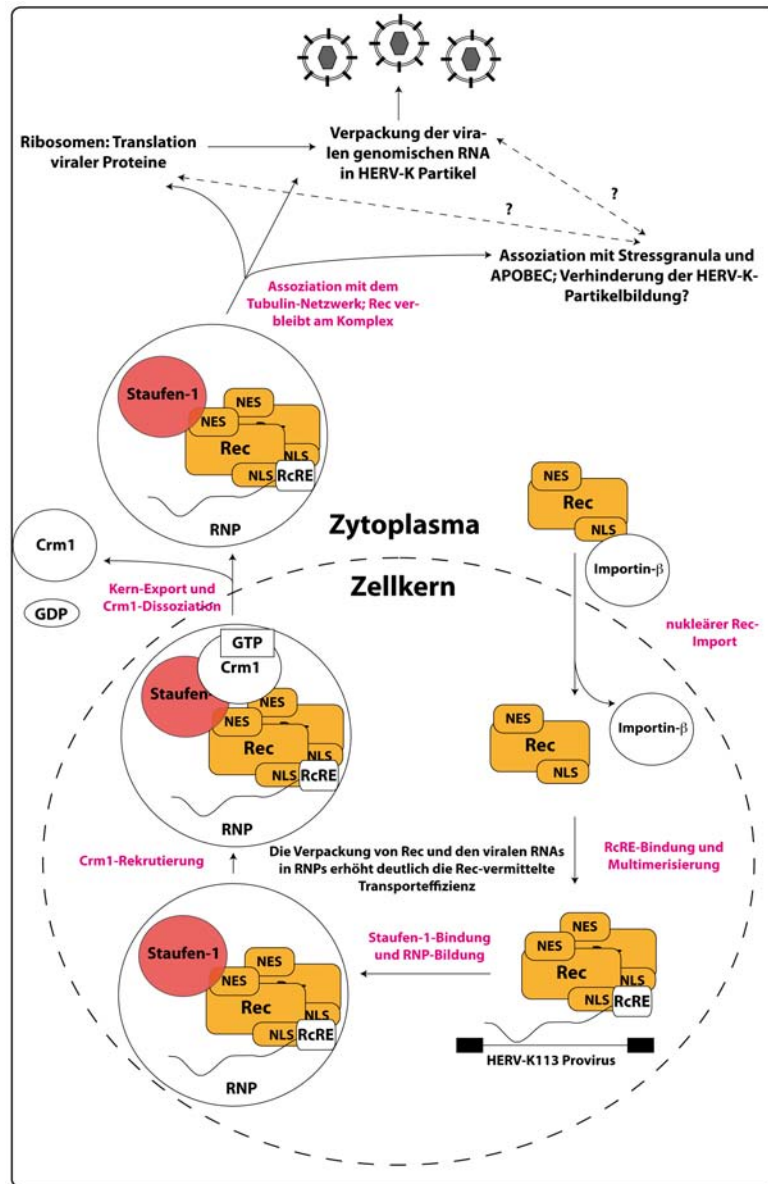
jedoch gezeigt werden, dass es zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma hin- und hertransportiert wird [201], [230]. Auch Staufen-2 wird ausschließlich im Zytoplasma in der perinukleären Region und am rER detektiert. Wird jedoch die RNA-bindende Region dsRBD3 zerstört, akkumuliert das Protein im Zellkern. Dabei spielt das Kernimportsignal (NLS) in der Nähe der dsRBD3-Domäne eine entscheidende Rolle. Im Kern werden die zu transportierenden RNAs in Ribonukleopartikel verpackt und mit Hilfe von Exportin-5 oder Crm1 in das Zytoplasma transportiert [201], [230]. Für die Funktionalität von Staufen-1 muss ein ähnlicher nukleärer Import stattfinden. Erste konkrete Hinweise darauf geben die in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenz-Experimente. Interagiert Staufen-1 mit Rec im Zellkern, könnte dies die zelluläre Distribution beider Proteine beeinflussen. Die beobachtete Akkumulation im Zellkern könnte durch eine hohe Rec-Anreicherung in den Nukleoli verursacht worden sein. Dass virale Proteine die Verteilung von Staufen-1 beeinflussen können, zeigt das NS1-Protein von Influenza [99]. Wird dieses vornehmlich nukleär exprimierte Protein überexprimiert, dann ändert sich die subzelluläre Verteilung von Staufen-1 und das Protein ist im Zellkern nachweisbar. Worauf diese Akkumulation tatsächlich beruht, auf einem verstärkten Staufen-1 Import oder einem verminderten Staufen-1 Export, blieb jedoch offen.

Die dsRBD3-Domäne ist eine der Hauptfunktionsdomänen des Staufen-1 Proteins [335]. Die Erkennung und Bindung der zu transportierenden RNAs findet über diesen Bereich statt. Außerdem könnte diese Region am nukleären Export beteiligt sein. Wie bereits erwähnt, interagiert die RBD3-Domäne des Staufen-2 Proteins mit den Kernexportfaktoren [201], [230]. Für eine nukleozytoplasmatische Translokation spricht auch die Tatsache, dass in der Staufen-1-Transportgranula neben ribosomalen Komponenten, Proteinen des Zytoskellets und Motorproteinen, auch RNA-bindende Proteine vorkommen, die normalerweise nur im Nukleus vorkommen [196], [321], [37]. Dazu gehören unter anderem Nukleolin, die RNA Helicase A und hnRNP U [37], [196]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Pull Down-Experimente zeigen, dass die dsRBD3 Region für die Interaktion mit dem HERV-K Rec Protein verantwortlich ist. Der interagierende Bereich liegt dabei im C-terminalen Teil der Domäne. Um auszuschließen, dass

die Rec-Staufen-1-Interaktion auf einer gemeinsam gebundenen RNA beruht, wurden verschiedene Deletionsmutanten für die Bindungsassays verwendet. Eine Mutante, der der RNA-Bindungsbereich fehlt, jedoch den C-terminalen Anteil der dsRBD3-Domäne besitzt, ist weiterhin in der Lage mit Rec zu interagieren. Zusätzlich wurden potentiell kontaminierende RNAs durch Inkubation mit einem RNase/DNase-Gemisch zerstört. Interessanterweise ist die dsRBD3-Region auch für die Interaktion mit der Nucleocapsid-Domäne des p55Gag-Vorläufers verantwortlich [56], [57]. Die Staufen-1-Gag-Interaktion ist wichtig für die HIV-1 Partikelbildung. Ein knockdown oder eine Überexpression von Staufen-1 führen zu einer verminderten Infektiosität von HIV-1 [57]. Weiterhin interagiert Staufen-1 mit der ungespleißten, genomischen RNA von HIV-1 und spielt damit eine Rolle bei der genomischen Verpackung dieser RNA [57]. Der N-Terminus von Staufen-1 trägt zur Multimerisierung der Gag-Fragmente bei. Staufen-1 ist demnach ein zelluläres Protein, welches von der Virusmaschinerie verwendet wird, um infektiöse Partikel zu bilden. Es ist jedoch noch offen, wie Staufen-1 und das HIV-1 p55Gag in räumliche Nähe zu einander kommen, um diese Interaktion einzugehen oder durch welchen Mechanismus Staufen-1 die genomische Virus-RNA bindet [56].

**Modell der Rec-Funktionen** Zusammen mit dem Konzept der RNA-Verpackung in granuläre Strukturen könnte das retrovirale RNA-Transportprotein eine entscheidende Rolle zur Beantwortung dieser Frage spielen. Zwar ist eine Staufen-1 Interaktion weder für das HERV-K113 Gag noch das HIV-1 Rev gezeigt worden, dennoch könnte, aufgrund der Ähnlichkeit der verwendeten Transportmechanismen, eine Verbindung zwischen dem RNA-Transportprotein, der viralen RNA und dem entsprechenden Gag-Protein bestehen. Aufgrund bisheriger Erkenntnisse lassen sich alle drei Proteine in einem Modell zusammenfassen. In diesem Modell, welches in Abbildung 53 schematisch dargestellt ist, bindet das RNA-Transportprotein im Zellkern sein entsprechendes responsives Element in der zu transportierenden viralen RNA. Diese RNA-Bindung führt einen Konformationswechsel herbei, der bewirkt, dass das Transportelement an der RNA multimerisieren und so ein frühzeitiges Spleißen verhindern kann. Gleichzei-





**Abbildung 50: Modell der Rec-Interaktion mit Staufen-1 und der Effekt auf die Virusreplikation:**

Nach seiner Synthese bindet Rec über sein Kernlokalisierungssignal (NLS) an den Kernimportfaktor Importin-β und gelangt so in den Zellkern. Dort erkennt das Protein das RcRE der HERV-K113 RNAs, bindet an diese und multimerisiert mit anderen Rec-Proteinen. Die RNA-Bindung bewirkt einen Konformationswechsel und legt die Kernexportsequenz (NES) frei. Gleichzeitig interagiert der Rec-RNA-Komplex mit Staufen-1 und bildet einen Ribonukleoproteinkomplex (RNP) aus. Dieser Komplex interagiert mit dem Kernexportfaktor Crm1 und wird so aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma wird das an Crm1 gebundene GTP hydrolytisch gespalten, und Crm1 wird aus dem Komplex freigesetzt. Staufen-1 interagiert mit dem Tubulinnetzwerk. Auf diesem Weg gelangen Rec und die transportierte HERV-K113 RNA entweder zu den Ribosomen, wo die viralen Proteine translatiert werden oder zu dem Ort der Virus-RNA-Verpackung. Unter Stressbedingungen wandert Staufen-1 zusammen mit Rec vornehmlich in die Stressgranula ein, wo sich auch antivirale Proteine wie APOBEC befinden. Die Auswirkungen auf die HERV-K113 Translation oder RNA-Verpackung sind jedoch noch unbekannt.

tig bewirkt die Konformationsänderung, dass die Kernexportsequenz freiliegt. Diese ist essentiell für den Kernexport, aber auch für die Bindung des Transportproteins an Proteine der Ribonukleoproteinpartikel, wie Staufen-1. Erst durch die Interaktion mit Staufen-1 und der damit verbundenen Assemblierung eines Transportkomplexes erfolgt die Assoziation mit den Kernexportfaktoren wie Crm1. Der Komplex wird unter Rekrutierung und Spaltung von RanGTP durch die Nukleopore in das Zytoplasma transportiert. Mit Hilfe der Tubulin-bindenden-Domäne von Staufen-1 ist ein gerichteter Transport des viralen RNA-Protein-Komplexes über das Mikrotubulinetzwerk zu den Ribosomen möglich. Hier erfolgt die Translation der viralen Vollängen-RNA, was zur Bildung von Gag führt. Gag kann nun an den Ribosomen akkumulieren und ebenfalls mit Staufen-1 interagieren. Gleichzeitig ermöglicht eine Transportprotein-Gag-Interaktion die Verknüpfung der genomischen Virus-RNA mit dem Nukleokapsid des Gag-Vorläufers und somit die Genomverpackung. Das virale RNA-Transportprotein verbleibt während des Prozesses permanent an der viralen RNA und dissoziiert erst ab, wenn die RNA translatiert, abgebaut oder verpackt worden ist.

Für dieses Modell sprechen auch neuere Erkenntnisse über das HIV-1 Rev-Protein. Verschiedene Gruppen berichteten bereits, dass Rev die viralen ungespleißten und partiell gespleißten RNAs so „markiert“, dass diese ganz gezielt transportiert, translatiert und verpackt werden [33], [219], [301]. Ein Beispiel dafür ist Rev-unabhängig translatiertes Gag, welches innerhalb des Zytoplasms grundsätzlich anders lokalisiert ist, als Rev-abhängig translatiertes Gag. Außerdem sind *gag-pol*-RNAs, die Rev-unabhängig den Zellkern verlassen, nicht in der Lage, mit Polysomen zu assoziieren und werden daher nicht effizient translatiert [4]. Dass das Rev im Zytoplasma an seinem RRE zu verbleiben scheint, wurde bereits Anfang der 1990er Jahre durch Arrigo *et al.* und Lawrence *et al.* gezeigt [5], [184]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass Rev bei der Verpackung der genomischen HIV-1 RNA eine Rolle spielt. Die Markierung der genomischen RNA durch Rev ermöglicht es dem Gag-Protein, diese gezielt aus dem riesigen Pool zellulärer RNAs zu selektieren und in Viruspartikel zu verpacken. Brandt *et al.* publizierten im Jahr 2007, dass die Rev-RRE Interaktion wichtig bei der Selektion der Vollängen-RNA während der Kapsidbildung ist [35]. Interessanterweise scheint die Bindung des

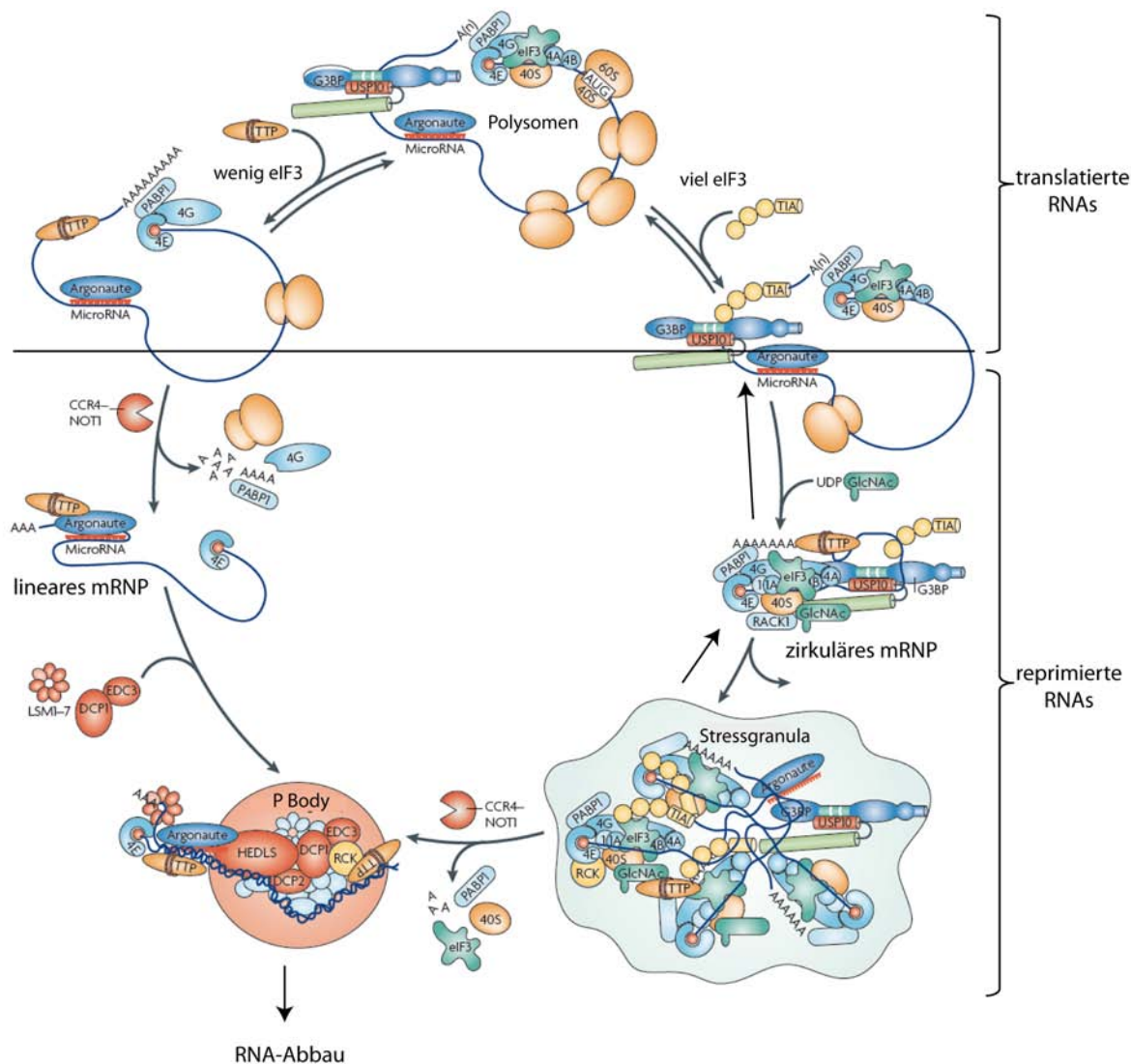
Revs an das RRE bereits im Kern erfolgen zu müssen. Ein Rev, dessen NLS ausgeschaltet wurde und daher nicht mehr in den Zellkern einwandern kann, kann nicht mehr die Verpackung der genomischen RNA unterstützen [126]. Auch Beobachtungen von Jouvenet *et al.* unterstützen diese Erkenntnisse. Diese Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Verpackung der viralen RNA in knospende Gag-Partikel. Nur wenn die virale Reporter-RNA ein RRE enthielt und Rev in *trans* hinzugegeben wurde, waren eine Verpackung der RNA und eine effektive Knospung feststellbar [158]. Auffällig war zudem, dass die virale RNA zuerst die Plasmamembran erreicht, dort (wahrscheinlich durch wenige, nicht nachweisbare Gag-Moleküle) mit der Membran assoziiert und erst anschließend die Gag-Assemblierung an diesen RNAs stattfindet.

**Weiterführende Indizien für das Rec-Staufen-1 Model** Die nächste Frage war nun, ob es für dieses Modell in HERV-K113 Beweise bzw. Indizien gibt. In der Tat zeigten Experimente, in denen der Einfluss von Staufen-1 auf den Rec-vermittelten RNA-Transport untersucht wurde, dass durch Zugabe von Staufen-1 vermehrt ungepleißte Reporter-RNA transportiert wird. Dieser Effekt konnte mit Konstrukten ohne das RcRE nicht gemessen werden. Auch auf Ebene der viralen Partikelbildung war ein eindeutiger Staufen-1 Effekt feststellbar. Durch Staufen-1 Zugabe war 15-mal mehr HERV-K113 Gag im Überstand detektierbar. Auch Chatel-Chaix *et al.* haben durch Staufen-1 Zugabe einen Anstieg in der Gag-Freisetzung messen können [57]. Die gebildeten Partikel waren jedoch nicht infektiös, was darauf hinweist, dass für eine effektive Viruspartikelbildung eine feinabgestimmte zelluläre Staufen-1-Konzentration notwendig ist.

Einen weiteren Ansatz lieferten die Immunfluoreszenzaufnahmen, die zeigten, dass die Rec-Interaktion mit Staufen-1 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma stattfinden kann. Da der Rec-vermittelte Kernexport bereits gut charakterisiert ist, wurde das Phänomen des extranukleären Recs näher untersucht. Wie bereits im Abschnitt 3.2.6 erwähnt wurde, konnten selten aber reproduzierbar Zellen beobachtet werden, die eine völlig umgekehrte Rec und Staufen-1-Verteilung aufwiesen. In diesen Zellen fand eine starke Colokalisation in punktförmigen Strukturen des Zytoplasmas statt. Es liegt

nahe, dass sich diese Zellen in einem besonderen metabolischen Zustand oder Stress befinden. Für das Staufen-1 Protein wurde bereits mehrfach beschrieben, dass es unter Stressbedingungen in sogenannte Stressgranula einwandert [308], [309], [37]. Stressgranula wird unter verschiedensten Stressbedingungen gebildet, in denen die Translation der mRNAs zweitrangig ist. mRNAs, deren Translationsinitiation blockiert ist, bilden zusammen mit 40s ribosomalen Untereinheiten, Translationsinitiationsfaktoren und RNA-bindenden Proteinen dynamische Aggregate [2]. Vor allem die RNA-bindenden Proteine TIA-1, TIA-R und G3BP interagieren mit sich selbst und tragen so zur Bildung der Stressgranula bei.

In ersten Experimenten, in denen der Einfluss von Arsenitstress auf die Rec-Staufen-1-Verteilung untersucht wurde, zeigte sich zunächst keinerlei Veränderung der Rec-Proteinverteilung. Das legt nahe, dass weitere Faktoren in der Rec-Staufen-1-Interaktion wichtig sind. Rec muss, wie seine verwandten RNA-Transportmoleküle auch, an seine responsiven RNA-Elemente binden und multimerisieren, damit sein Kernexportsignal mit der Crm1-Maschinerie interagieren kann. Daher wurde untersucht, ob eine zusätzliche Gabe genomischer Virus-RNA einen Einfluss auf die Rec-Verteilung hat. Nur in Zellen, in denen Virus-RNA, Staufen-1 und Rec exprimiert wurden, war ein deutliches, diffuses zytoplasmatisches Rec-Signal messbar. Das bedeutet, dass nur RNA-gebundenes Rec in das Zytoplasma gelangen kann. Außerdem genügt die virale RNA allein nicht für eine starke Translokation des Rec-Proteins. Rec benötigt die Interaktion mit Staufen-1, um effektiv in das Zytoplasma und damit zu den Polysomen gelangen zu können. Mit Hilfe des Stressgranula-Markers TIA-1 wurde untersucht, ob beide Proteine unter Stressbedingungen in die Stressgranula einwandern. In der Tat lassen sich sowohl Staufen-1, wie es zu erwarten war, als auch Rec unter Stressbedingungen in punktförmigen Strukturen nachweisen, die mit TIA-1 colokalisieren. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass zytoplasmatisches Rec mit Staufen-1 assoziiert ist. Mit Rec wandert auch die gebundene Virus-RNA in die Stressgranula. Welche Auswirkungen das auf die Translation bzw. Verpackung der viralen RNA hat, wurde jedoch bisher für kein Retrovirus weiterführend untersucht. Es ist aber wahrscheinlich, dass die virale RNA in den granulären Strukturen regulatorischen Prozessen unterworfen ist. In der



**Abbildung 51: Zelluläre Komponenten, die an der Bildung der Stressgranula und den P Bodies beteiligt sind:** mRNAs, die translatiert werden sollen, gelangen in die Polysomen. Dort assoziieren der Translationsinitiationskomplex, die ribosomalen Untereinheiten und zusätzliche Translationsregulatoren. Die Translations-aktiven Polysomen können auf zwei Wegen funktionell reprimiert werden: durch Deadenylierung der mRNA (linker Weg) oder durch Translationsinhibition (rechter Weg). Mit Hilfe des PolyA-Bindeproteins (PABP) und der Translationsinitiationsfaktoren 4G und eIF3 werden zu translatierende mRNAs zirkularisiert. Linker Weg: Erfolgt diese Zirkularisierung nicht, binden verschiedene RNA-degradierende Proteine, der PolyA-Schwanz wird durch CCR4/NOT1 abgebaut und es werden P Bodies ausgebildet. In den P Bodies wird das „decapping protein 1“ (DCP1 $\alpha$ ) rekrutiert, das die 5'CAP-Struktur der mRNA abbaut, was in der Degradation der RNA resultiert. Rechter Weg: Die Translation zirkularisierter RNAs kann vorübergehend oder auch vollständig unterbrochen werden, indem die ribosomalen Untereinheiten von einander getrennt werden und RNA-bindende, selbstaggregierende Proteine wie TIA-1 und TIAR rekrutiert werden. Dadurch verändert sich das Polysomen, wird zu einem zirkulären mRNP und anschließend zu Stressgranula. Alle Strukturen sind hochdynamisch und mRNAs können von einer Struktur in die andere übergehen. mRNAs aus der Stressgranula können in P Bodies überwandern und dort abgebaut werden. Sie können jedoch auch wieder in die Polysomen überführt werden, wo die Translation fortgeführt wird. Aus Anderson und Kedersha, 2009 [3].

