

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT I
INSTITUT FÜR BIOLOGIE

Bachelorarbeit
ZUM ERWERB DES AKADEMISCHEN GRADES
BACHELOR OF SCIENCE

„UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DER RNA-TRANSPORTPROTEINE
REC VON HERV-K UND REV VON HIV-1 BEI DER
VIRUSASSEMBLIERUNG“

„INVESTIGATIONS INTO THE ROLE OF THE RNA TRANSPORT
PROTEINS HERV-K REC AND HIV-1 REV IN VIRUS ASSEMBLY“

Vorgelegt von

Linda Liedgens

Angefertigt in der Arbeitsgruppe FG18 „Zentrum für HIV und Retrovirologie“
am Robert Koch-Institut, Berlin

Berlin, im Dezember 2011

Angefertigt unter der Betreuung von Dr. Kirsten Hanke in der Arbeitsgruppe FG18
„Zentrum für HIV und Retrovirologie“ des Robert Koch-Instituts.

April 2011 bis November 2011

Erster Gutachter: PD Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut, Berlin

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Richard Lucius, Humboldt-Universität zu Berlin

Inhaltsangabe

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den RNA-Transportproteinen Rec des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K) und Rev des humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) und ihrer Rolle während des nukleozytoplasmatischen RNA-Transports und der Virusassemblierung.

Um ihrer Rolle als RNA-Transportproteine gerecht zu werden, müssen HERV-K Rec und HIV-1 Rev mit einer Vielzahl von Wirtsproteinen interagieren. Es wurde vor allem das Zusammenspiel mit möglichen Interaktionspartnern wie dem RNA-Transportprotein Staufen-1 oder dem antiviralen hochmolekularen APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 1-like*) untersucht.

Co-Immunpräzipitationsversuche konnten eine bereits gezeigte Interaktion zwischen HERV-K Rec und Staufen-1 auch für das HIV-1 Rev nachweisen. Die spezifische Interaktion, die hierbei zwischen Staufen-1 und HIV-1 Rev nachgewiesen wurde, konnte durch Immunfluoreszenzversuche bestätigt werden.

Es soll untersucht werden, ob die Interaktion von Staufen-1 und den RNA-Transportproteinen Rec und Rev möglicherweise einen antiviralen Kontrollmechanismus der Wirtszelle darstellt, indem HIV-1 Rev und HERV-K Rec über die Interaktion mit dem Staufen-1 in Stressgranula und antivirale HMM APOBEC3G-Komplexe rekrutiert und dort regulatorischen Mechanismen unterworfen werden.

Die räumliche Nähe von HERV-K Rec zu A3G konnte bereits gezeigt werden. Allerdings konnte dies für das HIV-Rev bei Versuchen im Rahmen dieser Bachelorarbeit nicht bestätigt werden. Ebenso konnte keine Colokalisation mit TIA-1, einem Stressgranula-Markerprotein gezeigt werden.

Weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Aufreinigung von Staufen-1- und HERV-K Rec-Protein. Dies soll die Vorarbeit für eine entsprechende Antikörpergenerierung darstellen und konnte für das Staufen-1 erfolgreich realisiert werden.

Eine Aufreinigung des HERV-K Rec war trotz Versuchsoptimierung aufgrund der Bildung sogenannter „Inclusion Bodies“ nicht möglich.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 6 -
1.1. Retroviren.....	- 6 -
1.1.1. Struktureller Aufbau.....	- 7 -
1.1.2. Genomischer Aufbau.....	- 8 -
1.2. HIV-1 als Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS	- 8 -
1.3. Endogene Retroviren.....	- 9 -
1.3.1. HERV – Schaden und Nutzen	- 10 -
1.3.2. Die HERV-K- (HML-2) Familie und HERV-K113.....	- 11 -
1.4. Der virale RNA-Transport.....	- 12 -
1.4.1. Das HIV-1 Rev Protein	- 13 -
1.4.2. Das HERV-K Rec Protein.....	- 13 -
1.4.3. Das Staufen-1-Protein	- 14 -
1.5. Stressgranula	- 14 -
1.6. Das antivirale APOBEC3G.....	- 15 -
1.7. Zielstellung der Arbeit.....	- 16 -
2. Materialien und Methoden	- 17 -
2.1. Materialien	- 17 -
2.1.1. Laborgeräte, Apparaturen und Hilfsmittel.....	- 17 -
2.1.2. Chemikalien, Enzyme und Größenstandards.....	- 18 -
2.1.3. Puffer und Nährmedien	- 18 -
2.1.4. Kits	- 19 -
2.1.5. Konstrukte	- 19 -
2.1.6. Antikörper	- 20 -
2.1.7. Bakterienstämme	- 20 -
2.1.8. Antibiotika.....	- 21 -
2.1.9. Software.....	- 21 -
2.1.10. Oligonukleotide (Primer)	- 21 -
2.2. Methoden.....	- 22 -
2.2.1. DNA-Analytik	- 22 -
2.2.1.1. Mutagenese-PCR.....	- 22 -
2.2.1.2. Restriktion mit Endonukleasen.....	- 24 -
2.2.1.3. Ligation	- 24 -

2.2.1.4. DNA-Agarosegelelektrophorese	- 25 -
2.2.1.5. Gelextraktion	- 26 -
2.2.1.6. Herstellung elektrokompetenter Top10 E. coli.....	- 26 -
2.2.1.7. Transformation	- 27 -
2.2.1.8. Plasmidisolierung	- 27 -
2.2.1.9. Bestimmung der DNA-Konzentration.....	- 28 -
2.2.1.10. Sequenzierung	- 28 -
2.2.2. Zellkultur	- 29 -
2.2.2.1. Puffer und Medien.....	- 29 -
2.2.2.2. Zellbiologische Verbrauchsmaterialien.....	- 29 -
2.2.2.3. Zellkultivierung	- 30 -
2.2.2.4. Transfektion.....	- 30 -
2.2.3. Protein-Analytik	- 31 -
2.2.3.1. Zellyse / Proteinextraktion	- 31 -
2.2.3.2. Co-Immunpräzipitation	- 31 -
2.2.3.3. Proteinbestimmung.....	- 31 -
2.2.3.4. Herstellung rekombinanter Proteine.....	- 32 -
2.2.3.5. Native Proteinaufreinigung	- 32 -
2.2.3.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	- 33 -
2.2.7.7. Coomassie-Färbung.....	- 34 -
2.2.3.8. Western Blot.....	- 35 -
2.2.3.9. Immunfluoreszenzfärbung.....	- 36 -
3. Ergebnisse	- 37 -
3.1. Proteinaufreinigung von HERV-K oricoRec, oricoRec Δ NES und Staufen-1	- 37 -
3.1.1. Proteinüberexpression von Staufen-1, HERV-K oricoRec und oricoRec Δ NES	- 37 -
3.1.2. Proteinaufreinigung von Staufen-1, HERV-K oricoRec und oricoRec Δ NES.....	- 38 -
3.1.3. Bestimmung der aufgereinigten Proteinmenge	- 40 -
3.2. Untersuchungen zur Interaktion zwischen HIV-1 coRev und Staufen-1	- 42 -
3.2.1. Co-Immunpräzipitation von HIV-1 coRev und Staufen-1	- 42 -
3.2.2. Bestätigung der Interaktion durch Immunfluoreszenz-Versuche	- 43 -
3.3. Stressgranula	- 44 -
3.4. Colokalisation von HIV-1 coRev mit HMM A3G	- 46 -