Stressgranula und in den mit ihr häufig assoziierten „Processing Bodies“ (P Bodies) sammeln sich viele regulatorische Proteine wie Argonaute, FAST, RAP-55, TTP und microRNAs an, die spezifisch das Schicksal der mRNA-Transkripte zwischen der Translations- und Abbaumaschinerie beeinflussen [252], [98], [2]. Die Stressgranula fungiert dabei als Übergangskompartiment zwischen den translationsaktiven Polysomen und den „P Bodies“, in denen aktiv RNAs abgebaut werden [252], [98], [2]. Zwischen den drei Kompartimenten besteht ein ständiger hochdynamischer Austausch und es ist wahrscheinlich, dass auch die viralen RNAs in der Stressgranula diesen Regulationsprozessen unterworfen sind. Eine Übersicht und eine nähere Erläuterung zu den am Aufbau der Stressgranula und „P Bodies“ beteiligten Proteine findet sich in Abbildung 51.

**Stressgranula und antivirale Abwehr** Interessanterweise können Wirtsproteine in den P Bodies und/oder der Stressgranula virale Infektionen verstärken oder einschränken. Für einige Viren, wie dem West Nile (-)RNA-Virus konnte beispielsweise gezeigt werden, dass TIA-R die (+)-Strang-Synthese verstärkt [333]. Andererseits ist die Argonaute-Proteinfamilie dafür bekannt, an der antiviralen Abwehr beteiligt zu sein [92]. Auch miRNAs und siRNAs, die der antiviralen Abwehr dienen, treten verstärkt hier auf [316]. Für einige virale RNAs konnte bereits gezeigt werden, dass sie in P Bodies oder der Stressgranula akkumulieren [11]. So wird beispielsweise die genomische HIV-1 RNA über die RNA Helicase DDX3 in P Bodies rekrutiert [345]. Diese Akkumulation beruht auf der Tatsache, dass einige P Body-Komponenten nukleäre Shuttle-Proteine sind, die Crm1-abhängig mRNAs direkt zum P Body transportieren [252], [345]. Ein typischer P Bodies-Marker ist das Protein DCPI $\alpha$ . Versuche mit dem oricoRec zeigten aber, dass das virale Protein unter Stressbedingungen nicht in den P-Bodies akkumuliert, sondern auf die Stressgranula beschränkt bleibt.

Weiterhin ist die Lokalisation und Dynamik von APOBEC3G und APOBEC3F in ungestressten und gestressten Zellen interessant. Diese beiden antiviralen Proteine sind in den P Bodies konzentriert, wandern jedoch bei Stress in die Stressgranula ein [114], [334]. APOBEC-Proteine (kurz für „Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like“) gehören zur Familie der Cytidin-Deaminasen. Diese Proteine

übernehmen zelluläre Aufgaben, wirken aber auch antiviral, in dem sie Cytidine in retroviralen Genomen oder Retrotransposons während der Reversen Transkription hydrolytisch deaminieren. In der neu-synthetisierten DNA werden so Cytidine zu Uracil (bzw. dC zu dU) konvertiert. Wird dieser DNA-Minus-Strang nicht bereits durch die Aktivität der Uracil-DNA-Glykosylase oder der Apurin/Apyrimidin-Endonuklease zerstört, so weist der neu gebildete Plus-Strang zumindest erhebliche Fehler auf, weil dG-Nukleotide gegen dA-Nukleotide ersetzt wurden [307], [134], [97]. Aufgrund der G zu A-Hypermuation steigt die Wahrscheinlichkeit, dass das integrierte provirale Genom Defekte aufweist.

APOBEC3G (A3G) kann in zwei Zustandsformen in der Zelle auftreten: als niedrigmolekulares (LMM) oder als hochmolekulares HMM A3G. LMM A3G ist enzymatisch aktiv und interferiert mit Infektionen durch exogene Retroviren wie HIV-1. Es ist auch in HIV-1 Partikeln nachweisbar und hemmt in Vif-defizienten HIV-1 Stämmen die Replikation [203], [292]. In Mitogen-aktivierten CD4 Zellen assembliert sich A3G zu 5 bis 15 MDa großen hochmolekularen (HMM) Ribonukleoproteinkomplexen (RNP). Diese Komplexe, deren Assemblierung RNA-vermittelt ist, setzen sich aus mindestens 95 verschiedenen Proteinen zusammen. Durch die Aggregation werden drei verschiedene A3G-RNP-Populationen gebildet [60], [61], [171], [114]. Auffällig dabei ist, dass eine dieser RNP-Populationen Staufen-1 enthält und eng mit den Polysomen assoziiert ist [61]. Chiu *et al.* analysierten 2006 die RNA-Komponenten in den HMM A3G-Komplexen und fanden dort retrovirale Elemente, wie Alu RNAs [61], [161]. Zudem war die Retrotransposition der Alu-Sequenzen durch HMM A3G stark vermindert, was darauf hinweist, dass endogene retrovirale Elemente das natürliche Target von A3G sein könnten [61]. Verschiedene Gruppen konnten bereits zeigen, dass APOBEC-Proteine auch die Retrotransposition LTR-abhängiger endogener Retroelemente vermindern [97], [30]. Diese Retrotranspositionsinhibition konnte, vermittelt durch A3F, auch für das synthetisch hergestellte HERV-KCon nachgewiesen werden [186].

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wird gezeigt, dass Rec und Staufen-1 unter Stressbedingungen mit granulärem A3G colokalisieren. Damit kommt auch die genomische HERV-K113 RNA in räumliche Nähe zum HMM A3G. Welche

Auswirkungen dies auf die Replikation und die Retrotransposition von HERV-K113 hat, muss noch genauer untersucht werden. Diese Ergebnisse sind aber ein erster Schritt dahin zu zeigen, dass Staufen-1 ein Wirtsprotein ist, dass mit Rec interagiert, um endogene retrovirale RNA in HMM A3G-Ribonukleoproteinkomplexe zu transportieren. Dies erfolgt nicht nur unter Stressbedingungen sondern auch in ungestressten Zellen, obwohl die Colokalisation unter Stress stärker ist. Ein Teil der gebildeten retroviralen RNAs wird demnach in ein spezielles Kompartiment transportiert und dort, wahrscheinlich durch Transport in die P Bodies, reprimiert.

HMM A3G ist enzymatisch nicht aktiv, benötigt jedoch für die Inhibition der Retrotransposition auch keine Deaminaseaktivität [61], [149]. Die HMM A3G-vermittelte Inhibition beruht wahrscheinlich allein auf der Tatsache, dass die genomischen RNAs A3G-vermittelt den Ort der reversen Transkription verlassen. Damit sind für diese RNAs die enzymatischen Voraussetzungen zur reversen Transkription nicht mehr vorhanden. Statt dessen werden sie in P Bodies transportiert und dort abgebaut [59], [334]. Dieser Transport könnte auch die Translation bzw. Virusverpackung beeinträchtigen und damit eine der Hauptursachen sein, warum es bisher nicht möglich war, für ein HERV-K-Provirus Replikation nachzuweisen; auch nicht für die beiden auf Consensus-Sequenzen beruhenden HERV-Ks [85], [186].

Wie bereits erwähnt, wird HMM-A3G vor allem in aktivierten T-Zellen gebildet. Ein ähnlicher Zustand der Aktivierung könnte durch die Stressbedingungen auch in anderen Zelllinien induziert/simuliert werden. Für einige virale Infektionen ist bereits beschrieben worden, dass sie die Bildung von Stressgranula induzieren. Dies geschieht teilweise durch Aktivierung von Kinasen, die den Translationfaktor eIF2 phosphorylieren und so die Translationsinitiation inhibieren, was die Zelle wiederum in einen Stresszustand versetzt [294], [222], [333]. In einem solchen Zustand könnten sich auch die vereinzelt beobachteten Zellen aus Abbildung 31 befunden haben. Durch einen Stress, eine Infektion oder ein intrinsisches Signal kommt es zu einer übermäßigen Expression von Retroelementen, darunter auch HERV-K [60]. Da in diesen Zellen neben Staufen-1 nun auch Rec exprimiert wird, kann die virale RNA durch die Rec-Staufen-1-Interaktion ins Zytoplasma transportiert werden. Dort akkumuliert der Komplex in der induzierten



Stressgranula, woraus sich die beobachtete Proteinverteilung ergibt.

Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass eine Reprimierung der Translation durch den Transport in Stressgranula und P Bodies für einige Viren auch von Vorteil sein könnte, wenn diese RNA als genomische RNA verpackt werden soll [11]. Die Translationsmaschinerie steht in diesen Kompartimenten in keinem Konkurrenzverhältnis zur Verpackungsmaschinerie, wodurch die Stöchiometrie der einzelnen Komponenten zueinander gewährleistet werden könnte [306]. Vor allem die Tatsache, dass ein bestimmter Anteil der HIV-1 RNAs über die RNA-Helicase DDX3 direkt in diese Kompartimente transportiert wird, könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, dass eine Trennung der RNA-Pools für die HIV-Replikation wichtig ist [345].

**Fazit** Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Ribonukleoprotein-Partikel eine essentielle Rolle in der Replikation von HERV-K113 spielen. Aus dem bisherigen Erkenntnisstand ist es jedoch nicht möglich, klar zu folgern, ob eine Rec-Interaktion mit Staufen-1 für das Virus vorteilhaft oder nachteilig ist. Genauere Erkenntnisse lassen sich erst durch Translationseffizienz- und RNA-Stabilitätsexperimente gewinnen, die überprüfen, ob die HERV-K RNAs in der Stressgranula reprimiert und anschließend abgebaut werden.

Denkbar ist jedoch, dass Vor- und Nachteile sich gegenseitig aufwiegen. Wird HERV-K nicht übermäßig exprimiert, wird die Zelle in keinen Stresszustand gelangen und somit auch keine Stressgranula ausbilden. Stattdessen könnte die Interaktion mit Staufen-1, durch den Aufbau von Transportribonukleoproteinkomplexen, es dem endogenen Retrovirus überhaupt erst ermöglichen, virale Transkripte Rec-abhängig in das Zytoplasma zu transportieren und dort zu translatieren bzw. zu verpacken. Gleichzeitig hat die Zelle durch Ausbildung der Stressgranula und Assemblierung der HMM APOBEC3G-Komplexe stets die Möglichkeit, übermäßige provirale Genexpression in ihrer Auswirkung zu begrenzen.

Eine Hinweis darauf, was mit der viralen RNA in der Stressgranula geschieht, könnten Experimente mit dem MS2-Phagenprotein geben. Dieses Protein ist in der Lage, an spezifische Sequenzen der RNA zu binden und kann zudem mit Hilfe eines Fluoreszenz-

marker sichtbar gemacht werden. So könnte beispielsweise ermittelt werden, wie lang Rec und die RNA assoziiert bleiben, ob die genomische RNA verpackt wird oder ob sie in der Stressgranula bzw. den P Bodies abgebaut wird. Zudem scheinen die verschiedenen Virusproteine während der Virusassemblierung funktionell miteinander verknüpft zu sein. Für ein vollständiges Verständnis der viralen Replikation muss deshalb untersucht werden, inwieweit sich die Virusproteine gegenseitig beeinflussen. Ein wichtiger Startpunkt dafür könnte eine mögliche Rec-Gag-Interaktion sein.

#### 4.2.4 Interaktion von Rec mit hSGT

**Das humane „small glutamine rich TPR containing protein“ (hSGT)** Das hSGT-Protein ist ein ubiquitär exprimiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 34 kDa. hSGT ist sowohl im Zytosol als auch im Nukleus lokalisiert und wird posttranslational modifiziert [73], [191]. Abhängig von seiner zellulären Lokalisation ist hSGT in die Regulation verschiedenster Prozesse involviert [191]. Das Protein besitzt einen dreiteiligen Aufbau. Im Zentrum liegt die regulatorische TPR-Domäne. Über diesen Bereich geht hSGT eine Vielzahl von Interaktionen ein [73], [311], [191], [43]. C-terminal befindet sich die glutaminreiche, 55 Aminosäuren umfassende Domäne, über die hSGT mit hydrophoben Aminosäuresegmenten innerhalb von Polypeptiden interagieren kann [191]. Der N-Terminus stellt eine Dimerisierungsdomäne dar und ermöglicht es dem hSGT in einem Komplex mit verschiedenen Komponenten gleichzeitig zu interagieren [191], [43].

Für hSGT sind vielfältige Funktionen beschrieben worden. So reguliert das Protein nukleäre Prozesse wie die Mitose und DNA-Replikation [338], [73], [337]. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht bekannt. Winnefeld *et al.* konnten jedoch zeigen, dass eine Reduktion der zellulären hSGT-Level durch siRNAs zum mitotischen Arrest der kultivierten Zellen führt [338], [337]. hSGT muss während der Prometaphase der Mitose im Zellkern akkumulieren, damit die Zelle in die Anaphase übergehen kann. Fehlt das Protein, kommt es zu einem mitotischen Arrest und die Zellen gehen in Apoptose. Die regulatorische Aktivität während der Mitose beruht auf seiner Funktion als Cocha-

peron [337]. Auch im Zytoplasma reguliert hSGT als Cochaperon vielfältige Prozesse. Als Interaktionspartner der Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp90 ist es an der korrekten Faltung von Proteinen und der Assemblierung von Proteinkomplexen beteiligt [191]. Hitzeschockproteine sind mehrfach in der Regulation von Hormonrezeptoren beschrieben worden [52], [283], [43]. Auch hSGT ist an dieser Regulation beteiligt und bindet sowohl an die Vorläuferproteine als auch an die aktiven Rezeptoren [283], [43]. Das Cochaperon interagiert beispielsweise mit dem Ubiquitin-abhängigen Endozytose-Motiv des „growth hormone receptors“ (GHR) und der sogenannte „Hinge“-Region des Androgen-Rezeptors [283], [43], [121].

**Bestätigung der Rec-hSGT Interaktion** Im „Yeast Two-Hybrid“-Ansatz mit dem HERV-K113 Rec-Protein wurden in fünf Klonen zwei verschiedene hSGT Fragmente gefunden. Beide Fragmente umfassen die Hauptfunktionsdomäne des hSGT: die TPD-Region mit ihren drei aufeinanderfolgenden TPR-Motiven. In Coimmunpräzipitationsexperimenten und Pull Down Versuchen, konnte die Interaktion sowohl für das gesamte Protein als auch für die TPD-Domäne allein bestätigt werden. Dass TPR-Motive für Protein-Protein-Interaktionen wichtig sind, wurde bereits durch verschiedene Gruppen gezeigt [178], [77]. Die Primärsequenz besteht aus tandemartig aufgebauten Wiederholungssequenzen, die sich zu antiparallelen Helix-Paaren gleicher Länge zusammenlagern und so eine funktionelle Domäne bilden [77]. Durch die Ausprägung superhelikaler Strukturen wird auf der Oberfläche eine Bindungsfruche gebildet, die der Protein-Interaktion dient [78], [284], [90], [91], [183], [284].

Die Interaktion mit Rec findet vornehmlich im Zellkern statt. Obwohl hSGT meist zytosolisch lokalisiert ist, wandert es für bestimmte Prozesse wie der Regulation der Zellteilung in den Nukleus ein [338], [337]. Interessanterweise scheint aber auch die Expression kerngängiger Virusproteine die zelluläre Lokalisation von hSGT zu verändern. So ist beispielsweise hSGT bei Expression des NS1 Proteins des Parvovirus H1 in Colokalisation mit diesem Virusprotein im Zellkern zu finden [73]. Hier unterstützt hSGT die NS1-vermittelte Virusreplikation. Auch für das HERV-K113 Rec wäre ein solcher Mechanismus vorstellbar. Neusynthetisiertes Rec könnte an den Ribosomen mit

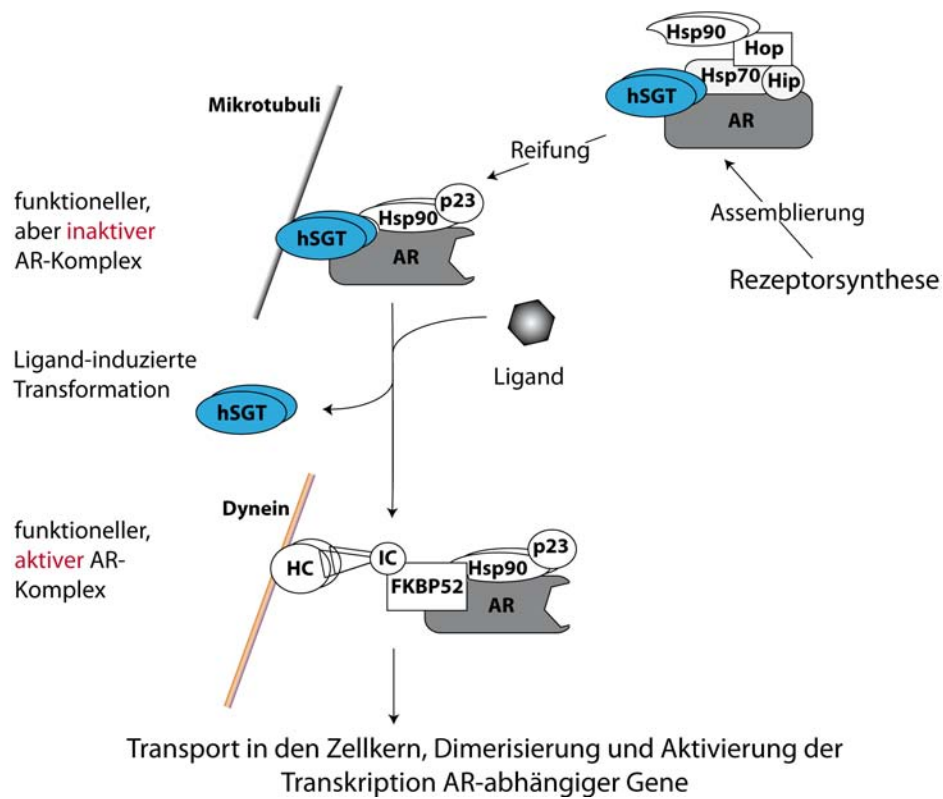
der Chaperonmaschinerie in Kontakt kommen und dort hSGT binden. Inwieweit ein Kernimport anschließend durch hSGT vermittelt wird, ist nicht bekannt. Das Cochaperon unterstützt jedoch ebenfalls die Virusreplikation. Durch Überexpression von hSGT wird zum Beispiel effektiv der Anteil der durch Rec transportierten ungespleißten Virus-RNAs im Zytoplasma erhöht. Es lässt sich auch deutlich mehr Viruscapsidprotein im Virusüberstand nachweisen, was darauf hindeutet, dass die Viruspartikelbildung durch hSGT verstärkt wird. Ein solcher Effekt wurde auch für HIV-1 gezeigt. Wird hSGT in infizierten Zellen überexprimiert, kommt es zu einer verstärkten Partikelbildung [49].

**Regulation des Androgenrezeptors (AR)** Buchanan *et al.* beschrieben 2007, dass hSGT als Cochaperon die Assemblierung und Aktivität des Androgenrezeptors reguliert [43]. Das AR-Protein gehört zu den nukleären Klasse I Steroid-Rezeptoren, zu der auch der Glucocorticoidrezeptor (GCCR), der Progesteronrezeptor (PGR) und der Mineralocorticoidrezeptor zählen. Androgenaktivität ist für eine Vielzahl von physiologischen Abläufen und Entwicklungsprozessen entscheidend. Vor allem die männliche Sexualentwicklung aber auch die Aufrechterhaltung der männlichen Geschlechtsorgane und die Spermatogenese verlaufen androgenabhängig [276], [223], [232], [72]. Das *androgenrezeptor*-Gen kodiert für ein 90 kDa-Protein mit drei Hauptfunktionsdomänen: die N-terminale Region, die modulatorisch wirkt, die DNA-Bindungsdomäne und die Androgenbindungsdomäne [51]. Die beiden Hauptsteroidandrogene, Testosteron und dessen Metabolit 5-Dihydrotestosteron (DHT), üben ihre biologische Funktion durch Bindung an den Androgenrezeptor aus. Der AR selbst fungiert dann als Ligand-induzierbarer Transkriptionsfaktor. Die Bindung von Testosteron oder DHT induziert die Rezeptordimerisierung, erleichtert es dem AR an sein entsprechendes responsives Element (ARE) zu binden und rekrutiert Coregulatoren, die die Expression der Zielgene aktivieren [276], [136], [137]. Neben dieser transkriptionsregulatorischen oder genomischen Aktivität der Steroide mehren sich zunehmend Hinweise, dass Androgene, darunter auch Progesteron und Östrogen, außerdem schnell und nicht-genomisch agieren können [328], [270], [100]. Die nicht-genomische Steroidaktivität ist durch eine schnelle Induktion konventioneller „second messenger“ verschiedener Signaltransduktionskaska-

den gekennzeichnet, wie beispielsweise durch den Anstieg intrazellulärer freier Calcium-Level oder durch die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) oder der MAP-Kinase [106], [137]. Diese Effekte treten innerhalb von Sekunden oder Minuten auf und können damit unmöglich durch Transkription und Proteinsynthese vermittelt sein [141].

Übermäßige AR-Aktivität ist mit einer Reihe von Tumoren assoziiert. Das Wachstum und der Fortbestand primärer Prostatakrebszellen ist beispielsweise strikt Androgen-abhängig [125]. Daher ist eine Androgen-Reduktionstherapie die Standardtherapie, um das Wachstum von Prostata Tumoren zu inhibieren. Trotz der Reduktion der zirkulierenden Androgene und der Gabe von AR-Antagonisten beginnen die meisten Prostata Tumore wieder zu wachsen. Die molekularen Mechanismen dafür sind jedoch weitestgehend unbekannt. Eine Möglichkeit der Stimulation der AR-Aktivität besteht beispielsweise durch „cross-talk“ verschiedener Signalkaskaden [70]. Wachstumsfaktoren aber auch die PKA oder PKC können den AR stimulieren, ohne dass eine Liganden-Bindung stattgefunden hat [312].

Ein weiterer Mechanismus basiert auf der fehlerhaften Modulation der AR-Aktivität durch AR-regulatorische Proteine, was zu einer Hyperaktivität des Androgenrezeptors führt. Der Androgenrezeptor wird durch einen Proteinkomplex bestehend aus Chaperonen und TPR-Motivproteinen funktionell kontrolliert. Die Regulation des AR ist in Abbildung 52 dargestellt. Dieser Komplex bindet bereits während der Synthese und Reifung des Rezeptors. Die Synthese beginnt in Assoziation mit Hsp70 und DnaJ, die die AR-Faltung kontrollieren und die Ligandenbindungskompetenz erhalten [263]. Im finalen Stadium der Rezeptorreifung assoziieren ein Hsp90-Dimer, p23 und ein spezifisches TPR-Motivprotein. Eines dieser regulatorischen TPR-Proteine ist das hSGT-Protein [43]. hSGT bindet über sein TPR-Motiv an die Hinge-Region des AR und unterstützt im Chaperonkomplex sowohl die Rückfaltung des Steroidrezeptors als auch die ATPase-Aktivität von Hsp70, die die nötige Energie für die Chaperonaktivität liefert [311]. Der erste Schritt in der Steroidrezeptoraktivierung ist der Ligand-induzierte Austausch des TPR-Proteins [262]. Auch hSGT verlässt den Chaperon-AR-Komplex, wenn DHT bindet [43]. Wird hSGT jedoch durch ein virales Protein gebunden, könnte eine



**Abbildung 52: Regulation der Aktivität und der Reifung des AR durch hSGT:** hSGT agiert als Dimer.

Das Protein unterstützt das Chaperon Hsp70 darin, neu synthetisiertes AR-Protein zu erkennen und korrekt zu falten. Während der Reifung des Hormonrezeptors, vermittelt hSGT den Austausch von Hsp70 gegen Hsp90 und stabilisiert den Rezeptor/Hsp90-Heterokomplex durch eine trimere Interaktion. Dadurch wird der AR in einer funktionellen, aber inaktiven Konformation gehalten. Durch die Interaktion von hSGT mit dem Tubulinnetzwerk wird zusätzlich ein passiver Kerntransport des AR vermindert. Sobald der Ligand am AR bindet, wird hSGT gegen ein anderes Cochaperon, wie FKBP52 („FK506-binding protein 4“) ausgetauscht, wodurch der AR in eine aktive Konformation überführt wird. FKBP52 interagiert mit Dynein-Fasern des Zytoskeletts und bewirkt so den Kernimport des AR, wo dieser als Transkriptionsfaktor an die entsprechenden Zielgene binden kann. Hsp = Hitzeschockprotein, Hip = „Hsp70 interacting protein“, Hop = „heat shock protein organising protein“, HC („heavy chain“) und IC („intermediate chain“) bilden den Dynein-Motorkomplex. Abbildung nach Buchanan *et al.*, 2007 [43].

Aktivierung des Androgenrezeptors auf zwei Wegen erfolgen: das Virusprotein bindet das Cochaperon, wodurch weniger Cochaperon für die Rezeptorregulation verfügbar ist (kompetitiv) oder das Virusprotein bindet das TPR-Protein am AR-Chaperonkomplex, verändert dessen Struktur oder Aktivität und führt so zu einer Erhöhung der Rezeptoraktivität (nicht-kompetitiv). Wie die hier dargestellten Experimente zeigen, bewirkt die Bindung von Rec an das Cochaperon hSGT eine Aktivitätserhöhung des Androgenrezeptors. Dieser Effekt verhält sich proportional zur zellulären Rec-Konzentration. Eine AR-Aktivierung wurde jedoch nur in Zellen gemessen, die den Steroidrezeptor ex-

primieren, was bedeutet, dass die Stimulation des Steroidrezeptors spezifisch durch das Virusprotein verursacht wird. Durch zusätzliche Gabe von hSGT kann die Stimulation wieder reduziert werden, was auf einen kompetitiven Effekt hinweist, indem Rec hSGT bindet und so verhindert, dass das Cochaperon an den AR-Chaperon-Komplex bindet.

#### 4.2.4.1 Implikation der Rec-hSGT-Interaktion in der Krebsentwicklung

Die Rec-vermittelte Aktivierung des Androgenrezeptors könnte auch Implikationen in der Entstehung einer Vielzahl von Tumoren haben. Da HERV-K113 ein endogenes Retrovirus ist, liegt es im Genom einer jeden Körperzelle vor. Aktiviert durch das zelluläre Milieu oder durch äußere Reize, könnte die Expression von HERV-K113 und seinem Rec-Protein zu einer Entkopplung der Replikationskontrollmechanismen führen. Durch eine Rec-vermittelte Aktivierung der Steroidrezeptoren kann die Zellproliferation induziert werden, was dem Tumorwachstum förderlich ist.

Auf welchem Weg Hormonrezeptoren die Zellproliferation aktivieren wird noch immer diskutiert. Durch Östrogen werden beispielsweise die Protoonkogene *fos*, *jun* und *myc* transkriptionell aktiviert [330], [193], [327]. Außerdem wird die Bildung von Wachstumsfaktoren wie dem „epidermal growth factor“ (EGF) oder „insulin growth factor“ (IGF) induziert [174]. Es ist auch sehr wahrscheinlich, dass neben der klassischen Aktivierung der Transkription, die nicht-genomische Aktivierung eine wichtige Rolle spielt. Migliaccio *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass durch Steroide der proproliferative Src/Ras/Erk Signalweg in Brustkrebs- und Prostatakrebszelllinien induziert wird [227], [229], [228]. Eine Rec-induzierte Stimulation des Androgenrezeptors könnte so auf verschiedenen Ebenen die Proliferation initiieren oder steigern. Ebenso könnte eine Reaktivierung von HERV-K(HML-2) in Tumorzellen, beispielsweise in frühen Prostatakrebszellen, die Tumorprogression begünstigen. Interessanterweise wird in vielen Geweben und Tumoren, in denen HERV-K113 RNA oder Proteine nachgewiesen wurden, auch der Androgenrezeptor und/oder einer seiner nah verwandten Steroidrezeptoren exprimiert. Inwieweit das Rec-Protein auf die verwandten Rezeptoren einen Einfluss hat, muss noch ermittelt werden. Aufgrund der Konserviertheit der verschiedenen Steroidrezeptoren und der damit verbundenen Ähnlichkeit der Regulationsmechanismen,

kann ein Rezeptor-stimulatorischer Effekt durch das HERV-K113 Rec jedoch nicht ausgeschlossen werden [227]. Es ist zudem bereits beschrieben worden, dass die Steroidrezeptoren untereinander ternäre Komplexe bilden können und so durch zwei verschiedene Signale, beispielsweise Progesteron und Östrogen, aktiviert werden können [53]. Auch in LnCap-Zellen bilden der AR und der ER $\beta$  nach Gabe von Östradiol einen aktiven ternären Komplex, durch den die Zellen stimuliert werden, in die S-Phase der Mitose überzugehen und zu proliferieren [227].

Eines der naheliegendsten Beispiele für eine Implikation der Rec-vermittelten Aktivierung eines Steroidrezeptors sind die Keimzelltumore. Die Spermatogenese und Reifung wird durch Testosteron und verschiedene Steroidrezeptoren reguliert. In Keimzelltumoren lässt sich eine hohe Rec-Transkription feststellen [110]. Eine Störung des empfindlichen Gleichgewichts durch einen hyperaktiven Hormonrezeptor konnte ebenfalls eine der Ursachen für die Ausbildung von Keimzelltumoren in transgenen Rec-Mäusen sein [110]. Durch die Möglichkeit der Ausbildung heteroternärer Komplexe könnte die HERV-K-Expression auch mit der Entstehung von Brustkrebs und der Entartung von Eierstockgeweben assoziiert sein [326], [324]. Auch für Melanome ist ein endokriner Zusammenhang in der Entstehung und Progression hergestellt worden. So konnten Pack und Scharnagel bereits 1951 feststellen, dass schwangere Frauen eine schlechtere Prognose bei cutanen Melanomen haben [247]. Die genaue Ursache hierfür ist jedoch nicht untersucht.

**Regulation der eigenen LTR-Aktivität** In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch das HERV-K113 Provirus und weitere Mitglieder der HERV-K(HML-2)-Familie von einer Aktivierung durch den Androgenrezeptor profitieren. In beiden Teratocarcinomzelllinien, Tera-1 und GH, ließ sich ein Rec-vermittelter stimulatorischer Effekt der 5'LTR-Promotoraktivität nachweisen. Durch Zugabe von DHT, dem Liganden des Androgenrezeptors, konnte dieser Effekt zusätzlich verstärkt werden. Wie in den zuvor durchgeführten Experimenten mit dem responsiven Element des ARs, war dieser Effekt umso höher, je mehr Rec eingesetzt wurde. Einen weiteren Hinweis darauf, dass durch Androgene die LTR-Aktivität endogener Retroviren beeinflusst wird,



lieferten die Experimente, in denen zusätzlich der Effekt von hSGT überprüft wurde. Tatsächlich ist hSGT in der Lage, die Rec-vermittelte Aktivierung der HERV-K113 LTR zu inhibieren.

Dass Retroviren durch Zugabe von Androgenen stimuliert werden können, wurde erst kürzlich für XMRV gezeigt. Die XMRV-Replikation kann durch DHT um das dreifache verstärkt werden [87]. Auch MMTV besitzt in seiner LTR ein „hormone response element“. Zudem wurden palindromische Bindungssequenzen für Progesteron- und Prolaktin in der MMTV-LTR gefunden [233]. Auch die HERV-K113 LTR-Aktivität erfährt eine Stimulation um Faktor 2 bis 3. Durch diese steroidabhängige Aktivierung könnte auch erklärt werden, warum gerade in Tumoren von Hormon-regulierten Geweben, wie dem Brustgewebe, den Keimzellen, Ovarien und der Prostata, vermehrt HERV-K Transkripte und Proteine gefunden werden [325], [326], [324], [110]. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass sich dieser Effekt nicht nur auf HERV-K113 beschränkt, sondern dass auch andere HERV-K Proviren, wie beispielsweise das HERV-K10, von einer Androgen-abhängigen Stimulation betroffen sind. Dies wird durch die Erhöhung der Reversen Transkriptase im Überstand noch untermauert. Unter Berücksichtigung der Vielzahl der Integrate im humanen Genom könnte sich der stimulatorische Effekt soweit potenzieren, dass tatsächlich HERV-K-Partikel nachweisbar sind [31], [65]. Eine verstärkte Rec-Bildung wiederum könnte dann zu einer weiteren Progression des Tumorgewebes führen.

### 4.3 Zusammenfassung

Sowohl für das Hüllprotein als auch für das Rec von HERV-K113 konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden. Das Hüllprotein konnte durch den Austausch von acht Aminosäuren wieder in einen funktionellen Zustand gebracht werden. Die Korrektur der Aminosäuresequenz aber auch die Codonoptimierung haben es erst ermöglicht, das HERV-K113 Hüllprotein auf Prozessierung, Einbau in retrovirale Partikel und Infektiosität zu untersuchen. Tatsächlich wird das korrigierte Env prozessiert und effektiv in Viruspartikel eingebaut. Auf diese Art und Weise kann das Env Infektionen vermitteln.

Das HERV-K113 oricoEnv ist ein funktionierendes Modellprotein, mit dem nun der zelluläre Rezeptor identifiziert und die pathophysiologische Rolle des HERV-K(HML-2) Envs genauer untersucht werden kann. Durch weitere Optimierungsstrategien, beispielsweise durch Verwendung zusätzlicher spezifischer Verstärker der Virusinfektion, könnte es bald möglich sein, die Replikationskompetenz eines HERV-K(HML-2) Virus zu beweisen.

Für das HERV-K113 Rec-Protein konnte gezeigt werden, dass seine Funktionalität nicht auf den Kerntransport allein beschränkt ist. Die Interaktion mit Staufen-1 macht deutlich, dass Ribonukleoproteinpartikel bei der retroviralen Assemblierung eine wichtige Rolle spielen. Die Verpackung der Viruskomponenten in RNPs ermöglicht es dem Virus, sämtliche viralen RNAs und Proteine an einen spezifischen Ort zu bringen. Rec scheint zudem nach dem Kerntransport an der viralen RNA zu verbleiben, was weitere regulatorische Funktionen auf Translationsebene impliziert. Dieses Modell könnte gleichzeitig auch für andere Retroviren mit einem akzessorischen RNA-Transportprotein, wie HIV-1, MMTV oder HTLV-1, gelten.

Die Interaktion von Staufen-1 mit dem Rec-Protein könnte aber auch einen antiviralen Abwehrmechanismus der Wirtszelle darstellen. Im Zusammenspiel mit antiviralen Wirtsproteinen könnte Staufen-1 die viralen Vollängentranskripte von der Translations- und Verpackungsmaschinerie isolieren und den Abbauwegen zuführen. Dadurch würde auch eine Retrotransposition verhindert werden.

Auch hSGT ist ein wichtiger Interaktionspartner für das HERV-K Rec-Protein. Rec stimuliert den Androgenrezeptor, indem es hSGT als negativen Regulator bindet. Unter Rec-Expression wird der AR deutlich aktiviert. Eine Steroidrezeptorhyperaktivität wirkt wiederum proproliferativ, was mit der Krebsentstehung in Zusammenhang gebracht werden kann. Gleichzeitig wird durch den Androgenrezeptor die HERV-K 5'LTR-Aktivität erhöht, wodurch auch die Rec-Expression verstärkt wird. Auf diese Weise könnte eine bestehende Tumorgenese immer weiter voranschreiten.

## 5 Zusammenfassung der Arbeit

Das humane endogene Retrovirus-K113 (HERV-K113) ist eines der jüngsten und am besten erhaltenen endogenen Proviren des Menschen. Es stellt ein potentiell replikationskompetentes Retrovirus dar, dessen Expression zur Entstehung von Tumor- und Autoimmunkrankheiten beitragen könnte. In Anpassung an den Wirt wurden seit der Integration die viralen Proteine durch Mutation in ihrer Expression stark reprimiert. Auch das Hüllprotein wird im Wildtyp kaum exprimiert. Durch den Austausch von acht Aminosäuren konnte das Hüllprotein wieder in einen funktionellen Zustand gebracht werden. Die Expression wurde durch eine Codonoptimierung soweit gesteigert, dass es möglich war, das HERV-K113 Env funktionell zu untersuchen. Das korrigierte Env wird prozessiert, effektiv in Viruspartikel eingebaut und kann Infektionen vermitteln. Durch weitere Optimierungsstrategien, beispielsweise durch Verwendung zusätzlicher Verstärker der Virusinfektion, konnte die Infektiosität weiter gesteigert werden.

HERV-K113 steht unter Verdacht, bei der Auslösung einiger Tumorerkrankungen, darunter auch Keimzelltumore, beteiligt zu sein. Eine besondere Rolle spielt dabei das akzessorische Rec-Protein, welches für seine Funktion als Shuttleprotein der viralen RNA mit einer Vielzahl von Wirtsfaktoren interagieren muss. In einem YTH-Screen wurden zwei Interaktionspartner des Rec-Proteins gefunden: Staufen-1 und hSGT. Für beide Proteine wurde die Interaktion in Coimmunpräzipitationen und Coimmunfluoreszenzexperimenten bestätigt. In einem Luziferase-basierenden Reporterassay konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression beider Proteine den Rec-vermittelten nukleozytoplasmatischen RNA-Transports verstärkt.

Die Interaktion mit Staufen-1 macht deutlich, dass die Funktionalität von Rec nicht auf den Kerntransport beschränkt ist, und dass Ribonukleoproteinpartikel bei der Replikation eine wichtige Rolle spielen. So ist es dem Virus möglich, sämtliche Viruskomponenten an einen spezifischen Ort zu dirigieren. Rec verbleibt zudem nach dem Kerntransport an der viralen RNA, was weitere regulatorische Aktivitäten auf Translations- und Verpackungsebene impliziert. Die Interaktion von Staufen-1 und Rec könnte auch einen antiviralen Kontrollmechanismus der Wirtszelle darstellen. Unter Stressbedingungen

akkumulieren Rec und Staufen-1 in der Stressgranula. Zusammen mit anderen antiviralen Wirtsproteinen wie HMM APOBEC3G und TIA-1 könnten auf diese Weise die viralen Vollängentranskripte von der Translations- und Verpackungsmaschinerie isoliert werden.

Auch hSGT ist ein wichtiger Interaktionspartner für das HERV-K Rec-Protein. Bindet Rec den Regulator hSGT, wird der Androgenrezeptor stimuliert. Gleichzeitig wird durch den Androgenrezeptor die HERV-K 5'LTR-Aktivität erhöht. Eine daraus resultierende Verstärkung der Rec-Expression kann erneut zu einer erhöhten AR-Aktivität führen. Auf diese Art und Weise könnte eine stetige, immer schneller voranschreitende Tumorgenese ausgeprägt werden.

## Summary

Human endogenous retroviruses (HERVs) comprise approximately 8 % of the human genome. All presently recognized elements, including the youngest and most intact proviruses of the HERV-K(HML-2) family, have suffered postinsertional mutations during their time of chromosomal residence, and genes encoding the envelope glycoprotein (Env) have not been spared these mutations. In this study, an authentic Env of the HERV-K113 provirus was reconstituted by back mutation of putative postinsertional amino acid changes and the expression was aided by codon-optimization. The reconstituted Env regained its ability to be incorporated into retroviral particles and to mediate entry. Further optimization of infection, including the use of semen-derived enhancer of infection, yielded in even higher infectivity levels.

The Rec protein of the HERV-K is a functional homolog of the Rev protein of HIV. Rec binds selectively to viral RNAs in the nucleus and enhances their transport into the cytoplasm. It can be assumed that Rec has to interact with several host proteins to fulfill its function as a shuttle protein. Applying the YTH- technique two new Rec-interacting proteins were identified: Staufen-1 and hSGT. For both proteins the interaction with Rec is supported by co-immunoprecipitations and subcellular localization studies. The interacting region has been determined by pull down assays and a signi-

ficant enhancement of viral mRNA transport by overexpression of Staufen-1 or hSGT can be demonstrated in a luciferase-based reporter assay.

Like Rec, Staufen-1 promotes the transport of selected mRNAs by formation of ribonucleoparticles (RNPs). Thus, interaction of these molecules might be crucial to perform viral RNA shuttling via RNPs. Furthermore, Rec remains at the viral RNA after the nucleocytoplasmic transport. This implicates additional regulatory functions of the shuttle protein. Besides its RNA transport function Staufen-1 is also associated with stress granules. These granules silence RNA transcription during stress situations within the cell. Interestingly, the high molecular mass (HMM) form of APOBEC3G, a cellular protein which restricts viral replication and retrotransposition, has been found in Rec/Staufen-1 granules. Consequentially, interaction between Rec and Staufen-1 might be part of a defense mechanism preventing intracellular proliferation of HERV-K elements.

HSGT plays an important role during mitosis and in regulation of the androgen receptor (AR). An interaction of hSGT with Rec yielded in an higher susceptibility of the AR to its ligands and to an increased transcription activity mediated by the free AR. As a side effect, viral LTR activities were enhanced which may also result in the observed increase of viral particles in the supernatant.

These findings contribute to the understanding of the Rec protein as a nucleocytoplasmic shuttle protein and, with respect to hSGT, may indicate a mechanistic implication in cancer development.