4. Diskussion	- 48 -
4.1. Proteinaufreinigung	- 48 -
4.2. Untersuchungen zur Interaktion zwischen HIV-1 coRev und Stufen.....	- 49 -
4.3. Stressgranula	- 52 -
4.4. Colokalisation von HIV-1 coRev mit HMM A3G	- 52 -
5. Zusammenfassung	- 54 -
A. Anhang	I
A.1 Literaturverzeichnis.....	I
A.2 Abkürzungsverzeichnis	IV
A.3. Primer	VIII
A.3.1. Mutageneseprimer	VIII
A.3.2. Sequenzierungsprimer	IX
B. Danksagung	X
C. Erklärung	XI

1. Einleitung

1.1. Retroviren

Die Familie der Retroviren (*Retroviridae*) wird in sieben Genera (α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren sowie *Lentiviren* und *Spumaviren*) unterteilt und ihnen ist allen gemein, dass sie zwei Kopien eines RNA-Plusstrangs besitzen und das Enzym Reverse Transkriptase exprimieren. Mithilfe dieses Enzyms wird während des Replikationszyklus die genomische RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben und anschließend in das Genom des Wirtes integriert. Retroviren sind somit in der Lage, den üblichen genetischen Informationsfluss, der von der DNA über die RNA bis hin zum Protein läuft, teilweise umzukehren. Die Fähigkeit zur Reversen Transkription gab dieser Familie den Namen „Retroviren“. [1]

Der vermutlich bekannteste und am besten untersuchte Vertreter der Familie *Retroviridae* ist das humane Immundefizienz-Virus HIV, der Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS. Aber auch Tiere können durch Retroviren infiziert werden. Ein Beispiel hierfür ist die feline Immunschwäche, die durch das feline Immundefizienz-Virus FIV verursacht wird.

Doch nicht nur für Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier sind Retroviren verantwortlich. Es gibt auch zahlreiche Retroviren, die mit Tumorerkrankungen assoziiert werden, wie z.B. das humane T-Zell-Leukämie-Virus HTLV-1, das eine T-Zell-Leukämie beim erwachsenen Menschen verursachen kann oder das Maus-Mammatumortumor Virus MMTV, welches eine maligne Milchdrüsenenerkrankung bei Mäusen hervorruft. [1]

Es kann außerdem zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden werden. Bei den exogenen Retroviren, zu denen das HIV-1 gehört, sind im Genom alle Informationen für einen produktiven Infektionszyklus vorhanden.

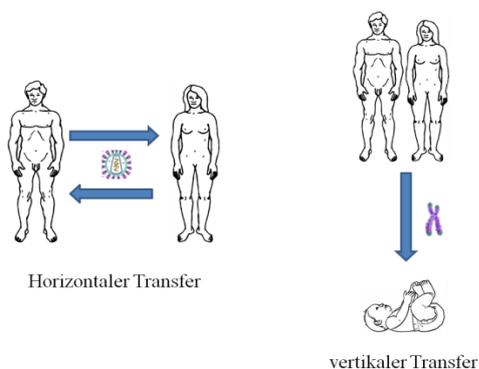


Abbildung 1: Die Abbildung zeigt links den horizontalen Transfer, wie er bei der Infektion mit exogenen Retroviren stattfindet. Hierbei findet eine Übertragung von Mensch zu Mensch statt und es sind somatische Zellen betroffen. Im Gegensatz hierzu findet eine Übertragung mit exogenen Retroviren vertikal statt, d.h. sie werden von den Eltern auf die Nachkommen übertragen und nach den Mendelschen Gesetzen weitervererbt.

Exogenen Retroviren werden horizontal, d.h. von Individuum zu Individuum übertragen. [1] Im Gegensatz dazu werden endogene Retroviren wie das HERV-K113 vertikal über die Keimbahn übertragen (siehe Abbildung 1). Dies ist der Fall, wenn ein Retrovirus die

Keimbahn eines Wirtes infiziert, in dessen Genom integriert und schließlich die genetischen Informationen des Virus zusammen mit denen des Wirtes auf die Nachkommen übertragen werden.

1.1.1. Struktureller Aufbau

Der strukturelle Aufbau der infektiösen Partikel verschiedener Retroviren ähnelt sich stark und alle weisen einen Durchmesser von ca. 100 nm auf. [1] Der schematische Aufbau des vermutlich bekanntesten Retrovirus HIV-1 ist in Abbildung 2 dargestellt.

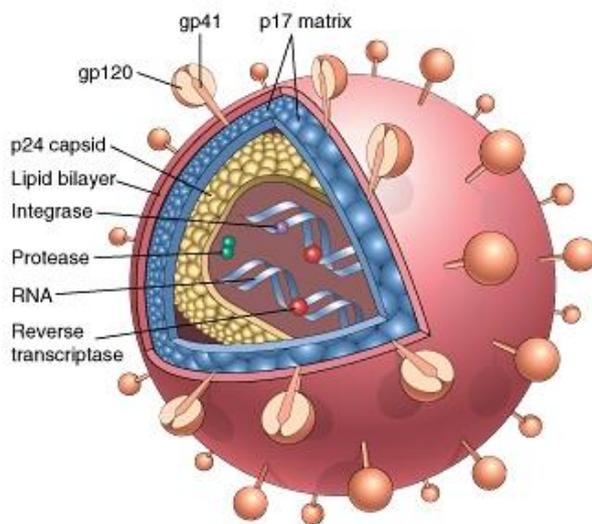


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Retrovirus am Beispiel des HIV-1. Das Genom des Virus liegt als einzelsträngiges RNA-Molekül vor und befindet sich im Innern des Viruscapsids, welches aus p24 Capsidproteinen besteht. Ebenfalls im Viruscapsid eingeschlossen sind die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease. Das Viruscapsid wird von einer Hüllmembran umgeben, in die Glycoproteine eingelagert sind (gp120 und gp41). Die p17-Matrixproteine sind mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden. Die Abbildung stammt von Elsevier Science.

Im Zentrum des Viruspartikels befindet sich das Viruscapsid, welches auch „Core“ genannt wird und das virale Genom in Form eines einzelsträngigen RNA-Moleküls, welches diploid vorhanden ist, enthält. Die RNA-Moleküle sind von Nucleocapsidproteinen umgeben, die dem Schutz des viralen Genoms dienen. Das Viruscapsid besteht aus Capsidproteinen und zeigt je nach Virustyp eine konische Form, wie z.B. das Lentivirus HIV-1, oder eine sphärisch-ikosaedrische Form, wie sie unter anderem die β -Retroviren aufweisen, zu denen die HERV-K-Familie gehört. Eine Hüllmembran, welche mit viralen Glycoproteinen assoziiert ist, umgibt das Viruscapsid. Über Myristinsäurereste sind die Matrixproteine mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden. Auf der Außenseite der Hüllmembran bindet das externe Glycoprotein, welches beim HIV-1 aufgrund seines Molekulargewichts von 120 kDa „gp120“ genannt wird, nichtkovalent an das transmembrane Glycoprotein (gp41), welches durch einen Bereich von etwa 20 Aminosäuren in die Membran verankert ist. [1]

Die Viruspartikel enthalten außerdem die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease.

1.1.2. Genomischer Aufbau

Das Genom der Retroviren besteht aus zwei Kopien einer einzelsträngigen Plusstrang-RNA, die eine Länge von 7 kB beim murinen Leukämie-Virus MLV über 9,2 kB beim HIV-1 bis zu 12 kB beim humanen Spumaretrovirus HSRV aufweist. [1]

Nach der reversen Transkription und der Integration des Erbguts in das Wirtsgenom wird das virale Genom als Provirus bezeichnet. Der typische Aufbau eines Provirus ist in Abbildung 3 dargestellt.



Abbildung 3: Der typische Aufbau eines Provirus ist hier am Beispiel des HERV-K113 dargestellt. Die strukturgebenden Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env* werden von long terminal repeats (LTR) flankiert. HERV-K besitzt außer diesen Strukturproteinen, die alle Retroviren exprimieren, auch das akzessorische Protein Rec, dessen Leserahmen mit dem des *env*-Gens überlappt. Die Abbildung stammt aus Kurth, R. und Bannert, N. 2010. [2]

Alle exogenen und gut erhaltenen endogenen Retroviren weisen den typischen Aufbau 5`-*gag-pro-pol-env*-3` auf. *Gag* kodiert hierbei für die Matrix- und Capsidproteine, *pro* für die Protease, *pol* für die Enzyme Reverse Transkriptase, RNase H und Integrase und *env* für die Hüllmembran. Einige exogene Retroviren, wie HIV-1 besitzen zusätzliche akzessorische Gene und sind dadurch als komplexe Retroviren definiert. HIV-1 besitzt beispielsweise die akzessorischen Gene *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpu* und *vpr*, die nicht für strukturgebende Proteine kodieren. Auch einige endogene Retroviren besitzen diese regulatorischen und akzessorischen Gene. So exprimiert zum Beispiel MMTV das akzessorische Protein Rem und HERV-K besitzt Rec als zusätzliches Protein. Dies definiert MMTV und HERV-K als komplexe Retroviren. Die retroviralen Gene sind von „Long Terminal Repeats“ (LTR) begrenzt, denen regulatorische Aufgaben zukommen.

1.2. HIV-1 als Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS

HIV wurde erstmals 1983 von Luc Montagnier beim Menschen beschrieben. [3]

Der Ursprung des Virus liegt bei dem simianen Immundefizienz-Virus SIV der Affen, welches auf den Menschen übergegangen ist und HIV hervorbrachte.

Die erworbenen Immunschwäche AIDS kann sowohl durch HIV-1 als auch durch HIV-2 ausgelöst werden, wobei die Homologie unter den beiden Virusstämmen auf

Aminosäuresequenz nur etwa 45 – 50 % beträgt. Das HIV-1 spielt bei der Pandemie die bedeutendere Rolle, da es zum einen sehr viel häufiger auftritt als HIV-2 und zum anderen der Krankheitsverlauf einer von HIV-1 ausgelösten AIDS-Erkrankung meist schneller verläuft als bei HIV-2.

Derzeit sind nach Schätzungen etwa 33,4 Millionen Menschen weltweit infiziert, wobei vermutlich 90 % aller Infizierten in weniger entwickelten Ländern, vor allem einigen Ländern des afrikanischen Kontinents, leben. [4] Doch auch in Deutschland infizieren sich immer noch zahlreiche Menschen jedes Jahr mit dem Virus. So kam es nach Schätzungen des Robert Koch- Instituts im Jahr 2011 zu 2700 Neuinfektionen in Deutschland. [5]

Die Übertragung des Virus findet über ungeschützte Sexualkontakte, über Blut oder sowohl pränatal als auch postnatal von Mutter zu Kind statt. [4] Von der Infektion bis zum Ausbruch von AIDS vergehen meist viele Jahre und die Inkubationszeit kann durch HAART (*highly active antiretroviral therapy*) massiv verlängert werden. Die Therapie besteht aus Inhibitoren der Reversen Transkriptase, Protease-Inhibitor und Integrase-Inhibitor und hindert somit das Virus an einem produktiven Replikationszyklus. [6]

Die Wirtszellen des Virus sind Zellen, die den CD4-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, vor allem T-Helferzellen. Da diese Zellen eine bedeutende Rolle in der zellulären und humoralen Immunantwort des Wirts spielen, kommt es zu einer zunehmenden Schwächung des Immunsystems und zu immer mehr opportunistischen Erkrankungen durch andere Viren, Bakterien oder Parasiten. [4]

1.3. Endogene Retroviren

Endogene Retroviren sind dadurch entstanden, dass vor vielen Millionen Jahren Retroviren die Keimbahn, also die Eizellen oder Spermatozyten bzw. deren Vorläufer, unserer Vorfahren infizierten und diese Proviren wie normale Gene vertikal nach den Mendelschen Gesetzen der Vererbungslehre auf die Nachfahren vererbt wurden. Dieser Vorgang wird als „Endogenisierung“ bezeichnet. [7] Die meisten humanen endogenen Retroviren infizierten vor über 50 Millionen Jahren die menschliche Keimbahn und sind teilweise bis heute im Genom des Menschen zu finden, wo sie bis zu 8 % des gesamten menschlichen Genoms ausmachen. [8], [9] Diese Überbleibsel früherer retroviraler Infektionen sind meist inaktiv, einige haben aber auch mögliche Effekte auf die menschliche Gesundheit, die sowohl positiver als auch negativer Art sein können.

1.3.1. HERV – Schaden und Nutzen

Wie bereits in Kapitel 1.1. beschrieben, gibt es zahlreiche exogene Retroviren, die nachweislich einen pathogenen Effekt auf Mensch und Tier haben können und sogar für die Tumorentstehung verantwortlich sein können wie das HTLV-1, welches 1980 von Robert Gallo als erstes tumorinduzierendes Retrovirus beim Menschen entdeckt wurde. [10]

Nun ist es natürlich von großem Interesse zu erfahren, ob auch endogene Retroviren die Gesundheit des Menschen beeinflussen können, da sie fest in unserem Genom verankert sind und sich die Frage stellt, wieso sie im Laufe der Evolution nicht ausgesiekt wurden. Dies spricht dafür, dass HERVs einen positiven Einfluss auf die Gesundheit des Wirts haben können. Die verschiedenen positiven und negativen Aspekte sind der Abbildung 4 zu entnehmen.

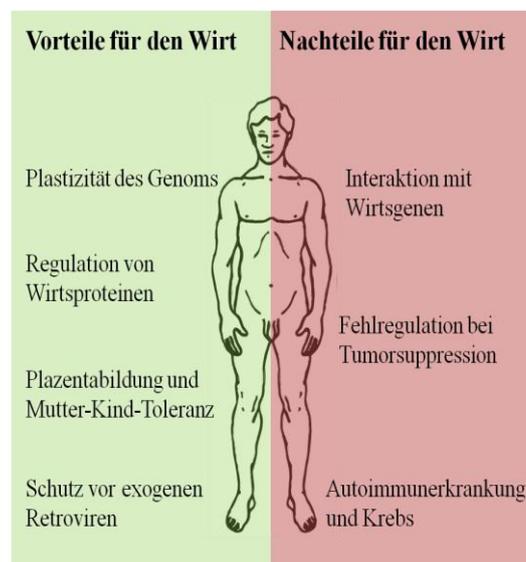


Abbildung 4: Die Abbildung zeigt die verschiedenen positiven und negativen Effekte, die humane endogene Retroviren auf die Gesundheit des Menschen haben können. Die Abbildung wurde verändert nach Vorlage von Dr. Kirsten Hanke.