## Literatur

- [1] ALBERTS, B. ; JOHNSON, A. ; WALTER, P. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K.: Molecular Biology of the Cell (vol. Auflage). In: *Taylor and Francis* 4th Revised Edition (2002), Jan, S. 329–411
- [2] ANDERSON, P. ; KEDERSHA, N.: RNA granules. In: *J. Cell Biol.* 172 (2006), Mar, S. 803–808
- [3] ANDERSON, P. ; KEDERSHA, N.: RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009), Jun, S. 430–436
- [4] ARRIGO, S. J. ; CHEN, I. S.: Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. In: *Genes Dev.* 5 (1991), May, S. 808–819
- [5] ARRIGO, S. J. ; HEAPHY, S. ; HAINES, J. K.: In vivo binding of wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1 Rev proteins: implications for function. In: *J. Virol.* 66 (1992), Sep, S. 5569–5575
- [6] BANNERT, N. ; KURTH, R.: Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 Suppl 2 (2004), Oct, S. 14572–14579
- [7] BANNERT, N. ; KURTH, R.: The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. In: *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7 (2006), S. 149–173
- [8] BANNERT, N. ; SCHENTEN, D. ; CRAIG, S. ; SODROSKI, J.: The level of CD4 expression limits infection of primary rhesus monkey macrophages by a T-tropic simian immunodeficiency virus and macrophagetropic human immunodeficiency viruses. In: *J. Virol.* 74 (2000), Dec, S. 10984–10993
- [9] BARBULESCU, M. ; TURNER, G. ; SEAMAN, M. I. ; DEINARD, A. S. ; KIDD, K. K. ; LENZ, J.: Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. In: *Curr. Biol.* 9 (1999), Aug, S. 861–868
- [10] BARRÉ-SINOSSI, F. ; CHERMANN, J. C. ; REY, F. ; NUGEYRE, M. T. ; CHAMARET, S. ; GRUEST, J. ; DAUGUET, C. ; AXLER-BLIN, C. ; VÉZINET-BRUN, F. ; ROUZIQUX, C. ; ROZENBAUM, W. ; MONTAGNIER, L.: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). In: *Science* 220 (1983), May, S. 868–871
- [11] BECKHAM, C. ; HILLIKER, A. ; CZIKO, A. M. ; NOUEIRY, A. ; RAMASWAMI, M. ; PARKER, R.: The DEAD-box RNA helicase Ded1p affects and accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* P-bodies. In: *Mol. Biol. Cell* 19 (2008), Mar, S. 984–993

- 
- [12] BEIMFORDE, N.: The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 in health and disease. In: *in preparation* 86 (2010), Sep, S. 1–1
- [13] BEIMFORDE, N. ; HANKE, K. ; AMMAR, I. ; KURTH, R. ; BANNERT, N.: Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. In: *Virology* 371 (2008), Feb, S. 216–225
- [14] BELSHAW, R. ; KATZOURAKIS, A. ; PACES, J. ; BURT, A. ; TRISTEM, M.: High copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection. In: *Mol. Biol. Evol.* 22 (2005), Apr, S. 814–817
- [15] BELSHAW, R. ; PEREIRA, V. ; KATZOURAKIS, A. ; TALBOT, G. ; PACES, J. ; BURT, A. ; TRISTEM, M.: Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004), Apr, S. 4894–4899
- [16] BERGER, J. ; AEPINUS, C. ; DOBROVNIK, M. ; FLECKENSTEIN, B. ; HAUBER, J. ; BÖHNLEIN, E.: Mutational analysis of functional domains in the HIV-1 Rev trans-regulatory protein. In: *Virology* 183 (1991), Aug, S. 630–635
- [17] BERKOWITZ, R. ; FISHER, J. ; GOFF, S. P.: RNA packaging. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214 (1996), S. 177–218
- [18] BERKOWITZ, R. D. ; HAMMARSKJÖLD, M. L. ; HELGA-MARIA, C. ; REKOSH, D. ; GOFF, S. P.: 5' regions of HIV-1 RNAs are not sufficient for encapsidation: implications for the HIV-1 packaging signal. In: *Virology* 212 (1995), Oct, S. 718–723
- [19] BIENIASZ, P. D.: Restriction factors: a defense against retroviral infection. In: *Trends Microbiol.* 11 (2003), Jun, S. 286–291
- [20] BITTNER, J. J.: SOME POSSIBLE EFFECTS OF NURSING ON THE MAMMARY GLAND TUMOR INCIDENCE IN MICE. In: *Science* 84 (1936), Aug, S. 162
- [21] BLAGOVESHCHENSKAYA, A. D. ; THOMAS, L. ; FELICIANGLI, S. F. ; HUNG, C. H. ; THOMAS, G.: HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. In: *Cell* 111 (2002), Dec, S. 853–866
- [22] BLAISE, S. ; MANGENEY, M. ; HEIDMANN, T.: The envelope of Mason-Pfizer monkey virus has immunosuppressive properties. In: *J. Gen. Virol.* 82 (2001), Jul, S. 1597–1600
- [23] BLAISE, S. ; PARSEVAL, N. de ; BÉNIT, L. ; HEIDMANN, T.: Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003), Oct, S. 13013–13018

- [24] BLOND, J. L. ; LAVILLETTE, D. ; CHEYNET, V. ; BOUTON, O. ; ORIOL, G. ; CHAPEL-FERNANDES, S. ; MANDRAND, B. ; MALLET, F. ; COSSET, F. L.: 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. In: *J. Virol.* 74 (2000), Apr, S. 3321–3329
- [25] BOBKOVA, M. ; STITZ, J. ; ENGELSTÄDTER, M. ; CICHUTEK, K. ; BUCHHOLZ, C. J.: Identification of R-peptides in envelope proteins of C-type retroviruses. In: *J. Gen. Virol.* 83 (2002), Sep, S. 2241–2246
- [26] BOEKE, J. ; STOYE, J.: Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. In: *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Retroviruses* (1997), May, S. 343–436
- [27] BOESE, A. ; GALLI, U. ; GEYER, M. ; SAUTER, M. ; MUELLER-LANTZSCH, N.: The Rev/Rex homolog HERV-K cORF multimerizes via a C-terminal domain. In: *FEBS Lett.* 493 (2001), Mar, S. 117–121
- [28] BOESE, A. ; SAUTER, M. ; GALLI, U. ; BEST, B. ; HERBST, H. ; MAYER, J. ; KREMMER, E. ; ROEMER, K. ; MUELLER-LANTZSCH, N.: Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. In: *Oncogene* 19 (2000), Sep, S. 4328–4336
- [29] BOGERD, H. ; GREENE, W. C.: Dominant negative mutants of human T-cell leukemia virus type I Rex and human immunodeficiency virus type 1 Rev fail to multimerize in vivo. In: *J. Virol.* 67 (1993), May, S. 2496–2502
- [30] BOGERD, H. P. ; WIEGAND, H. L. ; HULME, A. E. ; GARCIA-PEREZ, J. L. ; O’SHEA, K. S. ; MORAN, J. V. ; CULLEN, B. R.: Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006), Jun, S. 8780–8785
- [31] BOLLER, K. ; SCHÖNFELD, K. ; LISCHER, S. ; FISCHER, N. ; HOFFMANN, A. ; KURTH, R. ; TÖNJES, R. R.: Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. In: *J. Gen. Virol.* 89 (2008), Feb, S. 567–572
- [32] BORG, K. T. ; FAVARO, J. P. ; ARRIGO, S. J.: Involvement of human immunodeficiency virus type-1 splice sites in the cytoplasmic accumulation of viral RNA. In: *Virology* 236 (1997), Sep, S. 95–103
- [33] BRADDOCK, M. ; MUCKENTHALER, M. ; WHITE, M. R. ; THORBURN, A. M. ; SOMMERVILLE, J. ; KINGSMAN, A. J. ; KINGSMAN, S. M.: Intron-less RNA injected into the nucleus of *Xenopus*



- oocytes accesses a regulated translation control pathway. In: *Nucleic Acids Res.* 22 (1994), Dec, S. 5255–5264
- [34] BRADY, T. ; LEE, Y. N. ; RONEN, K. ; MALANI, N. ; BERRY, C. C. ; BIENIASZ, P. D. ; BUSHMAN, F. D.: Integration target site selection by a resurrected human endogenous retrovirus. In: *Genes Dev.* 23 (2009), Mar, S. 633–642
- [35] BRANDT, S. ; BLISSENBACH, M. ; GREWE, B. ; KONIETZNY, R. ; GRUNWALD, T. ; UBERLA, K.: Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation. In: *PLoS Pathog.* 3 (2007), Apr, S. e54
- [36] BRAY, M. ; PRASAD, S. ; DUBAY, J. W. ; HUNTER, E. ; JEANG, K. T. ; REKOSH, D. ; HAMMARSKJÖLD, M. L.: A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994), Feb, S. 1256–1260
- [37] BRENDDEL, C. ; REHBEIN, M. ; KREIENKAMP, H. J. ; BUCK, F. ; RICHTER, D. ; KINDLER, S.: Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. In: *Biochem. J.* 384 (2004), Dec, S. 239–246
- [38] BRENDER, J. R. ; HARTMAN, K. ; GOTTLER, L. M. ; CAVITT, M. E. ; YOUNGSTROM, D. W. ; RAMAMOORTHY, A.: Helical conformation of the SEVI precursor peptide PAP248-286, a dramatic enhancer of HIV infectivity, promotes lipid aggregation and fusion. In: *Biophys. J.* 97 (2009), Nov, S. 2474–2483
- [39] BRENT, R. ; PTASHNE, M.: A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. In: *Cell* 43 (1985), Dec, S. 729–736
- [40] BRIZARD, F. ; LUO, M. ; DESGROSEILLERS, L.: Genomic organization of the human and mouse stau genes. In: *DNA Cell Biol.* 19 (2000), Jun, S. 331–339
- [41] BRODY, B. A. ; RHEE, S. S. ; HUNTER, E.: Postassembly cleavage of a retroviral glycoprotein cytoplasmic domain removes a necessary incorporation signal and activates fusion activity. In: *J. Virol.* 68 (1994), Jul, S. 4620–4627
- [42] BUAAS, F. W. ; KIRSH, A. L. ; SHARMA, M. ; MCLEAN, D. J. ; MORRIS, J. L. ; GRISWOLD, M. D. ; ROOIJ, D. G. ; BRAUN, R. E.: Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. In: *Nat. Genet.* 36 (2004), Jun, S. 647–652
- [43] BUCHANAN, G. ; RICCIARDELLI, C. ; HARRIS, J. M. ; PRESCOTT, J. ; YU, Z. C. ; JIA, L. ; BUTLER, L. M. ; MARSHALL, V. R. ; SCHER, H. I. ; GERALD, W. L. ; COETZEE, G. A. ;

- TILLEY, W. D.: Control of androgen receptor signaling in prostate cancer by the cochaperone small glutamine rich tetratricopeptide repeat containing protein alpha. In: *Cancer Res.* 67 (2007), Oct, S. 10087–10096
- [44] BUCHANAN, G. ; YANG, M. ; CHEONG, A. ; HARRIS, J. M. ; IRVINE, R. A. ; LAMBERT, P. F. ; MOORE, N. L. ; RAYNOR, M. ; NEUFING, P. J. ; COETZEE, G. A. ; TILLEY, W. D.: Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. In: *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004), Aug, S. 1677–1692
- [45] BÉNIT, L. ; DESSEN, P. ; HEIDMANN, T.: Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. In: *J. Virol.* 75 (2001), Dec, S. 11709–11719
- [46] BÖHNLEIN, E. ; BERGER, J. ; HAUBER, J.: Functional mapping of the human immunodeficiency virus type 1 Rev RNA binding domain: new insights into the domain structure of Rev and Rex. In: *J. Virol.* 65 (1991), Dec, S. 7051–7055
- [47] BÜSCHER, K. ; HAHN, S. ; HOFMANN, M. ; TREFZER, U. ; OZEL, M. ; STERRY, W. ; LÖWER, J. ; LÖWER, R. ; KURTH, R. ; DENNER, J.: Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. In: *Melanoma Res.* 16 (2006), Jun, S. 223–234
- [48] BÜSCHER, K. ; TREFZER, U. ; HOFMANN, M. ; STERRY, W. ; KURTH, R. ; DENNER, J.: Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. In: *Cancer Res.* 65 (2005), May, S. 4172–4180
- [49] CALLAHAN, M. A. ; HANDLEY, M. A. ; LEE, Y. H. ; TALBOT, K. J. ; HARPER, J. W. ; PANGANIBAN, A. T.: Functional interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vpu and Gag with a novel member of the tetratricopeptide repeat protein family. In: *J. Virol.* 72 (1998), Jun, S. 5189–5197
- [50] CALLAHAN, R. ; DROHAN, W. ; TRONICK, S. ; SCHLOM, J.: Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (1982), Sep, S. 5503–5507
- [51] CALLEWAERT, L. ; VAN TILBORGH, N. ; CLAESSENS, F.: Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor. In: *Cancer Res.* 66 (2006), Jan, S. 543–553
- [52] CAPLAN, A. J.: Yeast molecular chaperones and the mechanism of steroid hormone action. In: *Trends Endocrinol. Metab.* 8 (1997), Sep, S. 271–275

- [53] CASTORIA, G. ; BARONE, M. V. ; DI DOMENICO, M. ; BILANCIO, A. ; AMETRANO, D. ; MIGLIACCIO, A. ; AURICCHIO, F.: Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. In: *EMBO J.* 18 (1999), May, S. 2500–2510
- [54] CELMA, C. C. ; PALADINO, M. G. ; GONZÁLEZ, S. A. ; AFFRANCHINO, J. L.: Importance of the short cytoplasmic domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein for fusion activity and envelope glycoprotein incorporation into virions. In: *Virology* 366 (2007), Sep, S. 405–414
- [55] CHATEL-CHAIX, L. ; ABRAHAMYAN, L. ; FRÉCHINA, C. ; MOULAND, A. J. ; DESGROSEILLERS, L.: The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. In: *J. Virol.* 81 (2007), Jun, S. 6216–6230
- [56] CHATEL-CHAIX, L. ; BOULAY, K. ; MOULAND, A. J. ; DESGROSEILLERS, L.: The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. In: *Retrovirology* 5 (2008), S. 41
- [57] CHATEL-CHAIX, L. ; CLÉMENT, J. F. ; MARTEL, C. ; BÉRIAULT, V. ; GATIGNOL, A. ; DESGROSEILLERS, L. ; MOULAND, A. J.: Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. In: *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004), Apr, S. 2637–2648
- [58] CHEYNET, V. ; RUGGIERI, A. ; ORIOL, G. ; BLOND, J. L. ; BOSON, B. ; VACHOT, L. ; VERRIER, B. ; COSSET, F. L. ; MALLET, F.: Synthesis, assembly, and processing of the Env ERV-WE1/syncytin human endogenous retroviral envelope. In: *J. Virol.* 79 (2005), May, S. 5585–5593
- [59] CHIU, Y. L. ; GREENE, W. C.: APOBEC3G: an intracellular centurion. In: *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 364 (2009), Mar, S. 689–703
- [60] CHIU, Y. L. ; SOROS, V. B. ; KREISBERG, J. F. ; STOPAK, K. ; YONEMOTO, W. ; GREENE, W. C.: Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. In: *Nature* 435 (2005), May, S. 108–114
- [61] CHIU, Y. L. ; WITKOWSKA, H. E. ; HALL, S. C. ; SANTIAGO, M. ; SOROS, V. B. ; ESNAULT, C. ; HEIDMANN, T. ; GREENE, W. C.: High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006), Oct, S. 15588–15593
- [62] CLEVER, J. L. ; PARSLAW, T. G.: Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. In: *J. Virol.* 71 (1997), May, S. 3407–3414

- [63] COCHRANE, A. W. ; MCNALLY, M. T. ; MOULAND, A. J.: The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity. In: *Retrovirology* 3 (2006), S. 18
- [64] COFFIN, J. M. ; HUGHES, S. H. ; VARMUS, H. E.: Retroviruses. In: *CSHL Press* 1 (1997), Dec, S. 1–843
- [65] CONTRERAS-GALINDO, R. ; KAPLAN, M. H. ; LEISSNER, P. ; VERJAT, T. ; FERLENGHI, I. ; BAGNOLI, F. ; GIUSTI, F. ; DOSIK, M. H. ; HAYES, D. F. ; GITLIN, S. D. ; MARKOVITZ, D. M.: Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. In: *J. Virol.* 82 (2008), Oct, S. 9329–9336
- [66] COSTAS, J.: Evolutionary dynamics of the human endogenous retrovirus family HERV-K inferred from full-length proviral genomes. In: *J. Mol. Evol.* 53 (2001), Sep, S. 237–243
- [67] COSTOYA, J. A. ; HOBBS, R. M. ; BARNA, M. ; CATTORETTI, G. ; MANOVA, K. ; SUKHWANI, M. ; ORWIG, K. E. ; WOLGEMUTH, D. J. ; PANDOLFI, P. P.: Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. In: *Nat. Genet.* 36 (2004), Jun, S. 653–659
- [68] COYLE, J. H. ; GUZIK, B. W. ; BOR, Y. C. ; JIN, L. ; EISNER-SMERAGE, L. ; TAYLOR, S. J. ; REKOSH, D. ; HAMMARSKJÖLD, M. L.: Sam68 enhances the cytoplasmic utilization of intron-containing RNA and is functionally regulated by the nuclear kinase Sik/BRK. In: *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003), Jan, S. 92–103
- [69] CUI, Y. ; IWAKUMA, T. ; CHANG, L. J.: Contributions of viral splice sites and cis-regulatory elements to lentivirus vector function. In: *J. Virol.* 73 (1999), Jul, S. 6171–6176
- [70] CULIG, Z. ; HOBISCH, A. ; CRONAUER, M. V. ; RADMAYR, C. ; TRAPMAN, J. ; HITTMAIR, A. ; BARTSCH, G. ; KLOCKER, H.: Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. In: *Cancer Res.* 54 (1994), Oct, S. 5474–5478
- [71] CULLEN, B. R.: Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. In: *Virology* 249 (1998), Sep, S. 203–210
- [72] CUNHA, G. R. ; DONJACOUR, A. A. ; COOKE, P. S. ; MEE, S. ; BIGSBY, R. M. ; HIGGINS, S. J. ; SUGIMURA, Y.: The endocrinology and developmental biology of the prostate. In: *Endocr. Rev.* 8 (1987), Aug, S. 338–362
- [73] CZIEPLUCH, C. ; KORDES, E. ; POIREY, R. ; GREWENIG, A. ; ROMMELAERE, J. ; JAUNIAUX, J. C.: Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1. In: *J. Virol.* 72 (1998), May, S. 4149–4156

- [74] CÔTÉ, M. ; ZHENG, Y. M. ; ALBRITTON, L. M. ; LIU, S. L.: Fusogenicity of Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is dependent on low pH and is enhanced by cytoplasmic tail truncations. In: *J. Virol.* 82 (2008), Mar, S. 2543–2554
- [75] D'AGOSTINO, D. M. ; FELBER, B. K. ; HARRISON, J. E. ; PAVLAKIS, G. N.: The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs. In: *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992), Mar, S. 1375–1386
- [76] DALY, T. J. ; COOK, K. S. ; GRAY, G. S. ; MAIONE, T. E. ; RUSCHE, J. R.: Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. In: *Nature* 342 (1989), Dec, S. 816–819
- [77] D'ANDREA, L. D. ; REGAN, L.: TPR proteins: the versatile helix. In: *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003), Dec, S. 655–662
- [78] DAS, A. K. ; COHEN, P. W. ; BARFORD, D.: The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. In: *EMBO J.* 17 (1998), Mar, S. 1192–1199
- [79] DASH, B. ; MCINTOSH, A. ; BARRETT, W. ; DANIELS, R.: Deletion of a single N-linked glycosylation site from the transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 stops cleavage and transport of gp160 preventing env-mediated fusion. In: *J. Gen. Virol.* 75 ( Pt 6) (1994), Jun, S. 1389–1397
- [80] DEML, L. ; BOJAK, A. ; STECK, S. ; GRAF, M. ; WILD, J. ; SCHIRMBECK, R. ; WOLF, H. ; WAGNER, R.: Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. In: *J. Virol.* 75 (2001), Nov, S. 10991–11001
- [81] DENNE, M. ; SAUTER, M. ; ARMBRUESTER, V. ; LICHT, J. D. ; ROEMER, K. ; MUELLER-LANTZSCH, N.: Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. In: *J. Virol.* 81 (2007), Jun, S. 5607–5616
- [82] DEPIL, S. ; ROCHE, C. ; DUSSART, P. ; PRIN, L.: Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients. In: *Leukemia* 16 (2002), Feb, S. 254–259
- [83] DERSE, D. ; CRISE, B. ; LI, Y. ; PRINCLER, G. ; LUM, N. ; STEWART, C. ; MCGRATH, C. F. ; HUGHES, S. H. ; MUNROE, D. J. ; WU, X.: Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. In: *J. Virol.* 81 (2007), Jun, S. 6731–6741

- [84] DEWANNIEUX, M. ; BLAISE, S. ; HEIDMANN, T.: Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. In: *J. Virol.* 79 (2005), Dec, S. 15573–15577
- [85] DEWANNIEUX, M. ; HARPER, F. ; RICHAUD, A. ; LETZELTER, C. ; RIBET, D. ; PIERRON, G. ; HEIDMANN, T.: Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. In: *Genome Res.* 16 (2006), Dec, S. 1548–1556
- [86] DICKSON, C. ; PETERS, G.: Proteins encoded by mouse mammary tumour virus. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 106 (1983), S. 1–34
- [87] DONG, B. ; SILVERMAN, R. H.: Androgen Stimulates Transcription and Replication of XMRV (Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related Virus). In: *J. Virol.* (2009), Nov
- [88] D’SOUZA, V. ; SUMMERS, M. F.: Structural basis for packaging the dimeric genome of Moloney murine leukaemia virus. In: *Nature* 431 (2004), Sep, S. 586–590
- [89] DUCHAÎNE, T. F. ; HEMRAJ, I. ; FURIC, L. ; DEITINGHOFF, A. ; KIEBLER, M. A. ; DESGROSEILLERS, L.: Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. In: *J. Cell. Sci.* 115 (2002), Aug, S. 3285–3295
- [90] DUTTA, S. ; KOTAKA, M. ; TAN, Y. J.: Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of recombinant human small glutamine-rich tetratricopeptide-repeat protein. In: *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64 (2008), Jul, S. 602–604
- [91] DUTTA, S. ; TAN, Y. J.: Structural and functional characterization of human SGT and its interaction with Vpu of the human immunodeficiency virus type 1. In: *Biochemistry* 47 (2008), Sep, S. 10123–10131
- [92] DYKXHOORN, D. M.: MicroRNAs in viral replication and pathogenesis. In: *DNA Cell Biol.* 26 (2007), Apr, S. 239–249
- [93] ECKERT, D. M. ; KIM, P. S.: Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. In: *Annu. Rev. Biochem.* 70 (2001), S. 777–810
- [94] EDWARDS, T. G. ; WYSS, S. ; REEVES, J. D. ; ZOLLA-PAZNER, S. ; HOXIE, J. A. ; DOMS, R. W. ; BARIBAUD, F.: Truncation of the cytoplasmic domain induces exposure of conserved regions in the ectodomain of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. In: *J. Virol.* 76 (2002), Mar, S. 2683–2691