Einen positiven Einfluss haben die humanen endogenen Retroviren, die bekanntlich etwa 8 % des menschlichen Genoms ausmachen, auf die Plastizität des Genoms, indem es zu Genduplikationen oder Rekombinationen kommt. Außerdem sind etwa 50 % der LTRs von HERV-K als Promotoren tätig und können somit die Transkription benachbarter Gene regulieren. [11]

Bestimmte endogene Retroviren sind auch in der Lage, die Infektion mit bestimmten exogenen Retroviren zu unterbinden. [12] Eine wichtige Rolle spielen humane endogene Retroviren vermutlich auch bei der Ausbildung der Mutter-Kind-Toleranz bei einer Schwangerschaft. Der Embryo stellt für die Mutter einen Fremdkörper dar, der vor der Abstoßung geschützt werden muss. Im Syncytiotrophoblast der Plazenta finden sich große

Mengen an HERV-W- und HERV-FRD-Hüllproteinen, welche auch Syncytin-1 und Syncytin-2 genannt werden. Für das Syncytin-2 konnte bereits ein immunsuppressiver Effekt nachgewiesen werden, der vermutlich eine große Rolle bei der Ausbildung der Mutter-Kind-Toleranz spielt. Die beiden Env-Proteine sind für die Ausbildung des Syncytiotrophoblasten essentiell. [13] In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte auch das Vorhandensein von HERV-K Proteinen in der Plazenta nachgewiesen werden, die möglicherweise durch ihre immunsuppressive Wirkung dem Schutz des Fötus dienen. [14]

Doch es konnten nicht nur positive Effekte der humanen endogenen Retroviren auf den Wirt nachgewiesen werden. Für eine erfolgreiche Virusreplikation müssen HERV-K und andere Retroviren mit Wirtsproteinen interagieren und können die Funktion dieser dadurch beeinflussen. Daher werden HERVs schon seit langer Zeit mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Krebs in Verbindung gebracht. So konnten in Melanomen und Keimzelltumoren bereits HERV-K-Partikel, mRNAs und Proteine nachgewiesen werden. [15], [16] Außerdem scheint das akzessorische Rec-Protein von HERV-K eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung zu spielen, da Rec mit dem promyelozytischen Leukämie-Zinkfingerprotein, welches tumorsuppressive Eigenschaften hat, interagieren und somit die Apoptose vermindern und die Zellproliferation erhöhen kann. [17], [18]

1.3.2. Die HERV-K- (HML-2) Familie und HERV-K113

Die HERV-K-(HML-2) Familie ist die jüngste bekannte Familie der humanen endogenen Retroviren und somit auch die am besten erhaltene. Die Integration von HERV-K in das Genom von Vorfahren der Altweltaffen fand erstmals vor ca. 35 Millionen Jahren statt und wiederholte Replikationsereignisse führten dazu, dass sich etwa 60 provirale Kopien im Genom manifestieren konnten. [7] Der Stamm HERV-K113 ist der am besten untersuchte der HERV-K-Familie und je nach ethnischer Herkunft tragen heute bis zu 30 % der Weltbevölkerung das HERV-K113-Provirus auf Chromosom 19, in Deutschland sind es ca. 12 %. [19] Das Alter von HERV-K113 wird auf ca. 2 Millionen Jahre geschätzt und aufgrund des jungen Alters ist HERV-K die einzige humane ERV-Familie, die für alle viralen Gene open reading frames (ORF) besitzt und somit theoretisch das Potential hat, selbständig zu replizieren. Allerdings tragen viele Proviren Inaktivierungsmutationen auf dem Gen, welches für die Reverse Transkriptase codiert, wodurch eine selbständige Replikation verhindert wird. [19] Es ist durchaus möglich, dass innerhalb der Weltbevölkerung aufgrund des jungen Alters noch replikationskompetente Proviren existieren. Außerdem sind vermutlich viele HERV-K (HML-2) Sequenzen bisher nicht entdeckt worden, da diese noch nicht vollständig im Genom fixiert sind.

1.4. Der virale RNA-Transport

Komplexe Retroviren besitzen häufig akzessorische Proteine, die für den RNA-Transport zuständig sind und somit einen Mechanismus für den effizienten nukleären Export viraler Transkripte darstellen. Das RNA-Transportproteine von HIV-1 ist Rev, das von HERV-K wird Rec genannt. Die Funktionsweise des nukleozytoplasmatischen RNA-Transports von HIV-1 ist in Abbildung 5 dargestellt.

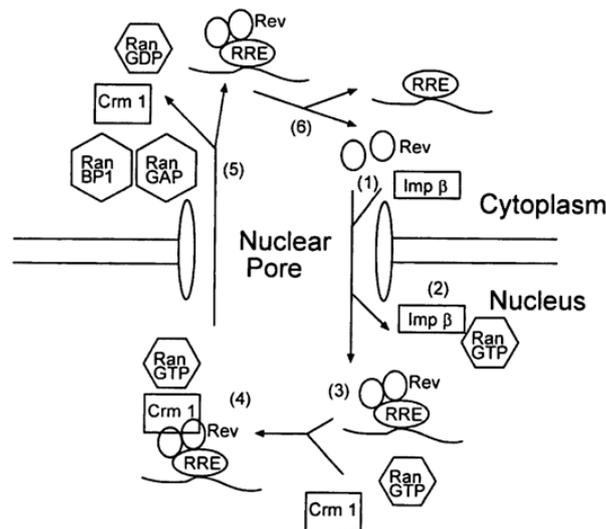


Abbildung 5: (1) Rev bindet an Importin-β, welches daraufhin mit den Kernporen interagiert und somit zum Import des Komplexes in den Zellkern führt. (2) Im Zellkern bindet Importin-β an Ran-GTP und Rev wird daraufhin freigesetzt. (3) Rev bindet an sein responsives Element und multimerisiert. (4) Crm1 und RanGTP werden durch den Rev-RRE-Komplex rekrutiert und der gesamte Komplex wird aus dem Zellkern exportiert. (5) Im Zytoplasma kommt es zur Hydrolyse des Ran-GTPs, wodurch Crm1 den Komplex verlässt. (6) Rev kann nun wieder in den Kern einwandern.

Abbildung von Wang et al., 2000. [20]

Nachdem das RNA-Transportprotein im Zytoplasma synthetisiert wurde, bindet es über eine argininreiche Domäne, die das nukleäre Importsignal (NLS) darstellt, an den Kernimportrezeptor Importin-β, woraufhin der Kernimport ausgelöst wird. [21] Das Importin-β bindet an RanGTP und der RNA-Transportprotein / Importin-β-Komplex zerfällt. Daraufhin bindet das RNA-Transportprotein über NLS als Monomer an sein responsives Element und bildet Multimere aus. [22] Schließlich bindet das Kernexportsignal (NES), eine leucinreiche Domäne an den Exportrezeptor Crm1/Exportin-1, welcher von Ran-GTP aktiviert wurde.[23] Der somit entstandene Komplex aus dem viralen Transkript, RNA-Transportmolekülen, Crm1 und RanGTP interagiert mit den Nucleoporinen und ein Export über die Kernpore wird somit ermöglicht. Im Zytoplasma kommt es zur Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP und der

Komplex zerfällt. Das RNA-Transportprotein ist nun frei und kann erneut in den Kern transportiert werden.

1.4.1. Das HIV-1 Rev Protein

Das HIV-1 Rev Protein (*regulator of expression of virion proteins*) ist ein akzessorisches Protein und ist somit nicht strukturgebend für die Viruspartikel. Das Rev Protein ist dem HERV-K Rec und dem HTLV Rex funktionell sehr ähnlich, denn alle wirken als posttranskriptionelle Transaktivatoren und regulieren somit die Synthese von Genprodukten nach der Transkription. Rev wird in zwei Exons kodiert, die mit denen des Tat-Proteins überlappen und weist eine Länge von 116 AS und ein Molekulargewicht von 13 kDa auf. [1] Der Aufbau des HIV-1 Rev ist in Abbildung 6 dargestellt.

HIV-1 Rev

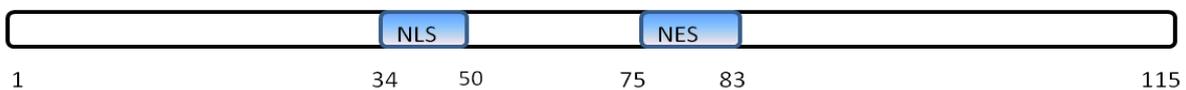


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt das RNA-Transportprotein HIV-1 Rev. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen im Molekül an. Beim NLS handelt es sich um das nukleäre Importsignal, beim NES um das Kernexportsignal. Die Abbildung wurde verändert nach Dr. Kirsten Hanke, Dissertation.