- [95] EJTHADI, H. D. ; MARTIN, J. H. ; JUNYING, J. ; RODEN, D. A. ; LAHIRI, M. ; WARREN, P. ; MURRAY, P. G. ; NELSON, P. N.: A novel multiplex RT-PCR system detects human endogenous retrovirus-K in breast cancer. In: *Arch. Virol.* 150 (2005), Jan, S. 177–184
- [96] ERNST, R. K. ; BRAY, M. ; REKOSH, D. ; HAMMARSKJOLD, M. L.: Secondary structure and mutational analysis of the Mason-Pfizer monkey virus RNA constitutive transport element. In: *RNA* 3 (1997), Feb, S. 210–222
- [97] ESNAULT, C. ; HEIDMANN, O. ; DELEBECQUE, F. ; DEWANNIEUX, M. ; RIBET, D. ; HANCE, A. J. ; HEIDMANN, T. ; SCHWARTZ, O.: APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. In: *Nature* 433 (2005), Jan, S. 430–433
- [98] EULALIO, A. ; BEHM-ANSMANT, I. ; IZAURRALDE, E.: P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007), Jan, S. 9–22
- [99] FALCÓN, A. M. ; FORTES, P. ; MARIÓN, R. M. ; BELOSO, A. ; ORTÍN, J.: Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. In: *Nucleic Acids Res.* 27 (1999), Jun, S. 2241–2247
- [100] FALKENSTEIN, E. ; TILLMANN, H. C. ; CHRIST, M. ; FEURING, M. ; WEHLING, M.: Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. In: *Pharmacol. Rev.* 52 (2000), Dec, S. 513–556
- [101] FENOUILLET, E. ; GLUCKMAN, J. C. ; JONES, I. M.: Functions of HIV envelope glycans. In: *Trends Biochem. Sci.* 19 (1994), Feb, S. 65–70
- [102] FIEBIG, U. ; HARTMANN, M. G. ; BANNERT, N. ; KURTH, R. ; DENNER, J.: Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus. In: *J. Virol.* 80 (2006), Jun, S. 5651–5654
- [103] FIELDS, S. ; SONG, O.: A novel genetic system to detect protein-protein interactions. In: *Nature* 340 (1989), Jul, S. 245–246
- [104] FISCHER, N. ; HELLWINKEL, O. ; SCHULZ, C. ; CHUN, F. K. ; HULAND, H. ; AEPFELBACHER, M. ; SCHLOMM, T.: Prevalence of human gammaretrovirus XMRV in sporadic prostate cancer. In: *J. Clin. Virol.* 43 (2008), Nov, S. 277–283
- [105] FISCHER, U. ; HUBER, J. ; BOELENS, W. C. ; MATTAJ, I. W. ; LÜHRMANN, R.: The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. In: *Cell* 82 (1995), Aug, S. 475–483

- [106] FIX, C. ; JORDAN, C. ; CANO, P. ; WALKER, W. H.: Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004), Jul, S. 10919–10924
- [107] FRANKE, E. K. ; YUAN, H. E. ; LUBAN, J.: Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. In: *Nature* 372 (1994), Nov, S. 359–362
- [108] FREED, E. O. ; MARTIN, M. A.: The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. In: *J. Biol. Chem.* 270 (1995), Oct, S. 23883–23886
- [109] FREEDMAN, R. B. ; BULLEID, N. J. ; HAWKINS, H. C. ; PAVER, J. L.: Role of protein disulphide-isomerase in the expression of native proteins. In: *Biochem. Soc. Symp.* 55 (1989), S. 167–192
- [110] GALLI, U. M. ; SAUTER, M. ; LECHER, B. ; MAURER, S. ; HERBST, H. ; ROEMER, K. ; MUELLER-LANTZSCH, N.: Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. In: *Oncogene* 24 (2005), Apr, S. 3223–3228
- [111] GALLO, R. C. ; SALAHUDDIN, S. Z. ; POPOVIC, M. ; SHEARER, G. M. ; KAPLAN, M. ; HAYNES, B. F. ; PALKER, T. J. ; REDFIELD, R. ; OLESKE, J. ; SAFAI, B.: Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. In: *Science* 224 (1984), May, S. 500–503
- [112] GALLO, S. A. ; FINNEGAN, C. M. ; VIARD, M. ; RAVIV, Y. ; DIMITROV, A. ; RAWAT, S. S. ; PURI, A. ; DURELL, S. ; BLUMENTHAL, R.: The HIV Env-mediated fusion reaction. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1614 (2003), Jul, S. 36–50
- [113] GALLOIS-MONTBRUN, S. ; KRAMER, B. ; SWANSON, C. M. ; BYERS, H. ; LYNHAM, S. ; WARD, M. ; MALIM, M. H.: Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. In: *J. Virol.* 81 (2007), Mar, S. 2165–2178
- [114] GALLOIS-MONTBRUN, S. ; KRAMER, B. ; SWANSON, C. M. ; BYERS, H. ; LYNHAM, S. ; WARD, M. ; MALIM, M. H.: Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. In: *J. Virol.* 81 (2007), Mar, S. 2165–2178
- [115] GELDERBLOM, H. R. ; HAUSMANN, E. H. ; OZEL, M. ; PAULI, G. ; KOCH, M. A.: Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. In: *Virology* 156 (1987), Jan, S. 171–176
- [116] GELDERBLOM, H. R. ; OZEL, M. ; PAULI, G.: Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. In: *Arch. Virol.* 106 (1989), S. 1–13



- [117] GIETZ, D ; JEAN, A S. ; WOODS, R A. ; SCHIESTL, R H.: Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. In: *Nucleic Acids Res* 20 (1992), Nr. 6, S. 1425
- [118] GOEDERT, J. J. ; SAUTER, M. E. ; JACOBSON, L. P. ; VESSELLA, R. L. ; HILGARTNER, M. W. ; LEITMAN, S. F. ; FRASER, M. C. ; MUELLER-LANTZSCH, N. G.: High prevalence of antibodies against HERV-K10 in patients with testicular cancer but not with AIDS. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8 (1999), Apr, S. 293–296
- [119] GOILA-GAUR, R. ; KHAN, M. A. ; MIYAGI, E. ; KAO, S. ; OPI, S. ; TAKEUCHI, H. ; STREBEL, K.: HIV-1 Vif promotes the formation of high molecular mass APOBEC3G complexes. In: *Virology* 372 (2008), Mar, S. 136–146
- [120] GONG, R. ; PENG, X. ; KANG, S. ; FENG, H. ; HUANG, J. ; ZHANG, W. ; LIN, D. ; TIEN, P. ; XIAO, G.: Structural characterization of the fusion core in syncytin, envelope protein of human endogenous retrovirus family W. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331 (2005), Jun, S. 1193–1200
- [121] GOODARZI, M. O. ; XU, N. ; CUI, J. ; GUO, X. ; CHEN, Y. I. ; AZZIZ, R.: Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha (SGTA), a candidate gene for polycystic ovary syndrome. In: *Hum. Reprod.* 23 (2008), May, S. 1214–1219
- [122] GRAMBERG, T. ; SUNSERI, N. ; LANDAU, N. R.: Accessories to the crime: recent advances in HIV accessory protein biology. In: *Curr HIV/AIDS Rep* 6 (2009), Feb, S. 36–42
- [123] GREEN, M. R. ; ZAPP, M. L.: Human immunodeficiency virus. Revving up gene expression. In: *Nature* 338 (1989), Mar, S. 200–201
- [124] GREEN, N. ; SHINNICK, T. M. ; WITTE, O. ; PONTICELLI, A. ; SUTCLIFFE, J. G. ; LERNER, R. A.: Sequence-specific antibodies show that maturation of Moloney leukemia virus envelope polyprotein involves removal of a COOH-terminal peptide. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (1981), Oct, S. 6023–6027
- [125] GREGORY, C. W. ; HAMIL, K. G. ; KIM, D. ; HALL, S. H. ; PRETLOW, T. G. ; MOHLER, J. L. ; FRENCH, F. S.: Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer is associated with increased expression of androgen-regulated genes. In: *Cancer Res.* 58 (1998), Dec, S. 5718–5724
- [126] GROOM, H. C. ; ANDERSON, E. C. ; LEVER, A. M.: Rev: beyond nuclear export. In: *J. Gen. Virol.* 90 (2009), Jun, S. 1303–1318

- [127] GYURIS, J. ; GOLEMIS, E. ; CHERTKOV, H. ; BRENT, R.: Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. In: *Cell* 75 (1993), Nov, S. 791–803
- [128] HAHN, S.: Das endogene Retrovirus HTDV/HERV-K: Untersuchungen zur Funktion des akzesorischen Proteins Rec. In: *Dissertation* (2004), Feb, S. 1–124
- [129] HAHN, S. ; UGUREL, S. ; HANSCHMANN, K. M. ; STROBEL, H. ; TONDERA, C. ; SCHADENDORF, D. ; LÖWER, J. ; LÖWER, R.: Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. In: *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24 (2008), May, S. 717–723
- [130] HAKIM, S. T. ; ALSAYARI, M. ; MCLEAN, D. C. ; SALEEM, S. ; ADDANKI, K. C. ; AGGARWAL, M. ; MAHALINGAM, K. ; BAGASRA, O.: A large number of the human microRNAs target lentiviruses, retroviruses, and endogenous retroviruses. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369 (2008), May, S. 357–362
- [131] HALL, T.: Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41 (1999), Dec, S. 95–98
- [132] HANGER, J. J. ; BROMHAM, L. D. ; MCKEE, J. J. ; O'BRIEN, T. M. ; ROBINSON, W. F.: The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus. In: *J. Virol.* 74 (2000), May, S. 4264–4272
- [133] HANKE, K. ; KRAMER, P. ; SEEHER, S. ; BEIMFORDE, N. ; KURTH, R. ; BANNERT, N.: Reconstitution of the ancestral glycoprotein of human endogenous retrovirus k and modulation of its functional activity by truncation of the cytoplasmic domain. In: *J. Virol.* 83 (2009), Dec, S. 12790–12800
- [134] HARRIS, R. S. ; PETERSEN-MAHRT, S. K. ; NEUBERGER, M. S.: RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. In: *Mol. Cell* 10 (2002), Nov, S. 1247–1253
- [135] HARRISON, G. P. ; MIELE, G. ; HUNTER, E. ; LEVER, A. M.: Functional analysis of the core human immunodeficiency virus type 1 packaging signal in a permissive cell line. In: *J. Virol.* 72 (1998), Jul, S. 5886–5896
- [136] HE, B. ; KEMPPAINEN, J. A. ; VOEGEL, J. J. ; GRONEMEYER, H. ; WILSON, E. M.: Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. In: *J. Biol. Chem.* 274 (1999), Dec, S. 37219–37225

- [137] HEINLEIN, C. A. ; CHANG, C.: The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. In: *Mol. Endocrinol.* 16 (2002), Oct, S. 2181–2187
- [138] HENDERSON, L. E. ; SOWDER, R. ; COPELAND, T. D. ; SMYTHERS, G. ; OROSZLAN, S.: Quantitative separation of murine leukemia virus proteins by reversed-phase high-pressure liquid chromatography reveals newly described gag and env cleavage products. In: *J. Virol.* 52 (1984), Nov, S. 492–500
- [139] HERBST, H. ; KÜHLER-OBBARIUS, C. ; LAUKE, H. ; SAUTER, M. ; MUELLER-LANTZSCH, N. ; HARMS, D. ; LÖNING, T.: Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in gonadoblastomas and gonadoblastoma-derived germ cell tumours. In: *Virchows Arch.* 434 (1999), Jan, S. 11–15
- [140] HESLIN, D. J. ; MURCIA, P. ; ARNAUD, F. ; VAN DOORSLAER, K. ; PALMARINI, M. ; LENZ, J.: 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. In: *J. Virol.* 83 (2009), Jan, S. 1105–1114
- [141] HOFFMAN, G. E. ; SMITH, M. S. ; VERBALIS, J. G.: c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. In: *Front Neuroendocrinol* 14 (1993), Jul, S. 173–213
- [142] HOFMANN, W. ; SCHUBERT, D. ; LABONTE, J. ; MUNSON, L. ; GIBSON, S. ; SCAMMELL, J. ; FERRIGNO, P. ; SODROSKI, J.: Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. In: *J. Virol.* 73 (1999), Dec, S. 10020–10028
- [143] HOHN, O. ; KRAUSE, H. ; BARBAROTTO, P. ; NIEDERSTADT, L. ; BEIMFORDE, N. ; DENNER, J. ; MILLER, K. ; KURTH, R. ; BANNERT, N.: Lack of evidence for xenotropic murine leukemia virus-related virus(XMRV) in German prostate cancer patients. In: *Retrovirology* 6 (2009), S. 92
- [144] HONG, S. ; KLEIN, E. A. ; DAS GUPTA, J. ; HANKE, K. ; WEIGHT, C. J. ; NGUYEN, C. ; GAUGHAN, C. ; KIM, K. A. ; BANNERT, N. ; KIRCHHOFF, F. ; MUNCH, J. ; SILVERMAN, R. H.: Fibrils of prostatic acid phosphatase fragments boost infections with XMRV (xenotropic murine leukemia virus-related virus), a human retrovirus associated with prostate cancer. In: *J. Virol.* 83 (2009), Jul, S. 6995–7003
- [145] HOPE, T. J.: The ins and outs of HIV Rev. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 365 (1999), May, S. 186–191

- [146] HOPE, T. J. ; McDONALD, D. ; HUANG, X. J. ; LOW, J. ; PARSLow, T. G.: Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: essential residues near the amino terminus. In: *J. Virol.* 64 (1990), Nov, S. 5360–5366
- [147] HSU, K. ; SEHARASEYON, J. ; DONG, P. ; BOUR, S. ; MARBÁN, E.: Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel. In: *Mol. Cell* 14 (2004), Apr, S. 259–267
- [148] HUGHES, J. F. ; COFFIN, J. M.: Human endogenous retroviral elements as indicators of ectopic recombination events in the primate genome. In: *Genetics* 171 (2005), Nov, S. 1183–1194
- [149] HULME, A. E. ; BOGERD, H. P. ; CULLEN, B. R. ; MORAN, J. V.: Selective inhibition of Alu retrotransposition by APOBEC3G. In: *Gene* 390 (2007), Apr, S. 199–205
- [150] HURTLEY, S. M. ; HELENIUS, A.: Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. In: *Annu. Rev. Cell Biol.* 5 (1989), S. 277–307
- [151] ISHIDA, T. ; OBATA, Y. ; OHARA, N. ; MATSUSHITA, H. ; SATO, S. ; UENAKA, A. ; SAIKA, T. ; MIYAMURA, T. ; CHAYAMA, K. ; NAKAMURA, Y. ; WADA, H. ; YAMASHITA, T. ; MORISHIMA, T. ; OLD, L. J. ; NAKAYAMA, E.: Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity. In: *Cancer Immun.* 8 (2008), S. 15
- [152] ISHIKAWA, J. ; KAISHO, T. ; TOMIZAWA, H. ; LEE, B. O. ; KOBUNE, Y. ; INAZAWA, J. ; ORITANI, K. ; ITOH, M. ; OCHI, T. ; ISHIHARA, K.: Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. In: *Genomics* 26 (1995), Apr, S. 527–534
- [153] JERN, P. ; SPERBER, G. O. ; BLOMBERG, J.: Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy. In: *Retrovirology* 2 (2005), S. 50
- [154] JIN, L. ; GUZIK, B. W. ; BOR, Y. C. ; REKOSH, D. ; HAMMARSKJÖLD, M. L.: Tap and NXT promote translation of unspliced mRNA. In: *Genes Dev.* 17 (2003), Dec, S. 3075–3086
- [155] JOHNSON, W. E. ; COFFIN, J. M.: Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999), Aug, S. 10254–10260
- [156] JOHNSTON, P. B. ; DUBAY, J. W. ; HUNTER, E.: Truncations of the simian immunodeficiency virus transmembrane protein confer expanded virus host range by removing a block to virus entry into cells. In: *J. Virol.* 67 (1993), Jun, S. 3077–3086

- [157] JOUVENET, N. ; NEIL, S. J. ; ZHADINA, M. ; ZANG, T. ; KRATOVAC, Z. ; LEE, Y. ; MCNATT, M. ; HATZIOANNOU, T. ; BIENIASZ, P. D.: Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. In: *J. Virol.* 83 (2009), Feb, S. 1837–1844
- [158] JOUVENET, N. ; SIMON, S. M. ; BIENIASZ, P. D.: Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009), Nov, S. 19114–19119
- [159] KANAI, Y. ; DOHMAE, N. ; HIROKAWA, N.: Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. In: *Neuron* 43 (2004), Aug, S. 513–525
- [160] KAYMAN, S. C. ; KOPELMAN, R. ; PROJAN, S. ; KINNEY, D. M. ; PINTER, A.: Mutational analysis of N-linked glycosylation sites of Friend murine leukemia virus envelope protein. In: *J. Virol.* 65 (1991), Oct, S. 5323–5332
- [161] KAZAZIAN, H. H.: Mobile elements: drivers of genome evolution. In: *Science* 303 (2004), Mar, S. 1626–1632
- [162] KEDERSHA, N. ; TISDALE, S. ; HICKMAN, T. ; ANDERSON, P.: Real-time and quantitative imaging of mammalian stress granules and processing bodies. In: *Meth. Enzymol.* 448 (2008), S. 521–552
- [163] KETTMANN, R. ; DESCHAMPS, J. ; CLEUTER, Y. ; COUEZ, D. ; BURNY, A. ; MARBAIX, G.: Leukemogenesis by bovine leukemia virus: proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (1982), Apr, S. 2465–2469
- [164] KIEBLER, M. A. ; DESGROSEILLERS, L.: Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. In: *Neuron* 25 (2000), Jan, S. 19–28
- [165] KIM, F. J. ; MANEL, N. ; BOUBLIK, Y. ; BATTINI, J. L. ; SITBON, M.: Human T-cell leukemia virus type 1 envelope-mediated syncytium formation can be activated in resistant Mammalian cell lines by a carboxy-terminal truncation of the envelope cytoplasmic domain. In: *J. Virol.* 77 (2003), Jan, S. 963–969
- [166] KIM, S. ; KIM, N. ; DONG, B. ; BOREN, D. ; LEE, S. A. ; DAS GUPTA, J. ; GAUGHAN, C. ; KLEIN, E. A. ; LEE, C. ; SILVERMAN, R. H. ; CHOW, S. A.: Integration site preference of xenotropic murine leukemia virus-related virus, a new human retrovirus associated with prostate cancer. In: *J. Virol.* 82 (2008), Oct, S. 9964–9977

- [167] KIM, Y. K. ; FURIC, L. ; DESGROSEILLERS, L. ; MAQUAT, L. E.: Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. In: *Cell* 120 (2005), Jan, S. 195–208
- [168] KIM, Y. K. ; FURIC, L. ; PARISIEN, M. ; MAJOR, F. ; DESGROSEILLERS, L. ; MAQUAT, L. E.: Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. In: *EMBO J.* 26 (2007), Jun, S. 2670–2681
- [169] KLEIMAN, A. ; SENYUTA, N. ; TRYAKIN, A. ; SAUTER, M. ; KARSELADZE, A. ; TJULANDIN, S. ; GURTSEVITCH, V. ; MUELLER-LANTZSCH, N.: HERV-K(HML-2) GAG/ENV antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumors. In: *Int. J. Cancer* 110 (2004), Jun, S. 459–461
- [170] KORNFELD, R. ; KORNFELD, S.: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. In: *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985), S. 631–664
- [171] KOZAK, S. L. ; MARIN, M. ; ROSE, K. M. ; BYSTROM, C. ; KABAT, D.: The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. In: *J. Biol. Chem.* 281 (2006), Sep, S. 29105–29119
- [172] KRICHEVSKY, A. M. ; KOSIK, K. S. ; KOSIK, K. S.: Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. In: *Neuron* 32 (2001), Nov, S. 683–696
- [173] KUBOTA, S. ; SIOMI, H. ; SATOH, T. ; ENDO, S. ; MAKI, M. ; HATANAKA, M.: Functional similarity of HIV-I rev and HTLV-I rex proteins: identification of a new nucleolar-targeting signal in rev protein. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 (1989), Aug, S. 963–970
- [174] KUFE, D. ; POLLOCK, R. ; WEICHSELBAUM, R. ; BAST, R. ; GANSTER, U. ; HOLLAND, J. ; FREI, E.: Cancer Medicine (vol. Auflage), Mechanism of Androgen Action. In: *BC DECKER* 6 (2003), Jun, S. 1–2300
- [175] KURTH, R. ; BANNERT, N.: Retroviruses Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis. In: *Caister Academic Press* 1 (2010), Jan, S. 73
- [176] KÖHRMANN, M. ; LUO, M. ; KAETHER, C. ; DESGROSEILLERS, L. ; DOTTI, C. G. ; KIEBLER, M. A.: Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. In: *Mol. Biol. Cell* 10 (1999), Sep, S. 2945–2953
- [177] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Aug, S. 680–685

- [178] LAMB, J. R. ; TUGENDREICH, S. ; HIETER, P.: Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? In: *Trends Biochem. Sci.* 20 (1995), Jul, S. 257–259
- [179] LANDER, E. S. ; LINTON, L. M. ; BIRREN, B. ; NUSBAUM, C. ; ZODY, M. C. ; BALDWIN, J. ; DEVON, K. ; DEWAR, K. ; DOYLE, M. ; FITZHUGH, W. ; FUNKE, R. ; GAGE, D. ; HARRIS, K. ; HEAFORD, A. ; HOWLAND, J. ; KANN, L. ; LEHOCZKY, J. ; ... ; COLLINS, F. ; GUYER, M. S. ; PETERSON, J. ; FELSENFELD, A. ; WETTERSTRAND, K. A. ; PATRINOS, A. ; MORGAN, M. J. ; JONG, P. de ; CATANESE, J. J. ; OSOEGAWA, K. ; SHIZUYA, H. ; CHOI, S. ; CHEN, Y. J. ; SZUSTAKOWKI, J.: Initial sequencing and analysis of the human genome. In: *Nature* 409 (2001), Feb, S. 860–921
- [180] LANDRY, J. R. ; MAGER, D. L.: Functional analysis of the endogenous retroviral promoter of the human endothelin B receptor gene. In: *J. Virol.* 77 (2003), Jul, S. 7459–7466
- [181] LANDRY, J. R. ; MAGER, D. L. ; WILHELM, B. T.: Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes. In: *Trends Genet.* 19 (2003), Nov, S. 640–648
- [182] LANDRY, J. R. ; ROUHI, A. ; MEDSTRAND, P. ; MAGER, D. L.: The Opitz syndrome gene *Mid1* is transcribed from a human endogenous retroviral promoter. In: *Mol. Biol. Evol.* 19 (2002), Nov, S. 1934–1942
- [183] LAPOUGE, K. ; SMITH, S. J. ; WALKER, P. A. ; GAMBLIN, S. J. ; SMERDON, S. J. ; RITTINGER, K.: Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP. In: *Mol. Cell* 6 (2000), Oct, S. 899–907
- [184] LAWRENCE, J. B. ; COCHRANE, A. W. ; JOHNSON, C. V. ; PERKINS, A. ; ROSEN, C. A.: The HIV-1 Rev protein: a model system for coupled RNA transport and translation. In: *New Biol.* 3 (1991), Dec, S. 1220–1232
- [185] LEE, J. T. ; YU, S. S. ; HAN, E. ; KIM, S. ; KIM, S.: Engineering the splice acceptor for improved gene expression and viral titer in an MLV-based retroviral vector. In: *Gene Ther.* 11 (2004), Jan, S. 94–99
- [186] LEE, Y. N. ; BIENIASZ, P. D.: Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. In: *PLoS Pathog.* 3 (2007), Jan, S. e10
- [187] LEE, Y. N. ; MALIM, M. H. ; BIENIASZ, P. D.: Hypermutation of an ancient human retrovirus by APOBEC3G. In: *J. Virol.* 82 (2008), Sep, S. 8762–8770
- [188] LEVER, A. M.: HIV-1 RNA packaging. In: *Adv. Pharmacol.* 55 (2007), S. 1–32