Rev wird früh in der Infektion gebildet und reichert sich im Zellkern an. Dort kann es an sein 351 Nukleotide langes responsives Element binden, dem „Rev responsive element (RRE)“, welches nur in ungespleißter bzw. unvollständig gespleißter RNA vorkommt und bewirkt den bevorzugten Transport dieser RNA-Spezies aus dem Zellkern ins Zytoplasma, wo sie in die entsprechenden Proteine translatiert werden. [24], [25] Ohne diesen Rev-gesteuerten RNA-Transport wären diese RNA-Spezies nicht in der Lage, den Zellkern zu verlassen und würden daraufhin abgebaut werden.

Rev wird außerdem mit der Verpackung der genomischen RNA von HIV-1 in die Viruspartikel in Verbindung gebracht. [26]

1.4.2. Das HERV-K Rec Protein

HERV-K113 besitzt innerhalb der *env*-Gensequenz einen offenen Leserahmen für Rec (*regulator of expression encoded by corf*), dessen Struktur in Abbildung 7 dargestellt ist.

HERV-K Rec

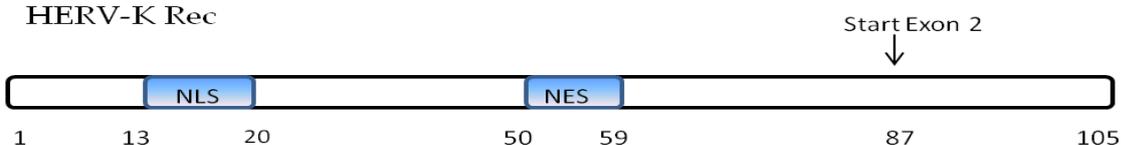


Abbildung 7: Die Abbildung zeigt das RNA-Transportprotein HERV-K Rec. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen im Molekül an. An AS-Position 87 beginnt das zweite Exon des Rec-Proteins.

Beim NLS handelt es sich um das nukleäre Importsignal, beim NES um das Kernexportsignal. Die Abbildung wurde verändert nach Dr. Kirsten Hanke, Dissertation.

Rec wurde früher cORF genannt und durch dieses akzessorische Protein zeichnet sich HERV-K als komplexes Retrovirus aus. Das RNA-Transportprotein besteht aus 105 Aminosäuren und ist funktionell und strukturell mit dem HIV-1 Rev und dem HTLV Rex verwandt. [27] Rec wird ebenso wie das HIV-1 Rev in zwei Exons kodiert.

Ebenso wie Rev und Rex ist Rec für den nukleozytoplasmatischen Transport von ungespleißter und einfach gespleißter RNA zuständig. Dies wird durch die Bindung von Rec an sein responsives Element RcRE, welches 430 Nukleotide lang ist, erreicht.

1.4.3. Das Staufen-1-Protein

Das Staufen-1 Protein ist ein RNA-Transportprotein, das ubiquitär, d.h. in allen Eukaryoten und in einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen vorkommt und dessen Funktion konserviert ist. [28] Das humane Staufen-1 Protein ist ein RNA-bindendes Protein, das sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige RNA binden kann.

Staufen-1 wurde interessanterweise auch in Wechselwirkung mit viralen Proteinen beobachtet. Es bindet beispielsweise an das p55Gag-Vorläuferprotein von HIV-1 und übt einen Einfluss auf die Gag-Multimerisierung aus. [29] Es konnte auch gezeigt werden, dass Staufen-1 zusammen mit HIV-1 RNA in Viruspartikel verpackt wird. Dies deutet darauf hin, dass Staufen-1 eine wichtige Rolle beim viralen mRNA-Transport haben könnte. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Staufen-1 unter Stressbedingungen in Stressgranula rekrutiert wird und dort in Assoziation mit HMM A3G vorliegt.[28]

1.5. Stressgranula

Zellen bilden unter bestimmten Bedingungen sogenannte Stressgranula aus. Stressgranula sind hochdynamische, cytoplasmatische Orte des mRNA-Silencing, die dann gebildet werden, wenn die Translation von mRNA zweitrangig ist. [28] Experimentell werden Stressgranula durch Zugabe von Natriumarsenit induziert, wodurch die Zelle in einen sogenannter ER-Stress geführt wird. Es ist wahrscheinlich, dass virale RNA, die mit dem HERV-K Rec oder dem HIV-1 Rev zusammen in die Stressgranula transportiert wird, dort regulatorischen Prozessen unterworfen ist. Daher ist es interessant zu untersuchen, ob diese beiden Proteine in den Stressgranula lokalisiert sind. Dies konnte für das HERV-K Rec bereits gezeigt werden (Kirsten Hanke, Disseration) und gilt es nun für das HIV-1 Rev zu bestätigen oder zu widerlegen.

1.6. Das antivirale APOBEC3G

Mitglieder der APOBEC-Familie (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 1-like*) sind in der Lage, die Wirtszelle vor der Infektion durch exogene Retroviren zu schützen und eine Retrotransposition von endogenen Retrotransposons aufgrund ihrer Cytidindeaminaseaktivität zu verhindern. Bei APOBEC3G handelt es sich um ein Wirtprotein, welches in zwei Zustandsformen in der Zelle vorkommen kann, die in Abbildung 8 dargestellt sind.

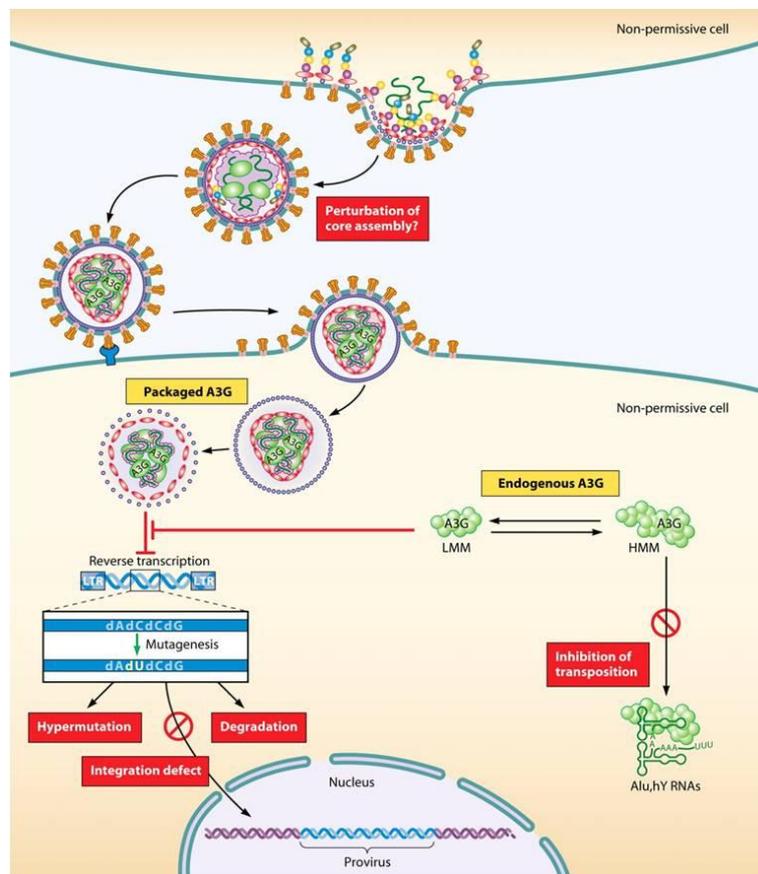


Abbildung 8: Strategien der HIV-1-Restriktion durch A3G: A3G wird in Virionen verpackt und bei der Infektion einer neuen Zielzelle wieder freigesetzt. Dort kann das LMM A3G als Inhibitor der HIV-Replikation agieren, indem es die reverse Transkription hemmt. Außerdem besitzt das LMM A3G eine Deaminaseaktivität und kann somit zur sogenannten G→A-Hypermutation führen. Die hochmolekulare Form des A3G besitzt keine Enzymaktivität, kann aber die Retrotransposition von endogenen Retroelementen verhindern.