- [189] LI, X. ; SODROSKI, J.: The TRIM5alpha B-box 2 domain promotes cooperative binding to the retroviral capsid by mediating higher-order self-association. In: *J. Virol.* 82 (2008), Dec, S. 11495–11502
- [190] LINGAPPA, V. R.: Intracellular traffic of newly synthesized proteins. Current understanding and future prospects. In: *J. Clin. Invest.* 83 (1989), Mar, S. 739–751
- [191] LIOU, S. T. ; WANG, C.: Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein is composed of three structural units with distinct functions. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 435 (2005), Mar, S. 253–263
- [192] LOMBARDI, V. C. ; RUSCETTI, F. W. ; DAS GUPTA, J. ; PFOST, M. A. ; HAGEN, K. S. ; PETERSON, D. L. ; RUSCETTI, S. K. ; BAGNI, R. K. ; PETROW-SADOWSKI, C. ; GOLD, B. ; DEAN, M. ; SILVERMAN, R. H. ; MIKOVITS, J. A.: Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. In: *Science* 326 (2009), Oct, S. 585–589
- [193] LOOSE-MITCHELL, D. S. ; CHIAPPETTA, C. ; STANCEL, G. M.: Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid. In: *Mol. Endocrinol.* 2 (1988), Oct, S. 946–951
- [194] LOVSIN, N. ; PETERLIN, B. M.: APOBEC3 proteins inhibit LINE-1 retrotransposition in the absence of ORF1p binding. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1178 (2009), Oct, S. 268–275
- [195] LUCKE, S. ; GRUNWALD, T. ; UBERLA, K.: Reduced mobilization of Rev-responsive element-deficient lentiviral vectors. In: *J. Virol.* 79 (2005), Jul, S. 9359–9362
- [196] LUO, M. ; DUCHAÎNE, T. F. ; DESGROSELLERS, L.: Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. In: *Biochem. J.* 365 (2002), Aug, S. 817–824
- [197] LUUKKONEN, B. G. ; TAN, W. ; SCHWARTZ, S.: Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance. In: *J. Virol.* 69 (1995), Jul, S. 4086–4094
- [198] LÖWER, R. ; LÖWER, J. ; FRANK, H. ; HARZMANN, R. ; KURTH, R.: Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. In: *J. Gen. Virol.* 65 ( Pt 5) (1984), May, S. 887–898
- [199] LÖWER, R. ; LÖWER, J. ; KURTH, R.: The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996), May, S. 5177–5184



- [200] LÖWER, R. ; TÖNJES, R. R. ; KORBMACHER, C. ; KURTH, R. ; LÖWER, J.: Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. In: *J. Virol.* 69 (1995), Jan, S. 141–149
- [201] MACCHI, P. ; BROWNAWELL, A. M. ; GRUNEWALD, B. ; DESGROSEILLERS, L. ; MACARA, I. G. ; KIEBLER, M. A.: The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2004), Jul, S. 31440–31444
- [202] MACFARLANE, C. ; SIMMONDS, P.: Allelic variation of HERV-K(HML-2) endogenous retroviral elements in human populations. In: *J. Mol. Evol.* 59 (2004), Nov, S. 642–656
- [203] MADANI, N. ; KABAT, D.: An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. In: *J. Virol.* 72 (1998), Dec, S. 10251–10255
- [204] MADORE, S. J. ; TILEY, L. S. ; MALIM, M. H. ; CULLEN, B. R.: Sequence requirements for Rev multimerization in vivo. In: *Virology* 202 (1994), Jul, S. 186–194
- [205] MAGIN, C. ; HESSE, J. ; LÖWER, J. ; LÖWER, R.: Corf, the Rev/Rex homologue of HTDV/HERV-K, encodes an arginine-rich nuclear localization signal that exerts a trans-dominant phenotype when mutated. In: *Virology* 274 (2000), Aug, S. 11–16
- [206] MAGIN, C. ; LÖWER, R. ; LÖWER, J.: cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. In: *J. Virol.* 73 (1999), Nov, S. 9496–9507
- [207] MAGIN-LACHMANN, C. ; HAHN, S. ; STROBEL, H. ; HELD, U. ; LÖWER, J. ; LÖWER, R.: Rec (formerly Corf) function requires interaction with a complex, folded RNA structure within its responsive element rather than binding to a discrete specific binding site. In: *J. Virol.* 75 (2001), Nov, S. 10359–10371
- [208] MALIM, M. H. ; BÖHNLEIN, S. ; HAUBER, J. ; CULLEN, B. R.: Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator—derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. In: *Cell* 58 (1989), Jul, S. 205–214
- [209] MALIM, M. H. ; CULLEN, B. R.: HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. In: *Cell* 65 (1991), Apr, S. 241–248

- [210] MALIM, M. H. ; MCCARN, D. F. ; TILEY, L. S. ; CULLEN, B. R.: Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. In: *J. Virol.* 65 (1991), Aug, S. 4248–4254
- [211] MALLARDO, M. ; DEITINGHOFF, A. ; MÜLLER, J. ; GOETZE, B. ; MACCHI, P. ; PETERS, C. ; KIEBLER, M. A.: Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003), Feb, S. 2100–2105
- [212] MANGENEY, M. ; HEIDMANN, T.: Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998), Dec, S. 14920–14925
- [213] MANGENEY, M. ; PARSEVAL, N. de ; THOMAS, G. ; HEIDMANN, T.: The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. In: *J. Gen. Virol.* 82 (2001), Oct, S. 2515–2518
- [214] MANGENEY, M. ; POTHLICHT, J. ; RENARD, M. ; DUCOS, B. ; HEIDMANN, T.: Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo. In: *Cancer Res.* 65 (2005), Apr, S. 2588–2591
- [215] MANGENEY, M. ; RENARD, M. ; SCHLECHT-LOUF, G. ; BOUALLAGA, I. ; HEIDMANN, O. ; LETZELTER, C. ; RICHAUD, A. ; DUCOS, B. ; HEIDMANN, T.: Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007), Dec, S. 20534–20539
- [216] MANN, D. A. ; MIKAÉLIAN, I. ; ZEMMEL, R. W. ; GREEN, S. M. ; LOWE, A. D. ; KIMURA, T. ; SINGH, M. ; BUTLER, P. J. ; GAIT, M. J. ; KARN, J.: A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. In: *J. Mol. Biol.* 241 (1994), Aug, S. 193–207
- [217] MANRIQUE, J. M. ; CELMA, C. C. ; HUNTER, E. ; AFFRANCHINO, J. L. ; GONZÁLEZ, S. A.: Positive and negative modulation of virus infectivity and envelope glycoprotein incorporation into virions by amino acid substitutions at the N terminus of the simian immunodeficiency virus matrix protein. In: *J. Virol.* 77 (2003), Oct, S. 10881–10888
- [218] MARIÓN, R. M. ; FORTES, P. ; BELOSO, A. ; DOTTI, C. ; ORTÍN, J.: A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999), Mar, S. 2212–2219
- [219] MATSUMOTO, K. ; WASSARMAN, K. M. ; WOLFFE, A. P.: Nuclear history of a pre-mRNA determines the translational activity of cytoplasmic mRNA. In: *EMBO J.* 17 (1998), Apr, S. 2107–2121

- [220] MATTIUZZO, G. ; IVOL, S. ; TAKEUCHI, Y.: Regulation of porcine endogenous retrovirus release by porcine and human tetherins. In: *J Virol* (2009), Dec
- [221] McCUNE, J. M. ; RABIN, L. B. ; FEINBERG, M. B. ; LIEBERMAN, M. ; KOSEK, J. C. ; REYES, G. R. ; WEISSMAN, I. L.: Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. In: *Cell* 53 (1988), Apr, S. 55–67
- [222] McINERNEY, G. M. ; KEDERSHA, N. L. ; KAUFMAN, R. J. ; ANDERSON, P. ; LILJESTRÖM, P.: Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. In: *Mol. Biol. Cell* 16 (2005), Aug, S. 3753–3763
- [223] McLACHLAN, R. I. ; WREFORD, N. G. ; O'DONNELL, L. ; KRETZER, D. M. ; ROBERTSON, D. M.: The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. In: *J. Endocrinol.* 148 (1996), Jan, S. 1–9
- [224] MEGATI, S. ; GARCIA-HAND, D. ; CAPPELLO, S. ; ROOPCHAND, V. ; MASOOD, A. ; XU, R. ; LUCKAY, A. ; CHONG, S. Y. ; ROSATI, M. ; SACKITEY, S. ; WEINER, D. B. ; FELBER, B. K. ; PAVLAKIS, G. N. ; ISRAEL, Z. R. ; SMITH, L. R. ; ELDRIDGE, J. H. ; SIDHU, M. K. ; EGAN, M. A.: Modifying the HIV-1 env gp160 gene to improve pDNA vaccine-elicited cell-mediated immune responses. In: *Vaccine* 26 (2008), Sep, S. 5083–5094
- [225] MERTEN, C. A. ; STITZ, J. ; BRAUN, G. ; POESCHLA, E. M. ; CICHUTEK, K. ; BUCHHOLZ, C. J.: Directed evolution of retrovirus envelope protein cytoplasmic tails guided by functional incorporation into lentivirus particles. In: *J. Virol.* 79 (2005), Jan, S. 834–840
- [226] MI, S. ; LEE, X. ; LI, X. ; VELDMAN, G. M. ; FINNERTY, H. ; RACIE, L. ; LAVALLIE, E. ; TANG, X. Y. ; EDOUARD, P. ; HOWES, S. ; KEITH, J. C. ; MCCOY, J. M.: Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. In: *Nature* 403 (2000), Feb, S. 785–789
- [227] MIGLIACCIO, A. ; CASTORIA, G. ; DI DOMENICO, M. ; FALCO, A. de ; BILANCIO, A. ; LOMBARDI, M. ; BARONE, M. V. ; AMETRANO, D. ; ZANNINI, M. S. ; ABBONDANZA, C. ; AURICCHIO, F.: Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. In: *EMBO J.* 19 (2000), Oct, S. 5406–5417
- [228] MIGLIACCIO, A. ; DI DOMENICO, M. ; CASTORIA, G. ; FALCO, A. de ; BONTEMPO, P. ; NOLA, E. ; AURICCHIO, F.: Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. In: *EMBO J.* 15 (1996), Mar, S. 1292–1300

- [229] MIGLIACCIO, A. ; PICCOLO, D. ; CASTORIA, G. ; DI DOMENICO, M. ; BILANCIO, A. ; LOMBARDI, M. ; GONG, W. ; BEATO, M. ; AURICCHIO, F.: Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. In: *EMBO J.* 17 (1998), Apr, S. 2008–2018
- [230] MIKI, T. ; TAKANO, K. ; YONEDA, Y.: The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleocytoplasmic shuttling function. In: *Cell Struct. Funct.* 30 (2005), S. 51–56
- [231] MODROW, S. ; FALKE, D. ; TRUYEN, U.: Retroviren, Molekulare Virologie (vol. Auflage). In: *Spektrum Akademischer Verlag GmbH* 1 (2003), Jun, S. 390–448
- [232] MOORADIAN, A. D. ; MORLEY, J. E. ; KORENMAN, S. G.: Biological actions of androgens. In: *Endocr. Rev.* 8 (1987), Feb, S. 1–28
- [233] MORABITO, J. E. ; TROTT, J. F. ; KORZ, D. M. ; FAIRFIELD, H. E. ; BUCK, S. H. ; HOVEY, R. C.: A 5' distal palindrome within the mouse mammary tumor virus-long terminal repeat recruits a mammary gland-specific complex and is required for a synergistic response to progesterone plus prolactin. In: *J. Mol. Endocrinol.* 41 (2008), Aug, S. 75–90
- [234] MOYES, D. L. ; MARTIN, A. ; SAWCER, S. ; TEMPERTON, N. ; WORTHINGTON, J. ; GRIFFITHS, D. J. ; VENABLES, P. J.: The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. In: *Genomics* 86 (2005), Sep, S. 337–341
- [235] MULLIGAN, M. J. ; YAMSHCHIKOV, G. V. ; RITTER, G. D. ; GAO, F. ; JIN, M. J. ; NAIL, C. D. ; SPIES, C. P. ; HAHN, B. H. ; COMPANS, R. W.: Cytoplasmic domain truncation enhances fusion activity by the exterior glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 2 in selected cell types. In: *J. Virol.* 66 (1992), Jun, S. 3971–3975
- [236] MUSTER, T. ; WALTENBERGER, A. ; GRASSAUER, A. ; HIRSCHL, S. ; CAUCIG, P. ; ROMIRER, I. ; FÖDINGER, D. ; SEPPELE, H. ; SCHANAB, O. ; MAGIN-LACHMANN, C. ; LÖWER, R. ; JANSEN, B. ; PEHAMBERGER, H. ; WOLFF, K.: An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. In: *Cancer Res.* 63 (2003), Dec, S. 8735–8741
- [237] MÜNCH, J. ; RÜCKER, E. ; STÄNDKER, L. ; ADERMANN, K. ; GOFFINET, C. ; SCHINDLER, M. ; WILDUM, S. ; CHINNADURAI, R. ; RAJAN, D. ; SPECHT, A. ; GIMÉNEZ-GALLEGO, G. ; SÁNCHEZ, P. C. ; FOWLER, D. M. ; KOULOV, A. ; KELLY, J. W. ; MOTHES, W. ; GRIVEL, J. C. ; MARGOLIS, L. ; KEPPLER, O. T. ; FORSSMANN, W. G. ; KIRCHHOFF, F.: Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. In: *Cell* 131 (2007), Dec, S. 1059–1071

- [238] NEIL, S. J. ; SANDRIN, V. ; SUNDQUIST, W. I. ; BIENIASZ, P. D.: An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. In: *Cell Host Microbe* 2 (2007), Sep, S. 193–203
- [239] NEIL, S. J. ; ZANG, T. ; BIENIASZ, P. D.: Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. In: *Nature* 451 (2008), Jan, S. 425–430
- [240] NETHE, M. ; BERKHOUT, B. ; KUYL, A. C. d.: Retroviral superinfection resistance. In: *Retrovirology* 2 (2005), S. 52
- [241] NEWMAN, R. M. ; HALL, L. ; KIRMAIER, A. ; POZZI, L. A. ; PERY, E. ; FARZAN, M. ; O'NEIL, S. P. ; JOHNSON, W.: Evolution of a TRIM5-CypA splice isoform in old world monkeys. In: *PLoS Pathog.* 4 (2008), Feb, S. e1000003
- [242] NISOLE, S. ; STOYE, J. P. ; SAÏB, A.: TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. In: *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005), Oct, S. 799–808
- [243] OLSEN, H. S. ; COCHRANE, A. W. ; DILLON, P. J. ; NALIN, C. M. ; ROSEN, C. A.: Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids. In: *Genes Dev.* 4 (1990), Aug, S. 1357–1364
- [244] ONO, M. ; KAWAKAMI, M. ; TAKEZAWA, T.: A novel human nonviral retroposon derived from an endogenous retrovirus. In: *Nucleic Acids Res.* 15 (1987), Nov, S. 8725–8737
- [245] ONO, M. ; YASUNAGA, T. ; MIYATA, T. ; USHIKUBO, H.: Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. In: *J. Virol.* 60 (1986), Nov, S. 589–598
- [246] OZEL, M. ; PAULI, G. ; GELDERBLUM, H. R.: The organization of the envelope projections on the surface of HIV. In: *Arch. Virol.* 100 (1988), S. 255–266
- [247] PACK, G. T. ; SCHARNAGEL, I. M.: The prognosis for malignant melanoma in the pregnant woman. In: *Cancer* 4 (1951), Mar, S. 324–334
- [248] PAIS-CORREIA, A. M. ; SACHSE, M. ; GUADAGNINI, S. ; ROBBIATI, V. ; LASSERRE, R. ; GESSAIN, A. ; GOUT, O. ; ALCOVER, A. ; THOULOUBE, M. I.: Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. In: *Nat. Med.* 16 (2010), Jan, S. 83–89

- [249] PALMARINI, M. ; SHARP, J. M. ; HERAS, M. de l. ; FAN, H.: Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. In: *J. Virol.* 73 (1999), Aug, S. 6964–6972
- [250] PALMERI, D. ; MALIM, M. H.: The human T-cell leukemia virus type 1 posttranscriptional trans-activator Rex contains a nuclear export signal. In: *J. Virol.* 70 (1996), Sep, S. 6442–6445
- [251] PALMERI, D. ; MALIM, M. H.: Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999), Feb, S. 1218–1225
- [252] PARKER, R. ; SHETH, U.: P bodies and the control of mRNA translation and degradation. In: *Mol. Cell* 25 (2007), Mar, S. 635–646
- [253] PARSEVAL, N. de ; LAZAR, V. ; CASELLA, J. F. ; BENIT, L. ; HEIDMANN, T.: Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. In: *J. Virol.* 77 (2003), Oct, S. 10414–10422
- [254] PEREZ, L. G. ; HUNTER, E.: Mutations within the proteolytic cleavage site of the Rous sarcoma virus glycoprotein that block processing to gp85 and gp37. In: *J. Virol.* 61 (1987), May, S. 1609–1614
- [255] PERKINS, A. ; COCHRANE, A. W. ; RUBEN, S. M. ; ROSEN, C. A.: Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus rev protein. In: *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2 (1989), S. 256–263
- [256] PFEFFER, S. R. ; ROTHMAN, J. E.: Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. In: *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987), S. 829–852
- [257] PIGUET, V. ; WAN, L. ; BOREL, C. ; MANGASARIAN, A. ; DEMAUREX, N. ; THOMAS, G. ; TRONO, D.: HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. In: *Nat. Cell Biol.* 2 (2000), Mar, S. 163–167
- [258] PINTER, A. ; HONNEN, W. J. ; LI, J. S.: Studies with inhibitors of oligosaccharide processing indicate a functional role for complex sugars in the transport and proteolysis of Friend mink cell focus-inducing murine leukemia virus envelope proteins. In: *Virology* 136 (1984), Jul, S. 196–210
- [259] POIESZ, B. J. ; RUSCETTI, F. W. ; GAZDAR, A. F. ; BUNN, P. A. ; MINNA, J. D. ; GALLO, R. C.: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a

- patient with cutaneous T-cell lymphoma. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 (1980), Dec, S. 7415–7419
- [260] POIGNARD, P. ; SAPHIRE, E. O. ; PARREN, P. W. ; BURTON, D. R.: gp120: Biologic aspects of structural features. In: *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001), S. 253–274
- [261] POLLARD, V. W. ; MALIM, M. H.: The HIV-1 Rev protein. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 52 (1998), S. 491–532
- [262] PRATT, W. B. ; GALIGNIANA, M. D. ; HARRELL, J. M. ; DEFranco, D. B.: Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. In: *Cell. Signal.* 16 (2004), Aug, S. 857–872
- [263] PRATT, W. B. ; TOFT, D. O.: Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. In: *Endocr. Rev.* 18 (1997), Jun, S. 306–360
- [264] PRESTON, B. D. ; POIESZ, B. J. ; LOEB, L. A.: Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. In: *Science* 242 (1988), Nov, S. 1168–1171
- [265] PUFFER, B. A. ; PÖHLMANN, S. ; EDINGER, A. L. ; CARLIN, D. ; SANCHEZ, M. D. ; REITTER, J. ; WATRY, D. D. ; FOX, H. S. ; DESROSIERS, R. C. ; DOMS, R. W.: CD4 independence of simian immunodeficiency virus Envs is associated with macrophage tropism, neutralization sensitivity, and attenuated pathogenicity. In: *J. Virol.* 76 (2002), Mar, S. 2595–2605
- [266] QUIÑONES-KOCHS, M. I. ; BUONOCORE, L. ; ROSE, J. K.: Role of N-linked glycans in a human immunodeficiency virus envelope glycoprotein: effects on protein function and the neutralizing antibody response. In: *J. Virol.* 76 (2002), May, S. 4199–4211
- [267] RAGHEB, J. A. ; ANDERSON, W. F.: Uncoupled expression of Moloney murine leukemia virus envelope polypeptides SU and TM: a functional analysis of the role of TM domains in viral entry. In: *J. Virol.* 68 (1994), May, S. 3207–3219
- [268] RAMOS, A. ; GRÜNERT, S. ; ADAMS, J. ; MICKLEM, D. R. ; PROCTOR, M. R. ; FREUND, S. ; BYCROFT, M. ; ST JOHNSTON, D. ; VARANI, G.: RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. In: *EMBO J.* 19 (2000), Mar, S. 997–1009
- [269] REIN, A. ; MIRRO, J. ; HAYNES, J. G. ; ERNST, S. M. ; NAGASHIMA, K.: Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus Env protein. In: *J. Virol.* 68 (1994), Mar, S. 1773–1781