Zum einen als niedrigmolekulares LMM A3G und zum anderen als hochmolekulares HMM A3G, welches in dieser Arbeit die größere Rolle spielt. Beim APOBEC3G handelt es sich um ein antivirales Protein, welches bei Zellstress in die Stressgranula rekrutiert werden kann. [30]

Das LMM A3G wird zunächst in die Viruspartikel verpackt und bei der Infektion einer neuen Wirtszelle wieder freigesetzt. Das freigesetzte LMM A3G kann die Infektion durch exogene Retroviren wie z.B. dem HIV-1 dadurch verhindern, dass es die Reverse Transkription verhindert. Außerdem ist das LMM A3G enzymatisch aktiv und kann in Nukleinsäuren Cytidine zu Uracil deaminieren, wodurch das virale Genom beschädigt und daraufhin abgebaut werden kann. Die niedrigmolekulare Form des A3G kann somit einen Schutzmechanismus gegen exogene retrovirale Infektionen darstellen. Allerdings hat das bedeutendste der humanpathogenen exogenen Retroviren einen Mechanismus entwickelt, wie es der Inhibition durch A3G entkommen kann.

Das akzessorische HIV-1 Protein Vif inhibiert die A3G-Funktion und macht somit eine erfolgreiche Infektion der Wirtszelle durch das Virus möglich. [30]

Neben der dargestellten niedrigmolekularen Form des APOBEC3G gibt es auch die enzymatische inaktive hochmolekulare Form, welche mit der Restriktion von endogenen Retroelementen in Verbindung gebracht wird und daher für die Untersuchungen dieser Arbeit eine größere Rolle spielt.

Bei der hochmolekularen Form des A3G handelt es sich um Komplexe von 5-15 MDa, die sich aus mindestens 95 verschiedenen Proteinen zusammensetzen. In diesen Komplexen sind endogene Retroelemente wie Alu RNAs vorhanden, wodurch die Retrotransposition dieser Elemente stark vermindert wird. [31] Außerdem findet sich in HMM A3G-Komplexen Stauf-1.

1.7. Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der RNA-Transportproteine HERV-K Rec und HIV-1 Rev während des nukleozytoplasmatischen RNA-Transports und der Virusassemblierung zu untersuchen. Vor allem soll das Zusammenspiel des Rec-/bzw. Rev-Proteins mit möglichen Interaktionspartnern wie dem humanen Stauf-1-Protein oder dem antiviralen HMM A3G untersucht werden.

Es sollen außerdem Parallelen und Unterschiede im Verhalten dieser beiden RNA-Transportproteine beleuchtet werden.

Weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Aufreinigung von Stauf-1- und HERV-K Rec-Protein, da bisher weder gegen das eine noch das andere ein funktioneller Antikörper vorhanden ist. Durch die Aufreinigung soll die Vorarbeit für eine entsprechende Antikörpergenerierung geleistet werden.

2. Materialien und Methoden

Nachfolgend werden die für die Versuche verwendeten Materialien aufgelistet und die eingesetzten Methoden erläutert.

2.1. Materialien

2.1.1. Laborgeräte, Apparaturen und Hilfsmittel

Apparatur	Hersteller
AlphaImager 2200 MultiImage Light Cabinet	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
-Inkubator Heracell 150 für eukaryotische Zellen	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Coulter-Counter (Zellzähler)	Coulter Electronics Inc., Miami, USA
DNA Engine Thermocycler	BioRad, Hercules, California, USA
Drehinkubator HB-500	UVP, Upland, California, USA
Gene Pulser XCell + Shock Pod	BioRad, Hercules, California, USA
Horizontalschüttler GFL 3016	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Inkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Konfokales Laser Scanning Mikroskop cLSM 780	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mini-Protean 3 Electrophoresis	BioRad, Hercules, California, USA
Multifuge 1 S-R	Kendro, Langenselbold, Deutschland
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
Odyssey	LI-COR, Lincoln, USA
Photometer UV-1202	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Power Pac HC High-Current Power Supply	BioRad, Hercules, California, USA
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System	BioRad, Hercules, California, USA
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, Hercules, California, USA
UV-Transilluminator	BioView, Billerica, USA

Tabelle 1: verwendete Laborgeräte und ihre Hersteller

2.1.2. Chemikalien, Enzyme und Größenstandards

Chemikalien / Enzyme	Hersteller
Agarose	Peplab Biotechnologie GmhH, Erlangen, Deutschland
BigDye 3.1	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Foster City, USA
dNTP's	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
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
Ni-NTA-Sepharose	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
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
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Tabelle 2: Chemikalien, Enzyme und Größenstandards**2.1.3. Puffer und Nährmedien**

Puffer / Medium	Zusammensetzung
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/l Agar
LB-Medium	1 % Bacto-Hefe-Extrakt; 1 % NaCl, pH 7,0
SOB-Medium	20 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt, 0,186 g KCl, 0,584 g NaCl ad 970 ml , pH 7,0
SOC-Medium	9,7 Teile SOB, 0,1 Teil Mg-Mix, 0,2 Teile Glukose
1 x TAE	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2
2 x YT-Medium	1 % Bacto-Trypton; 1 % Bacto Hefe Extrakt; 0,5 % NaCl
6 x DNA-Probenpuffer	10 mM Tris-Acetat, 50 mM EDTA, 10 % Ficoll-400 (w/v) (Serva), 0,4 % Orange-G (w/v) (Sigma) in
10 % SDS	(w/v) in A. bidest

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien

2.1.4. Kits

Kit	Bezugsquelle
Effectene Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland

Tabelle 4: Eingesetzte Kits und ihre Bezugsquellen**2.1.5. Konstrukte**

Konstrukt	Bezugsquelle / Publikation
APOBEC3G-Cyan	Malim et al., [32]
HIV-1 coGag-V5	Reudelsterz, Marc
HIV-1 coRev-pBUD (V5)	Dr. Hanke, Kirsten
HIV-1 coRev-pcDNA3 (V5)	Dr. Hanke, Kirsten
HIV-1 coRev-pEGFP	Dr. Hanke, Kirsten
oricoHERV-K113-pBSK	Dr. Hanke, Kirsten
oricoRec-pBud (V5)	Dr. Hanke, Kirsten
oricoRec-pEGFP	Dr. Hanke, Kirsten
oricoRec-pET16b (V5)	Dr. Hanke, Kirsten
oricoRec Δ NES-pET16b (V5)	Dr. Hanke, Kirsten
SHIV-Luzi	Dr. Hanke, Kirsten
Staufen-1-pCherry	Dr. Hanke, Kirsten
Staufen-1-pCMV (Flag)	Dr. Hanke, Kirsten
TIA-1-YFP	Kedersha et al., [33]

Tabelle 5: Bezugsquellen und Publikationen der verwendeten Konstrukte

2.1.6. Antikörper

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
α V5	Maus	AbD Serotec, MorphoSys AG, Martinsried, Deutschland
α V5	Kaninchen	Novus Biologicals, Inc., Littleton, USA
α V5	Ziege	Novus Biologicals, Inc., Littleton, USA
α V5-Cy3	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α V5-HRP	Maus	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
α Flag	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α Kaninchen	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Alexa647 α Mouse-IgG	Huhn	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Alexa647 α Rabbit-IgG	Huhn	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Alexa568 α Mouse-IgG	Esel	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
α Ziege-HRP	Kaninchen	Dako, Hamburg
α V5-Sepharose	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α V5-Sepharose	Ziege	Novus Biologicals, Inc., Littleton, USA

Tabelle 6: Der Tabelle sind die verwendeten Antikörper und die jeweilige Spezies aus der sie gewonnen wurden, sowie ihre Bezugsquelle zu entnehmen.