- [270] REVELLI, A. ; MASSOBRIO, M. ; TESARIK, J.: Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. In: *Endocr. Rev.* 19 (1998), Feb, S. 3–17
- [271] RIECHMANN, V. ; EPHRUSSI, A.: Axis formation during *Drosophila* oogenesis. In: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11 (2001), Aug, S. 374–383
- [272] RITTER, G. D. ; MULLIGAN, M. J. ; LYDY, S. L. ; COMPANS, R. W.: Cell fusion activity of the simian immunodeficiency virus envelope protein is modulated by the intracytoplasmic domain. In: *Virology* 197 (1993), Nov, S. 255–264
- [273] ROAN, N. R. ; MÜNCH, J. ; ARHEL, N. ; MOTHESE, W. ; NEIDLEMAN, J. ; KOBAYASHI, A. ; SMITH-MCCUNE, K. ; KIRCHHOFF, F. ; GREENE, W. C.: The cationic properties of SEVI underlie its ability to enhance human immunodeficiency virus infection. In: *J. Virol.* 83 (2009), Jan, S. 73–80
- [274] ROSS, S. R.: Are viruses inhibited by APOBEC3 molecules from their host species? In: *PLoS Pathog.* 5 (2009), Apr, S. e1000347
- [275] ROTHMAN, J. E. ; LODISH, H. F.: Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein. In: *Nature* 269 (1977), Oct, S. 775–780
- [276] ROY, A. K. ; LAVROVSKY, Y. ; SONG, C. S. ; CHEN, S. ; JUNG, M. H. ; VELU, N. K. ; BI, B. Y. ; CHATTERJEE, B.: Regulation of androgen action. In: *Vitam. Horm.* 55 (1999), S. 309–352
- [277] RÖSLER, C. ; KÖCK, J. ; KANN, M. ; MALIM, M. H. ; BLUM, H. E. ; BAUMERT, T. F. ; WEIZSÄCKER, F. von: APOBEC-mediated interference with hepatitis virus production. In: *Hepatology* 42 (2005), Aug, S. 301–309
- [278] SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F. ; MANIATIS, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition). In: *CSH Press.* 2 (1989), S. 1–1659
- [279] SANDERS, R. W. ; SCHIFFNER, L. ; MASTER, A. ; KAJUMO, F. ; GUO, Y. ; DRAGIC, T. ; MOORE, J. P. ; BINLEY, J. M.: Variable-loop-deleted variants of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein can be stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits. In: *J. Virol.* 74 (2000), Jun, S. 5091–5100
- [280] SANGER, F. ; NICKLEN, S. ; COULSON, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (1977), Dec, S. 5463–5467
- [281] SASADA, A. ; TAKAORI-KONDO, A. ; SHIRAKAWA, K. ; KOBAYASHI, M. ; ABUDU, A. ; HISHIZAWA, M. ; IMADA, K. ; TANAKA, Y. ; UCHIYAMA, T.: APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. In: *Retrovirology* 2 (2005), S. 32



- [282] SCHALLER, T. ; YLINEN, L. M. ; WEBB, B. L. ; SINGH, S. ; TOWERS, G. J.: Fusion of cyclophilin A to Fv1 enables cyclosporine-sensitive restriction of human and feline immunodeficiency viruses. In: *J. Virol.* 81 (2007), Sep, S. 10055–10063
- [283] SCHANTL, J. A. ; ROZA, M. ; DE JONG, A. P. ; STROUS, G. J.: Small glutamine-rich tetratri-copeptide repeat-containing protein (SGT) interacts with the ubiquitin-dependent endocytosis (UbE) motif of the growth hormone receptor. In: *Biochem. J.* 373 (2003), Aug, S. 855–863
- [284] SCHEUFLER, C. ; BRINKER, A. ; BOURENKOV, G. ; PEGORARO, S. ; MORODER, L. ; BARTUNIK, H. ; HARTL, F. U. ; MOAREFI, I.: Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. In: *Cell* 101 (2000), Apr, S. 199–210
- [285] SCHIESTL, R. H. ; GIETZ, R. D.: High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. In: *Curr Genet* 16 (1989), Nr. 5-6, S. 339–46
- [286] SCHLABERG, R. ; CHOE, D. J. ; BROWN, K. R. ; THAKER, H. M. ; SINGH, I. R.: XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009), Sep, S. 16351–16356
- [287] SCHULD, A. J. ; ADAMS, J. H. ; DAVIDSON, C. M. ; MICKLEM, D. R. ; HASELOFF, J. ; ST JOHNSTON, D. ; BRAND, A. H.: Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. In: *Genes Dev.* 12 (1998), Jun, S. 1847–1857
- [288] SEGREF, A. ; SHARMA, K. ; DOYE, V. ; HELLWIG, A. ; HUBER, J. ; LÜHRMANN, R. ; HURT, E.: Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)<sup>+</sup> RNA and nuclear pores. In: *EMBO J.* 16 (1997), Jun, S. 3256–3271
- [289] SFAKIANOS, J. N. ; HUNTER, E.: M-PMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome. In: *Traffic* 4 (2003), Oct, S. 671–680
- [290] SHACKLETT, B. L. ; SHAW, K. E. ; ADAMSON, L. A. ; WILKENS, D. T. ; COX, C. A. ; MONTEFIORI, D. C. ; GARDNER, M. B. ; SONIGO, P. ; LUCIW, P. A.: Live, attenuated simian immunodeficiency virus SIVmac-M4, with point mutations in the Env transmembrane protein intracytoplasmic domain, provides partial protection from mucosal challenge with pathogenic SIVmac251. In: *J. Virol.* 76 (2002), Nov, S. 11365–11378
- [291] SHACKLETT, B. L. ; WEBER, C. J. ; SHAW, K. E. ; KEDDIE, E. M. ; GARDNER, M. B. ; SONIGO, P. ; LUCIW, P. A.: The intracytoplasmic domain of the Env transmembrane protein is a locus for attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac in rhesus macaques. In: *J. Virol.* 74 (2000), Jul, S. 5836–5844

- [292] SIMON, J. H. ; GADDIS, N. C. ; FOUCHIER, R. A. ; MALIM, M. H.: Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. In: *Nat. Med.* 4 (1998), Dec, S. 1397–1400
- [293] SMIT, A. F.: Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. In: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9 (1999), Dec, S. 657–663
- [294] SMITH, J. A. ; SCHMECHEL, S. C. ; RAGHAVAN, A. ; ABELSON, M. ; REILLY, C. ; KATZE, M. G. ; KAUFMAN, R. J. ; BOHJANEN, P. R. ; SCHIFF, L. A.: Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. In: *J. Virol.* 80 (2006), Feb, S. 2019–2033
- [295] SOUGRAT, R. ; BARTESAGHI, A. ; LIFSON, J. D. ; BENNETT, A. E. ; BESS, J. W. ; ZABRANSKY, D. J. ; SUBRAMANIAM, S.: Electron tomography of the contact between T cells and SIV/HIV-1: implications for viral entry. In: *PLoS Pathog.* 3 (2007), May, S. e63
- [296] SOUTHGATE, C. ; ZAPP, M. L. ; GREEN, M. R.: Activation of transcription by HIV-1 Tat protein tethered to nascent RNA through another protein. In: *Nature* 345 (1990), Jun, S. 640–642
- [297] STAUBER, R. H. ; AFONINA, E. ; GULNIK, S. ; ERICKSON, J. ; PAVLAKIS, G. N.: Analysis of intracellular trafficking and interactions of cytoplasmic HIV-1 Rev mutants in living cells. In: *Virology* 251 (1998), Nov, S. 38–48
- [298] STEVENSON, M. ; STANWICK, T. L. ; DEMPSEY, M. P. ; LAMONICA, C. A.: HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. In: *EMBO J.* 9 (1990), May, S. 1551–1560
- [299] SUGIMOTO, J. ; MATSUURA, N. ; KINJO, Y. ; TAKASU, N. ; ODA, T. ; JINNO, Y.: Transcriptionally active HERV-K genes: identification, isolation, and chromosomal mapping. In: *Genomics* 72 (2001), Mar, S. 137–144
- [300] SWANSON, C. M. ; MALIM, M. H.: Retrovirus RNA trafficking: from chromatin to invasive genomes. In: *Traffic* 7 (2006), Nov, S. 1440–1450
- [301] SWANSON, C. M. ; PUFFER, B. A. ; AHMAD, K. M. ; DOMS, R. W. ; MALIM, M. H.: Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly. In: *EMBO J.* 23 (2004), Jul, S. 2632–2640
- [302] TAKEDA, E. ; TSUJI-KAWAHARA, S. ; SAKAMOTO, M. ; LANGLOIS, M. A. ; NEUBERGER, M. S. ; RADA, C. ; MIYAZAWA, M.: Mouse APOBEC3 restricts friend leukemia virus infection and pathogenesis in vivo. In: *J. Virol.* 82 (2008), Nov, S. 10998–11008

- [303] TANG, S. J. ; MEULEMANS, D. ; VAZQUEZ, L. ; COLACO, N. ; SCHUMAN, E.: A role for a rat homolog of stauferin in the transport of RNA to neuronal dendrites. In: *Neuron* 32 (2001), Nov, S. 463–475
- [304] TARLINTON, R. E. ; MEERS, J. ; YOUNG, P. R.: Retroviral invasion of the koala genome. In: *Nature* 442 (2006), Jul, S. 79–81
- [305] TAYLOR, G. M. ; SANDERS, D. A.: The role of the membrane-spanning domain sequence in glycoprotein-mediated membrane fusion. In: *Mol. Biol. Cell* 10 (1999), Sep, S. 2803–2815
- [306] TEIXEIRA, D. ; PARKER, R.: Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Mol. Biol. Cell* 18 (2007), Jun, S. 2274–2287
- [307] TENG, B. ; BURANT, C. F. ; DAVIDSON, N. O.: Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. In: *Science* 260 (1993), Jun, S. 1816–1819
- [308] THOMAS, M. G. ; MARTINEZ TOSAR, L. J. ; DESBATS, M. A. ; LEISHMAN, C. C. ; BOCCACCIO, G. L.: Mammalian Stauferin 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. In: *J. Cell. Sci.* 122 (2009), Feb, S. 563–573
- [309] THOMAS, M. G. ; MARTINEZ TOSAR, L. J. ; LOSCHI, M. ; PASQUINI, J. M. ; CORREALE, J. ; KINDLER, S. ; BOCCACCIO, G. L.: Stauferin recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. In: *Mol. Biol. Cell* 16 (2005), Jan, S. 405–420
- [310] THOMAS, S. L. ; OFT, M. ; JAKSCHE, H. ; CASARI, G. ; HEGER, P. ; DOBROVNIK, M. ; BEVEC, D. ; HAUBER, J.: Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. In: *J. Virol.* 72 (1998), Apr, S. 2935–2944
- [311] TOBABEN, S. ; THAKUR, P. ; FERNÁNDEZ-CHACÓN, R. ; SÜDHOF, T. C. ; RETTIG, J. ; STAHL, B.: A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. In: *Neuron* 31 (2001), Sep, S. 987–999
- [312] TRAPMAN, J. ; BRINKMANN, A. O.: The androgen receptor in prostate cancer. In: *Pathol. Res. Pract.* 192 (1996), Jul, S. 752–760
- [313] TURNER, G. ; BARBULESCU, M. ; SU, M. ; JENSEN-SEAMAN, M. I. ; KIDD, K. K. ; LENZ, J.: Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. In: *Curr. Biol.* 11 (2001), Oct, S. 1531–1535
- [314] TÖNJES, R. R. ; LIMBACH, C. ; LÖWER, R. ; KURTH, R.: Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in insect and mammalian cells. In: *J. Virol.* 71 (1997), Apr, S. 2747–2756

- [315] URISMAN, A. ; MOLINARO, R. J. ; FISCHER, N. ; PLUMMER, S. J. ; CASEY, G. ; KLEIN, E. A. ; MALATHI, K. ; MAGI-GALLUZZI, C. ; TUBBS, R. R. ; GANEM, D. ; SILVERMAN, R. H. ; DERISI, J. L.: Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. In: *PLoS Pathog.* 2 (2006), Mar, S. e25
- [316] VALENCIA-SANCHEZ, M. A. ; LIU, J. ; HANNON, G. J. ; PARKER, R.: Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. In: *Genes Dev.* 20 (2006), Mar, S. 515–524
- [317] VARTANIAN, J. P. ; GUÉTARD, D. ; HENRY, M. ; WAIN-HOBSON, S.: Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions. In: *Science* 320 (2008), Apr, S. 230–233
- [318] VENKATESH, L. K. ; CHINNADURAI, G.: Mutants in a conserved region near the carboxy-terminus of HIV-1 Rev identify functionally important residues and exhibit a dominant negative phenotype. In: *Virology* 178 (1990), Sep, S. 327–330
- [319] VENTER, J. C. ; ADAMS, M. D. ; MYERS, E. W. ; LI, P. W. ; MURAL, R. J. ; SUTTON, G. G. ; SMITH, H. O. ; YANDELL, M. ; EVANS, C. A. ; HOLT, R. A. ; GOCAYNE, J. D. ; AMANATIDES, P. ; BALLEW, R. M. ; HUSON, D. H. ; WORTMAN, J. R. ; ZHANG, Q. ; ... ; PAN, S. ; PECK, J. ; PETERSON, M. ; ROWE, W. ; SANDERS, R. ; SCOTT, J. ; SIMPSON, M. ; SMITH, T. ; SPRAGUE, A. ; STOCKWELL, T. ; TURNER, R. ; VENTER, E. ; WANG, M. ; WEN, M. ; WU, D. ; WU, M. ; XIA, A. ; ZANDIEH, A. ; ZHU, X.: The sequence of the human genome. In: *Science* 291 (2001), Feb, S. 1304–1351
- [320] VIGERUST, D. J. ; SHEPHERD, V. L.: Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. In: *Trends Microbiol.* 15 (2007), May, S. 211–218
- [321] VILLACÉ, P. ; MARIÓN, R. M. ; ORTÍN, J.: The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. In: *Nucleic Acids Res.* 32 (2004), S. 2411–2420
- [322] WALTER, P. ; LINGAPPA, V. R.: Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. In: *Annu. Rev. Cell Biol.* 2 (1986), S. 499–516
- [323] WANG, W. K. ; CHEN, M. Y. ; CHUANG, C. Y. ; JEANG, K. T. ; HUANG, L. M.: Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. In: *J Microbiol Immunol Infect* 33 (2000), Sep, S. 131–140
- [324] WANG-JOHANNING, F. ; FROST, A. R. ; JIAN, B. ; EPP, L. ; LU, D. W. ; JOHANNING, G. L.: Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. In: *Oncogene* 22 (2003), Mar, S. 1528–1535

- [325] WANG-JOHANNING, F. ; FROST, A. R. ; JOHANNING, G. L. ; KHAZAELI, M. B. ; LOBUGLIO, A. F. ; SHAW, D. R. ; STRONG, T. V.: Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. In: *Clin. Cancer Res.* 7 (2001), Jun, S. 1553–1560
- [326] WANG-JOHANNING, F. ; LIU, J. ; RYCAJ, K. ; HUANG, M. ; TSAI, K. ; ROSEN, D. G. ; CHEN, D. T. ; LU, D. W. ; BARNHART, K. F. ; JOHANNING, G. L.: Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. In: *Int. J. Cancer* 120 (2007), Jan, S. 81–90
- [327] WATTERS, J. J. ; CAMPBELL, J. S. ; CUNNINGHAM, M. J. ; KREBS, E. G. ; DORSA, D. M.: Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. In: *Endocrinology* 138 (1997), Sep, S. 4030–4033
- [328] WEHLING, M.: Specific, nongenomic actions of steroid hormones. In: *Annu. Rev. Physiol.* 59 (1997), S. 365–393
- [329] WEICHELSEBRAUN, I. ; FARRINGTON, G. K. ; RUSCHE, J. R. ; BÖHNLEIN, E. ; HAUBER, J.: Definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex protein activation domain by functional exchange. In: *J. Virol.* 66 (1992), Apr, S. 2583–2587
- [330] WEISZ, A. ; BRESCIANI, F.: Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. In: *Crit Rev Oncog* 4 (1993), S. 361–388
- [331] WELMAN, M. ; LEMAY, G. ; COHEN, E. A.: Role of envelope processing and gp41 membrane spanning domain in the formation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) fusion-competent envelope glycoprotein complex. In: *Virus Res.* 124 (2007), Mar, S. 103–112
- [332] WEN, W. ; MEINKOTH, J. L. ; TSIEN, R. Y. ; TAYLOR, S. S.: Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. In: *Cell* 82 (1995), Aug, S. 463–473
- [333] WHITE, J. P. ; CARDENAS, A. M. ; MARISSSEN, W. E. ; LLOYD, R. E.: Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase. In: *Cell Host Microbe* 2 (2007), Nov, S. 295–305
- [334] WICHROSKI, M. J. ; ROBB, G. B. ; RANA, T. M.: Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. In: *PLoS Pathog.* 2 (2006), May, S. e41

- [335] WICKHAM, L. ; DUCHAÎNE, T. ; LUO, M. ; NABI, I. R. ; DESGROSEILLERS, L.: Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999), Mar, S. 2220–2230
- [336] WILK, T. ; GEISELHART, V. ; FRECH, M. ; FULLER, S. D. ; FLÜGEL, R. M. ; LÖCHELT, M.: Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain. In: *J. Virol.* 75 (2001), Sep, S. 7995–8007
- [337] WINNEFELD, M. ; GREWENIG, A. ; SCHNÖLZER, M. ; SPRING, H. ; KNOCH, T. A. ; GAN, E. C. ; ROMMELAERE, J. ; CZIEPLUCH, C.: Human SGT interacts with Bag-6/Bat-3/Scythe and cells with reduced levels of either protein display persistence of few misaligned chromosomes and mitotic arrest. In: *Exp. Cell Res.* 312 (2006), Aug, S. 2500–2514
- [338] WINNEFELD, M. ; ROMMELAERE, J. ; CZIEPLUCH, C.: The human small glutamine-rich TPR-containing protein is required for progress through cell division. In: *Exp. Cell Res.* 293 (2004), Feb, S. 43–57
- [339] WYATT, R. ; SODROSKI, J.: The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. In: *Science* 280 (1998), Jun, S. 1884–1888
- [340] WYSS, S. ; DIMITROV, A. S. ; BARIBAUD, F. ; EDWARDS, T. G. ; BLUMENTHAL, R. ; HOXIE, J. A.: Regulation of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion by a membrane-interactive domain in the gp41 cytoplasmic tail. In: *J. Virol.* 79 (2005), Oct, S. 12231–12241
- [341] YANG, C. ; COMPANS, R. W.: Analysis of the cell fusion activities of chimeric simian immunodeficiency virus-murine leukemia virus envelope proteins: inhibitory effects of the R peptide. In: *J. Virol.* 70 (1996), Jan, S. 248–254
- [342] YANG, C. ; COMPANS, R. W.: Analysis of the murine leukemia virus R peptide: delineation of the molecular determinants which are important for its fusion inhibition activity. In: *J. Virol.* 71 (1997), Nov, S. 8490–8496
- [343] YANG, X. ; KURTEVA, S. ; REN, X. ; LEE, S. ; SODROSKI, J.: Stoichiometry of envelope glycoprotein trimers in the entry of human immunodeficiency virus type 1. In: *J. Virol.* 79 (2005), Oct, S. 12132–12147
- [344] YANG, X. ; KURTEVA, S. ; REN, X. ; LEE, S. ; SODROSKI, J.: Subunit stoichiometry of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers during virus entry into host cells. In: *J. Virol.* 80 (2006), May, S. 4388–4395

- [345] YEDAVALLI, V. S. ; NEUVEUT, C. ; CHI, Y. H. ; KLEIMAN, L. ; JEANG, K. T.: Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. In: *Cell* 119 (2004), Oct, S. 381–392
- [346] ZAMORE, P. D. ; ZAPP, M. L. ; GREEN, M. R.: Gene expression. RNA binding: beta s and basics. In: *Nature* 348 (1990), Dec, S. 485–486
- [347] ZAPP, M. L. ; GREEN, M. R.: Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. In: *Nature* 342 (1989), Dec, S. 714–716
- [348] ZAPP, M. L. ; HOPE, T. J. ; PARSLow, T. G. ; GREEN, M. R.: Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991), Sep, S. 7734–7738
- [349] ZEMMEL, R. W. ; KELLEY, A. C. ; KARN, J. ; BUTLER, P. J.: Flexible regions of RNA structure facilitate co-operative Rev assembly on the Rev-response element. In: *J. Mol. Biol.* 258 (1996), May, S. 763–777
- [350] ZHENG, Y. H. ; YU, H. F. ; PETERLIN, B. M.: Human p32 protein relieves a post-transcriptional block to HIV replication in murine cells. In: *Nat. Cell Biol.* 5 (2003), Jul, S. 611–618

## A Anhang

### A.1 Oligonukleotide (Primer)

#### A.1.1 Sequenzierprimer

Name	Sequenz (5' → 3')
Seq-Primer_coEnv_SGM_F	GGCATGAGCCTGCGGCCAG
Seq-Primer_coEnv_AVD_R	GGTCAGGTCGCTGTCCACGG
Seq-Primer_coEnv_LLT_F	CTGCTGACCTGCATCGACAGC
Seq-Primer_coEnv_SGS_R	CTGGTCGATGCTGCTCTGGCT
Seq-Primer_coEnv_LVP_F	CTGGTGCCCGGCACCGAGG
Seq-Primer_coEnv_killStopp_NotI_R	CTCGAGGCGGCCGCCACGCTCACGGTCACGATCTG
oricoRec_Sequenzier_R	TCTTGTTTCATCTTGTGGGTCAG
WTEEnv_Sequenzier_R nach SD	CACATAGGCCAGTAGGTATAG
pEGFP_Sequenzierung_F	GTCGTAACAACCTCCGCCCAT
pEGFP_Sequenzierung_R	TCGCCGTCCAGCTCGACCAG
BGH_rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

**Tabelle 22:** Sequenzierprimer

#### A.1.2 Mutageneseprimer

Zielgen	Name	Sequenz (5' → 3')
Env	coEnv_I125V	AAC CCC ATC GAG GTC TAC GTG AAC GAC
	coEnv_C140R	GTG CCA GGC CCC ATC GAC GAC CGC TGC CCC GCC AAG CCC
	coEnv_L262I	ACA ACG AGT TCG GCA CCA TTA TCG ACT GGG CCC CCA G
	coEnv_A323P	GGG ATA TCC ACC CCC AGG CCC AAG ATC GTC AGC CCC GTG AGC GGC
	coEnv_N506K	GTG AAC GAC TGG CAG AAA AAC AGC ACC CGG
	coEnv_C577R	GAC ATG GTG CGG CGC CAC CTG CAG GGC
	coEnv_T626P	GCC AAC CTG AAC CCC GTG ACA TGG GTG
	coEnv_Y655C	CTG CTG CTG GTG TGT CGG TGC ACC CAG
Rec	mut_coRec_P8429_F	GATTGTGAGCATGGTGAGCGCGGGCGTGCCCAACAGCA
	mut_coRec_P8429_R	TGCTGTTGGGCACGCCGGCGCTCACCATGCTCACAATC