2.1.7. Bakterienstämme

Stamm	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
<i>E. coli</i> Top10	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> Stable2	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> Stable3	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> XL-10 Gold	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland

Tabelle 7: Bezugsquellen der verwendeten *E. coli*- Stämme

2.1.8. Antibiotika

Antibiotikum	Bezugsquelle
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zeocin	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
100 x Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

Tabelle 8: Antibiotika und ihre Bezugsquellen**2.1.9. Software**

Software	Bezugsquelle
BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.9.0	Tom Hall (1999) , [34]
Berthold Luminometer Analysis Software	BERTHOLD TECHNOLOGIES Bioanalytic, Bad Wildbad, Deutschland
Nanodrop ND-1000 v3.3	Molecular Dynamics /Amersham Bioscience Nanodrop, Wilmington, USA
Odyssey Software 3.0	LI-COR, Lincoln, USA

Tabelle 9: Neben Standardprogrammen wie Microsoft Office Word, Excel und Power Point wurde die oben genannte Software eingesetzt.**2.1.10. Oligonukleotide (Primer)**

Die eingesetzten Sequenzierungs- und Mutageneseprimer sind im Anhang unter A.3 aufgelistet. Alle Primer wurden durch die Firma Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA, synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Um die Primer gebrauchsfertig zu machen, wurden sie mit Aqua bidest auf eine Endkonzentration von 100 pmol/ μ l verdünnt.

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Analytik

2.2.1.1. Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR dient dazu, eine oder mehrere zielgerichtete Mutationen in eine bekannte Nukleotidsequenz einzufügen. Hierbei wird ein Oligonukleotid, welches in der Mitte die gewünschte Mutation besitzt, als Primer für die DNA-Synthese eingesetzt. Die Schmelztemperatur (T_m) der Mutageneseprimer wurde nach Herstellerangaben auf mindestens 75 °C nach nachfolgender Formel eingestellt:

—

Hierbei steht % GC für den prozentualen Guanin- und Cytosin-Anteil, der idealerweise bei mindestens 40 % liegen sollte, und N für die Gesamtprimerlänge.

Um eine einzelne Mutation zu erzielen, wurde die Methode der Single-Mutagenese angewandt. Waren mehrere Mutationen auf einem Nukleotidstrang einzuführen, so wurde das Multi-Mutagenese-Kit von Stratagene verwendet, welches den Einsatz von bis zu fünf verschiedenen Mutagenese-Primern zeitgleich ermöglicht. Als Polymerase wurde die TurboPfu-DNA-Polymerase eingesetzt, welche eine Proofreading-Aktivität aufweist. [35] Im Anschluss an die Mutagenese-PCR wurde das PCR-Produkt für eine Stunde bei 37 °C mit 20 Einheiten DpnI verdaut. DpnI ist ein Verdauungsenzym, welches spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA erkennt und schneidet, nicht jedoch unmethylierte Nukleotidstränge. Da die meisten Bakterienstämme das dam-Methylierungssystem besitzen und die bakteriell angereicherte Plasmid-DNA somit methyliert ist, werden die ursprünglichen Plasmidstränge abgebaut und die neusynthetisierten, mutagenisierten DNA-Stränge bleiben intakt. [36] Somit kann die Ausbeute an Mutanten stark erhöht werden. Nach erfolgtem DpnI-Verdau wurde ein gewünschtes Volumen des Reaktionsansatzes in chemisch kompetente *E.coli* des Stammes XL10-Gold (Stratagene) transformiert.

2.2.1.1.1. Single-Mutagenese

Eine Single-Mutagenese wurde durchgeführt, wenn nur ein einzelner Nukleotidaustausch auf einem DNA-Strang erfolgen sollte. Hierzu wurde ein komplementäres Primerpaar eingesetzt, wobei sowohl der Strang- als auch der Gegenstrangprimer die gewünschte Mutation tragen.

Ein typischer Reaktionsansatz sieht wie folgt aus:

Komponente	Konzentration	Typischer Reaktionsansatz
10 x AD-Reaktionspuffer	1 x	5 µl
dsDNA-Template	5 – 50 ng	1 µl
Forward-Primer	125 ng	3 µl
Reverse-Primer	125 ng	3 µl
dNTP-Mix, 25 x	1 x	2 µl
		ad 50 µl
TurboPfu-Polymerase AD		1 µl

Tabelle 10: Typischer Reaktionsansatz einer site-directed Single Mutagenese

Die Mutagenese-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

30 sec 95 °C initiale Denaturierung	} 18 x
30 sec 95 °C Denaturierung	
1 min 55 °C Primer-Annealing	
1 min/kb 68 °C Elongation	

2.2.1.1.2. Multi-Mutagenese

Das site-directed Multi-Mutagenese Kit von Stratagene ermöglicht die zeitgleiche Mutation mehrerer Nukleotide auf einem DNA-Strang. Hierzu können bis zu fünf verschiedene Mutagenese-Primer eingesetzt werden. Ein typischer Reaktionsansatz sieht folgendermaßen aus:

Komponente	Konzentration	Typischer Reaktionsansatz
10 x QuickChange Multi Reaction Puffer	1 x	2,5 µl
QuickSolution		0-0,75 µl
dsDNA-Template	100 ng	2 µl
Mutagenese-Primer	1-3 Primer a 100 ng, 4-5 Primer a 50 ng	0,5 – 1,5 µl
dNTP-Mix, 25 x	1 x	1 µl
Aqua bidest		ad 25 µl
QuickChange Multi enzyme blend	2,5 Einheiten	1 µl

Tabelle 11: Typischer Reaktionsansatz einer site-directed Multi-Mutagenese

Die Multi-Mutagenese-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 min 95 °C initiale Denaturierung	} 30 x
1 min 95 °C Denaturierung	
1 min 55 °C Primer-Annealing	
2 min/kb 65 °C Elongation	

2.2.1.2. Restriktion mit Endonukleasen

Um hergestellte Konstrukte zu überprüfen oder für Klonierungen wurden Restriktionsverdau durchgeföhrt. Hierfür wurden die entsprechenden Vektoren mithilfe spezifischer Endonukleasen des Typs 2, welche palindromische Sequenzen erkennen und schneiden, nach Tabelle 12 verdaut. Der benötigte NEB-Puffer und die Notwendigkeit der Zugabe von BSA ist den Protokollen des Herstellers der Restriktionsenzyme (NEB) zu entnehmen. Die Reaktionsansätze wurden für ca. zwei Stunden bei der von NEB angegebenen Temperatur inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze im Agarosegel analysiert.

Komponente	Eingesetztes Volumen/Konzentration
DNA	1 µl
NEB-Puffer	2 µl
Restriktionsenzym 1	0,5 µl
Restriktionsenzym 2	0,5 µl
[BSA	1 µl]
	ad 20 µl

Tabelle 12: Reaktionsansatz eines Restriktionsverdau

2.2.1.3. Ligation

Die Ligation ist ein wichtiger Schritt bei der Klonierung. Hierbei wird ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Vektor eingefügt. Zuvor werden Vektor und DNA-Fragment mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, sodass kompatible Enden entstehen. Die verdauten DNA-Fragmente wurden mittels einer Agarosegelelektrophorese getrennt und die gewünschten Fragmente daraus aufgereinigt. Die T4-DNA-Ligase verknüpft schließlich bei der Ligation freie 3`OH-Gruppen mit 5`Phosphatresten. Somit können bestimmte DNA-Fragmente in geschnittene Vektoren eingeföhrt werden. Wird ein Vektor mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten, so entstehen zwei kompatible Enden, die religieren können. Um dies zu verhindern, wurde zuvor die Vektor-DNA mithilfe des Enzyms alkalische

Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP) dephosphoryliert und somit die Religation des Vektors unterbunden.