**Tabelle 23:** Primer, die für die Rekonstitution des *oricoEnv* und *oricoRec* verwendet wurden.



## A.1.3 Klonierungsprimer

Konstrukt /Zielgen	Klonierung	Primer-Name	Sequenz (5' → 3')	
Shuttle- Konstrukt	Luziferase	Luzi_pcDNA4V5_KpnI_F	CAGGTGATAGGGTACCATGGAAGACGCCAAAAACAT	
		Luzi_pcDNA4V5_BamHI_R	CAGGTGATAGGGATCCTTACACGGCGATCTTTCCGC	
	5'UTR	5UTR_NheI_F	AGCTAGCGATGGCTAGCGGTTCCCGGTTCCCCTTATTTTC	
		5UTR_KpnI_R	CTCGTATCATGCGGTACCTATCACCCTAGCTTCTTCCGAG	
	HERV-K113 <i>gag</i>	wt_gag_BamHI_F	AGTGTGGGAAATTGTCGATAATAG	
		wt_gag_EcoRI_R	CAGGTGATAGGAATTCCTACTGCTGCACTGCCGCTTG	
		wt_gag_NotI_F	GATGACCGATGCGGCCGCATGGGGCAAACATAAAAGTAA	
	Deletion Rec	mut_shuttle_envSA_inframe_F	CCACAAGCGGCAGTGCACAGCAGTAGGAATTCG	
		mut_Shuttle_deltaRec1_F	CATGAACCCATCGGAGTAGCAAA-GAAAAGCACCTC	
		mut_Shuttle_deltaRec2_F	TGACTCACAAGATGAACAAATAGG-TGACGTCAGAAGAACAGTAGAAG-TTGCCATCCACCAAGAAG	
	oriEnv	mut_Shuttle_deltaRec3_F	CTGCTTGCAGCCTTGTAGATTGT-ATCAATGGT	
		oriEnv_Shuttle_XbaI_F	AGCTAGCGATGTCTAGAAATGAA-CCCATCGGAGATGCAAAG	
		oriEnv_Shuttle_ApaI_R	GCATGATACGAGGGGCCCTACACAGACACAGTAACAATC	
		oriEnv_RecRE_ApaIR	GCATGATACGAGGGGCCCGCGG-TGGCGGCCGCTGTCTG	
		Env_RecRE_NotI_R	GATGACTAGATCGCGCCGCTAC-ACACCTGTGGGTGTTTCTCGT	
		oriEnv_XbaImut_F	GCAGTTAGCTACAAAATACCTA-GAGAACACAAAGGTG	
		oriEnv_XbaImut_R	CACTTTGTGTTCTCTAGGTATT-TTGTAGCTAACTGC	
	SA Env	Env_SA_EcoRV_F	GATGACTAGATCGATATCATCTTACTGGTAAAAAGAACAGCC	
	YTH	coRec in pEG202	coRec_Mutagenese EcoRI_for	CACTATAGGGAGACCCGAATTCA-TGAACCCAGCGAG

Konstrukt /Zielgen	Klonierung	Primer-Name	Sequenz (5' → 3')	
oricoRec	Pull Down Dele- tionsmutanten	oricoRec_dExon2_F	CTGGCCGCCCTGATGATTGTGAG- CATGGTGGCGGTCGCATCTGGTA- AGCCTATCCCTAACC	
		oricoRec_dNLS_F	AGCAGCGGCCATATCGAAGGTCG- TCATATGCTGACCCACAAGATG- AACAAGATGGTGACC	
		oricoRec_dvorNES_F	ACCAAGAAGGCCGAGCCCCCAC- CTGGGCCGCGGTCGCATCTGGTA- AGCCTATCCCTAACC	
		oricoRec_dNES_F	ACCAAGTACCTGGAGAACACCAAG- GTGACCGCGGTCGCATCTGGTA- AGCCTATCCCTAACC	
	in pCMVTag2B	oricoRec_pCMV_HindIII_F	GATCAGGTAGAAGCTTATGAACC- CATCGGAGATGCAA	
	in pBud	oricoRec_KpnI_Kozac_F	ACAGATACCGGGTACCGCCGCCA- TGAACCCAGCGAGATGC	
		oricoRec_AA_XhoI_R	ACTGCTCTGACTCGAGTTGGGGCC- GTTCTCAATGGTG	
	in pEGFP	oricoRec_pEGFP_HindIII_F	AGCGTAGTAAAAGCTTATGAACC- CCAGCGAGATGCAGC	
		oricoRec_pEGFP_KpnI_R	CGGGCCCCGCGGTACCTGGGGCCGT- TCTCAATGGTGG	
		pEGFP_inframe_neu_F	GGGATCCACCGGTCGCCAGCCAT- GGTGAGCAAGGGCG	
	in pET16b	coRec_pet16b_NdeI_F	GAAGGTGTCATATGATGAACCC- CAGCGAGATGCAGCGCA	
		coRecV5_pet16b_R	GAAGGTGCTGGATCCCGTAGAAT- CGAGACCGAGGAGAG	
	Staufen-1	in pmCherry	Stau_XhoI_F	GATCGATGACCTCGAGATGAAAC- TTGGAAAAAAACCAATG
			V5_HindIII_R	ATGTGGATCCAAGCTTCGTAGAA- TCGAGACCGAGGAGA
	in pcDNA3V5	hStau_pcDNA3V5_HindIII_F	hStau_pcDNA3V5_HindIII_F	GATCAGGTAGAAGCTTGCCACCA- TGAAACTTGAAAAAAACCAATG
hStau_pcDNA3V5_NotI/XhoI_R			CGATGCAGACCTCGAGTGCGGCC- GCGCACCTCCCACACACAGACAT	
Pull Down Dele- tionskonstrukte		mut_hStauRBD1,RBD2_pGex_F	GCAGTTGAACGAGTATAGCCTAG- AATCAAAAAG	
		mut_hStauRBD1,RBD2_pGex_R	CTTTTTGATTCTAGGCTATACTC- GTTCAACTGC	
		mut_hStau_Stopp_RBD3nt766_F	GGAACGGGCACCAACTAGTAGGT- GGCCAAGCGCAAT	

Konstrukt /Zielgen	Klonierung	Primer-Name	Sequenz (5' → 3')
hSGT	in pCMV	mut_hStau_Stopp_RBD3nt766_R	ATTGCGCTTGGCCACCTACTAGT- TGGTGCCCGTTCC
		mut_hStauRBD1,RBD2,RBD3_pGex_F	GGTTTCAAAGTCCCGTAGGCGCA- GCCACCAAAA
		mut_hStauRBD1,RBD2,RBD3_pGex_R	TTTGGTGGGCTGCGCCTACGGGA- CTTTGAAACC
		mut_hStau_Stopp_TBDnt916_F	GAAAAGTAACCTTTTTTTTAACCT- GGCTCTGGGGATGA
		mut_hStau_Stopp_TBDnt916_R	TCATCCCCAGAGCCAGGTTAAAA- AAAGGTTACTTTTC
		hStau_neu_F	CTTCGTCCCTTCTTCCTCTCC
		hStau_neu_R	CTCGGCCCACTGGAGGTATC
		Nested_Staufen_F	GATTAGATTGCAAGCTTATGAAA- CTTGGAAAAAACAATGT
		Nested_Staufen_R	GTGCGAGCTCCTCGAGTCAGC- ACCTCCCACACACAG
		in pmCherry	SGT_XhoI_F
		V5_HindIII_R	ATGTGGATCCAAGCTTCGTAGAA- TCGAGACCGAGGAGA
	hSGT-FLAG in pET16b	Flag_NdeI_F	GATCAGTAGACATATGGATTAC- AAGGATGACGACGAT
		SGT_XhoI_BamHI_R	ATGTACTGTTCGATCCCTCGAG- CTTCTTCTTCTTCTCCTGCTGGT- CGTCGTTGCTG
	in pcDNA3V5	hSGT_pcDNA3V5_HindIII_F	GATCAGGTAGAAGCTTGCCACCA- TGGACAACAAGAAGCGCCTGG
		hSGT_pcDNA3V5_NotI/XhoI_R	CGATGCAGACCTCGAGTGCGGC- CGCCTCCTGCTGGTTCGTCGTT- GCTGGC
	Pull Down in pGex	hSgt_p1_EcoRI_F	CAGTACGAGTGAATTCATGGACA- ACAAGAAGCGCCTG
		hSgt_p942_NotI_R	GATCGTCATGGCGGCCGCTCAC- TCCTGCTGGTTCGTCGTTG
		hSgt_p375_EcoRI_F	CAGTACGAGTGAATTCAGCTC- AACCCAGCCAACGCC
		hSgt_p775_NotI_R	ATCCTCTAGTGCGGCCGCGCTGG- TGCCGGGAGTTCC
		hSgt_p355/TPR_F_neu	ATCCGATCAGAATTCGCCACCAT- GGAGCTCAACCCAGCCAACGCC- GTC

Konstrukt /Zielgen	Klonierung	Primer-Name	Sequenz (5' → 3')
	in pCMV	hSGT_pGEX_mutP8_F hSGT_BamHI/EcoRI_F	CCCGAATTCATGGACAACAAGAA- GCGCCTGGCCTAC AAGAGCCCGGGATCCGAATTC- TGGACAVACAAGAAGCVGCCT

**Tabelle 24:** Primer für Klonierungen. Die entsprechenden Zielvektoren sind angegeben.

## A.2 Sequenzen

### A.2.1 coEnv-Sequenz

ATGAACCCAGCGAGATGCAGCGGAAGGCCCTCCAGGCGCGGAGACACCGGAACAGAGCCCCCTGACCCAC  
AAGATGAACAAGATGGTGACCAGCGAGGAACAGATGAAGCTGCCAGCACCAAGAAGGCCGAGCCCCACCTGG  
GCCAGCTGAAGAAGCTGACCCAGCTGGCCACCAAGTACCTGGAAAACACCAAGGTGACCCAGACCCCGAGAGC  
ATGCTGCTGGCCGCCCTGATGATCGTGAGCATGGTGGTGTCCCTGCCCATGCCTGCCGGCGCCGCGGTGCCAAC  
TACACCTACTGGGCCTACGTGCCCTTCCCCCCCCGTATCCGGGCGGTGACCTGGATGGACAACCCCATCGAGATC  
TACGTGAACGACAGCGTGTGGGTGCCAGGCCACCGACGACTGCTGCCCGCCAAGCCCGAGGAAGAGGGCATG  
ATGATCAACATCAGCATCGGCTACAGATAACCCCCCATCTGCCCTGGGCAGGGCCCCCTGGCTGCCGTATGCCCGCC  
GTGCAGAACTGGCTGGTGGAGGTGCCACCGTGAGCCCCATCAGCCGGTTCACCTACCACATGGTGTCCGGCATG  
AGCCTGCCGCCAGGGTTAACTACCTGCAGGACTTCAGTACCAGCGGAGCCTGAAGTTCGGGCCAAAGGGCAAG  
CCCTGCCCAAAGAGATCCCCAAAGAGTCCAAGAACCAGAGGTGCTGGTGTGGGAGGAATGCGTGGCCAACAGC  
GCCGTGATCCTGCAGAACAACGAGTTCGGCACCCGTATCGACTGGGCCCCAGGGGCCAGTTCTACCACAATGC  
AGCGGCCAGACCCAGAGCTGCCCCAGCGCCAGGTGTCCCTGCCGTGGACAGCGACCTGACCGAGAGCCTGGAC  
AAGCACAAGCACAAAAGCTGCAGAGCTTCTACCCCTGGGAGTGGGGCGAGAAGGGGATATCCACCGCCAGGCC  
AAGATCATCAGCCCGTGAGCGGCCCTGAGCACCCCGAGCTGTGGCGGCTGACCGTGGCCAGCCACCACATCCGG  
ATCTGGTCCGGCAACCAGACCCTGGAAACCCGGGACCGGAAGCCCTTCTACACCATCGACCTGAACAGCAGCCTG  
ACCGTGGCCCTGCAGAGCTGCGTGAAGCCCCCTACATGCTGGTGGTGGGCAACATCGTGATCAAGCCCGACAGC  
CAGACCATCACCTGCGAGAAGTGCAGGCTGCTGACCTGCATCGACAGCACCTTCAACTGGCAGCACCAGGATCCTG  
CTCGTACGGGCCAGGGAAGGCGTGTGGATCCCCGTGTCCATGGACCGGCCCTGGGAGGCCAGCCCCAGCGTGCAC  
ATCCTGACAGAGGTGCTGAAGGGCGTGTGAACAGAAGCAAGCGGTTTCATCTTTACCCTGATCGCCGTGATCATG  
GGCCTGATTGCCGTGACCGCCACAGCCCGCGTGGCCGGCGTGGCCCTGCACAGCTCTGTACAGAGCGTGAACCTC  
GTGAACGACTGGCAGAACAACAGCACCCGGCTGTGGAACAGCCAGAGCAGCATCGACCAGAAGCTGGCCAACCAG  
ATCAACGACCTGCGGCAGACCGTGATTTGGATGGGCGACCGGCTGATGAGCCTGGAACACCGGTTCCAGCTGCAG  
TGCAGCTGGAACACCAGCGATTTCTGCATCACCCCCAGATCTACAACGAGAGCGAGCACCACTGGGACATGGTG  
CGGTGCCACCTGCAGGGCCGGGAGGACAATCTGACCTGGACATCAGCAAGCTGAAAGAGCAGATCTTCGAGGCC  
AGCAAGGCCATTTAAATCTGGTGCCCGCACCGAGGCATCGCCGGGGTGGCCGACGGCTGGCCAACCTGAAC  
ACCGTGACATGGGTGAAAACCATCGGCAGCACCACCATCAACCTGATCCTGATCCTGGTGTGCCGTGTCTGC  
CTGCTGCTGGTGTATCGGTGCACCCAGCAGCTGCGGAGAGACAGCGACCACCGGGAGCGGGCCATGATGACCATG  
GTGGTGTGTCCAAGCGGAAGGGCGGCAACGTGGGCAAGAGCAAGCGGGACAGATCGTGACCGTGAAGCTGTGA

**Abbildung 53:** Nukleotidsequenz des codonoptimierten HERV-K113 Envs

### A.3 Abkürzungen

® .....	eingetragenes Warenzeichen
A .....	Adenin
A. bidest .....	Aqua bidestillata
ALV .....	Avian Leukosis Virus
APOBEC .....	Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like
APS .....	Ammoniumpersulfat
AP .....	Alkalische Phosphatase
AR .....	Androgen Rezeptor
bp .....	base pairs
BLV .....	Bovines Leukämie-Virus
BSA .....	bovines Serumalbumin
bzw. ....	beziehungsweise
C .....	Cytosin
°C .....	Grad Celsius
Ca .....	Capsid
ca. ....	circa
CMV .....	Cytomegalovirus
CS .....	cleavage site
d.h. ....	das heißt
DCPI $\alpha$ .....	decapping protein 1 $\alpha$
DMEM .....	Dulbecco´s modified Eagle medium
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DNA .....	desoxyribonucleic acid
DHT .....	5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron
dNTP .....	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dsRNA .....	double stranded RNA
EDTA .....	Ethylendiamintetraessigsäure
Env .....	envelope protein/ Hüllprotein
<i>et al.</i> .....	<i>et altera</i>
<i>E.coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
EM .....	Elektronenmikroskopie
ER .....	estrogen receptor
EtOH .....	Ethanol

---

Etbr.....	Ethidiumbromid
FeLV.....	Felines Leukämievirus
G.....	Guanin
Gag.....	gruppenspezifisches Antigen
GALV.....	Gibbon-Ape Leukemia Virus
gp.....	Glykoprotein
h.....	Stunde
HERV.....	Humanes Endogenes Retrovirus
HEPES.....	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HIV.....	Human Immunodeficiency Virus
HML.....	human MMTV-like
HMM A3G.....	High molecular mass APOBEC3G
hnRNP.....	heteronukleo-Ribonukleoproteinpartikel
HRP.....	horseradish peroxidase
hSGT.....	Small Glutamine-Rich Tetratricopeptide Repeat-containing Protein
HTLV-I.....	Human T-cell Leukemia Virus
IgG.....	Immunglobulin G
JSRV.....	Jaagsiekte Sheep Retrovirus
Int.....	Integrase
kb.....	Kilobasen
kD.....	Kilodalton
KoRV.....	Koala Retrovirus
LB.....	Luria Bertani
LMM.....	Low molecular mass
LTR.....	long terminal repeat
M.....	molar
min.....	Minute
MLV/MuLV.....	Maus-Leukämievirus
MMTV.....	Mouse Mammary Tumour Virus
mol.....	Maßeinheit für die Stoffmenge
MoMLV.....	Moloney Murine Leukemia Virus
MPMV.....	Mason-Pfizer Monkey Virus
mRNA.....	messengerRNA
MSD.....	membrane spanning domain

---

nm .....	Nanometer
OD .....	Optische Dichte
ORF .....	Open Reading Frame
PAGE .....	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP .....	Prostatic Acid Phosphatase
PB .....	Primerbindestelle
PBMC .....	peripheral blood mononuclear cells
PBS .....	phosphate buffered saline
PCA .....	Prostatacarcinom
PCR .....	polymerase chain reaction
PHA .....	Phytohämagglutinin
PIC .....	prä-Integrationskomplex
PKA .....	Proteinkinase A
PKC .....	Proteinkinase C
PR .....	progesteron receptor
Pro .....	Protease
Pol .....	Polymerase/RT/RNaseH
Rec .....	Regulator of Expression encoded by cORF
rER .....	raues Endoplasmatisches Reticulum
Rev .....	Regulator of Expression of Virion proteins
RKI .....	Robert Koch-Institut
RNA .....	Ribonukleinsäure
rpm .....	rounds per minute
rRNA .....	ribosomale RNA
RT .....	Reverse Transkriptase
s .....	Sekunde
SEVI .....	semen derived enhancer of viral infection
SFV .....	Semliki-Forest-Virus
SHIV .....	simian/human immunodeficiency virus
SIV .....	Simian Immunodeficiency Virus
sog .....	sogenannte
ssRNA .....	single stranded RNA
TIA-I .....	T-cell intracellular antigen-1
TIAR .....	TIA-I receptor
SU .....	surface unit/ Oberflächenglykoprotein

---

t .....	Zeit
TM.....	transmembrane Untereinheit
T .....	Thymin
Taq.....	Thermophilus aquaticus
Tris.....	Trihydroxymethylaminomethan
U .....	Uracil, Unit
UE.....	Untereinheit
üN .....	über Nacht
UV.....	Ultraviolett
V .....	Volt
v.a.....	vor allem
VLP.....	virus-like particle
vs.....	versus
v/v.....	Volumen pro Volumen
w/v.....	Gewicht pro Volumen
WT .....	Wildtyp
XMRV .....	Xenotropic Murine Leukemia Virus-related Virus
YTH .....	Yeast Two-Hybrid
z.B. ....	zum Beispiel
z.T. ....	zum Teil



## A.4 Publikationsliste

Folgende Publikationen sind bisher aus der Arbeit hervorgegangen:

### **Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113**

Beimforde, N. ; Hanke, K. ; Ammar, I. ; Kurth, R. ; Bannert, N.

In: *Virology* 371 (2008), Feb, S. 216-225

### **Reconstitution of the ancestral glycoprotein of human endogenous retrovirus k and modulation of its functional activity by truncation of the cytoplasmic domain**

Hanke, K. ; Kramer, P. ; Seeher, S. ; Beimforde, N. ; Kurth, R. ; Bannert, N.

In: *J. Virol.* 83 (2009), Dec, S. 12790-12800

### **Fibrils of prostatic acid phosphatase fragments boost infections with XMRV (xenotropic murine leukemia virus-related virus), a human retrovirus associated with prostate cancer**

Hong, S. ; Klein, E. A. ; Das Gupta, J. ; Hanke, K. ; Weight, C. J. ; Nguyen, C. ; Gaughan, C. ; Kim, K. A. ; Bannert, N. ; Kirchhoff, F. ; Munch, J. ; Silverman, R. H.

In: *J. Virol.* 83 (2009), Jul, S. 6995-7003

Zwei weitere Publikationen zu den Rec-Interaktionspartnern sind in Vorbereitung.

## B Danksagung

Während meiner Doktorarbeit haben mich viele Menschen sehr unterstützt. Auch wenn ich leider nicht jeden einzelnen hier aufführen kann, möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Freunden und Kollegen bedanken, die mir durch einen Rat, eine Idee, Diskussion oder auch durch eine Aufmunterung in den vergangenen Jahren geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. R. Kurth, der es mir thematisch und finanziell ermöglichte, meine Arbeit am Robert Koch-Institut durchzuführen. Ich bedanke mich außerdem für die stets wohlwollende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Für die Übernahme der Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. R. Mutzel von der Freien Universität Berlin bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Norbert Bannert für die Betreuung dieser Arbeit, die kritische Betrachtung der Ergebnisse und für die vielen Ideen, die meine Arbeit bereichert haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Dr. Kazimierz Madela, ohne dessen Unterstützung ich die vielen mikroskopischen Arbeiten am cLSM wahrscheinlich nicht bewältigt hätte. Auch Gudrun Holland, Lars Möller und dem restlichen Team der Elektronenmikroskopie möchte ich für ihre Unterstützung und Geduld bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten danken. Claudia Chudak danke ich für die Cavid-Messungen.

Ich möchte mich auch herzlich bei den Personen bedanken, die mich mit Konstrukten unterstützt haben. Dazu gehören Nancy Kedersha, Wayne D. Tilley und Michael H. Malim sowie Nadine Beimforde und Philipp Kramer vom RKI.

Ebenso danke ich meiner Arbeitsgruppe ZBS 4 für das hervorragende Arbeitsklima, für die enorme Unterstützung im Labor und für das gemeinsame Durchleben sämtlicher Höhen und Tiefen des Laboralltages. Gleichfalls geht mein Dank an die Nachbararbeitsgruppen P12, P13 und P26, die in brenzligen Situationen immer mit Materialien und Geräten ausgeholfen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dörte Lohrberg und Philipp Kramer für die kritische Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin danke ich meiner Familie für die Hilfe und Unterstützung, die während meines gesamten Studiums, meines Auslandsaufenthaltes und meiner Promotion immer selbstverständlich waren.

Insbesondere möchte ich meinem Partner Matthias Schulz danken, der mich während des Studiums, meiner Diplom- und meiner gesamten Doktorarbeit enorm unterstützt hat und sowohl Kraftquelle als auch Kritiker war. Ich danke ihm auch für die Freude die er mit mir teilt, diese Arbeit fertiggestellt zu haben.

## C Erklärung

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Robert Koch-Institut in Berlin in der Zeit vom 01. November 2005 bis zum 31. Dezember 2009 durchgeführt.

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

Berlin, den 18.01.10

---

Kirsten Hanke