Ein typischer Reaktionsansatz für die nachfolgende Ligation ist der Tabelle 13 zu entnehmen. Es wurde stets ein Überschuss an gewünschtem Insert-DNA-Fragment zugegeben, da dies die Ausbeute an positiven Klonen erhöht. Die Masse des Insert-Fragments, die dem Reaktionsansatz zugefügt wurde, kann folgendermaßen errechnet werden [37]:

$$[\text{ng}] = 5 \times \quad \quad \quad [\text{ng}] \times \text{—————}$$

Komponente	Eingesetztes Volumen / Konzentration
Ligationspuffer, 10 x	2 µl
Vektor-DNA	50 ng
Insert-DNA	5 x Menge Vektor-DNA
T4-DNA-Ligase	1 µl
Aqua bidest	ad 20 µl

Tabelle 13: Typischer Ansatz einer Ligrationsreaktion

2.2.1.4. DNA-Agarosegelelektrophorese

Mithilfe der Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente nach ihrer Größe und Ladung auftrennen. Diese Methode ermöglicht somit eine Größen- und Qualitätskontrolle der DNA und macht die Extraktion bestimmter Fragmente möglich.

Die Agarose wurde mit 1 x TAE-Puffer auf eine Endkonzentration von 1 % gebracht und bis zu einem vollständigen Schmelzen der Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Dann wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben und die Agarose in die Laufschiitten gegossen. Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäuren der DNA und verändert dabei sein Absorptionsspektrum, was einen Nachweis der DNA-Fragmente ermöglicht. [38] Nach dem Erstarren des Agarosegels wurden die Proben, die zuvor mit einem Ladepuffer versetzt wurden, aufgetragen und eine Spannung von 80-120 Volt angelegt. Als Größenstandard wurde der „Genruler 1kb Ladder Plus“ von Fermentas verwendet. Die DNA-Fragmente können unter dem UV-Schirm sichtbar gemacht und mithilfe des AlphaImager 2200 dokumentiert werden.

2.2.1.5. Gelextraktion

DNA-Fragmente, die mittels Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, können mithilfe des UV-Transilluminators sichtbar gemacht, weil das zugegebene Ethidiumbromid in die DNA interkaliert. Die gewünschten Fragmente können unter dem UV-Schirm mit einem Skalpell herausgeschnitten und mithilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) aus dem Gel aufgereinigt werden. Zunächst wird das Agarosegelstück, das die DNA enthält, bei 50 °C in einem Puffer gelöst und anschließend auf eine Silicamembran gegeben. Die DNA bindet an die Silicamembran und kann nun mit verschiedenen Puffern gewaschen und schließlich mit 30 µl Aqua bidest eluiert werden. Das genaue Vorgehen der Aufreinigung ist dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

2.2.1.6. Herstellung elektrokompetenter Top10 *E. coli*

Für jede Präparation wurden *E. coli* des Stammes Top10 auf nicht-selektiven 2YT-Platten frisch ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Übernachtskultur von einer Einzelkolonie in 10 ml 2YT-Medium angesetzt. Zur Kontrolle des Mediums wurden 10 ml dieses Mediums ohne Bakterienkolonien ebenfalls über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Negativkontrolle darf am nächsten Tag keine Trübung aufweisen.

Am Präparationstag wurden vier 2-Liter-Schikanekolben mit je 250 ml 2YT-Medium und je 2,5 ml der Übernachtskultur befüllt. Die Bakterienkulturen wurden bis zu einer Optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 unter ihren gewohnten Wachstumsbedingungen inkubiert. Wenn diese OD erreicht war, wurden die Zellen aus den vier Kolben vereint und 15 bis 30 Minuten auf Eis gestellt, um ihr Wachstum zu stoppen. Die Kultur wurde anschließend in vier Zentrifugenbechern, die zuvor mittels einer 0,1 N HCl-Lösung desinfiziert wurden, bei 4000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert.

Die Überstände wurden verworfen und die Bakterienpellets in jeweils 250 ml eiskaltem 1 mM HEPES resuspendiert und erneut bei 4000 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden nun in je 125 ml eiskaltem 1mM HEPES resuspendiert und je zwei Bakterienpellets wurden vereint und unter oben genannten Bedingungen erneut zentrifugiert. Es folgte die Resuspension der Bakterienpellets in jeweils 25 ml 1 mM HEPES / 10% Glycerin. Die resuspendierten Pellets wurden in 50 ml-Falcontubes überführt und bei 5000 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets wurden nochmals für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend mithilfe einer Pipette vom restlichen Überstand befreit. Die Zellen wurden in 2 ml eiskaltem 10 % Glycerin

resuspendiert und in Aliquots von jeweils 55 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Es erfolgte außerdem eine Kontaminationsprüfung und ein Effizienztest der hergestellten elektrokompenten *E.coli* des Stammes Top10 am darauffolgenden Tag.

2.2.1.7. Transformation

Die Transformation ermöglicht es, DNA in kompetente Bakterien einzuschleusen. Es wurden sowohl chemische Transformationen als auch Transformationen durch Elektroporation durchgeführt.

2.2.1.7.1. Chemische Transformation

Die chemische Transformation ermöglicht das Einbringen größerer DNA-Volumina in chemisch kompetente Zellen und wurde mit den Bakterienstämmen XL-10 Gold (Stratagene), Stable2 (Invitrogen), Stable3 (Invitrogen) und BL21(DE3) (Stratagene), die alle chemisch kompetent sind, durchgeführt. Hierzu wurde stets nach Herstellerprotokollen vorgegangen. Zunächst wurde die zu transformierende DNA in die chemisch kompetenten *E.coli*-Bakterien pipettiert und β-ME zur Aktivierung zugegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 25 - 45 sec je nach Bakterienstamm. Direkt im Anschluss wurde SOC-Medium zugegeben, der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert und schließlich auf Selektionsplatten ausplattiert.

2.2.1.7.2. Elektrische Transformation

Die Transformation durch Elektroporation weist eine sehr hohe Effizienz auf und ist somit eine häufig verwendete Methode. [39] Die Elektroporation wurde in speziellen 2 mm Elektroporationsküvetten der Firma BioRad durchgeführt. Hierzu wurden 1 µl der zu transformierenden DNA in 55 µl der elektrokompenten Top10 *E.coli*-Bakterien pipettiert und bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω mithilfe des „GenePulser“ (BioRad) transformiert. Sofort wurden 250 µl SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde ein bestimmtes Volumen des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten ausgestrichen oder ausplattiert.

2.2.1.8. Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte mithilfe zweier Kits von Qiagen nach den jeweiligen Herstellerangaben. Für die Isolierung kleinerer DNA-Mengen wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ eingesetzt. Für bereits etablierte Konstrukte wurde das „Endo-free Plasmid Maxi Kit“ verwendet, welches eine höhere DNA-Konzentration ermöglicht.

2.2.1.9. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen erfolgte mithilfe des „Nanodrop-1000“ nach den Angaben der Herstellerfirma Thermo.

2.2.1.10. Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Abschnitten dient der Überprüfung der Korrektheit einer bekannten Nukleotidsequenz. Die Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. [40] Die typische Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist der Tabelle 14 zu entnehmen. Die verwendeten Sequenzierprimer sind im Anhang unter A.3 aufgelistet. Sie sind 18-25 Nukleotide lang und weisen einen GC-Gehalt von mindestens 40 % und eine Schmelztemperatur von mindestens 51 °C auf. Der BigDye Premix (ABI Terminator Chemie Applied Biosystems) enthält eine AmpliTaq DNA-Polymerase, dNTPs und 2', 3'-Dideoxynukleotriphosphate (ddNTPs), die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, wodurch die Zuordnung zu den einzelnen Nukleotiden eindeutig erfolgen kann. Die eigentliche Sequenzanalyse wurde im Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts durchgeführt. Die anschließende Auswertung der Analyseergebnisse erfolgte mithilfe des Programms „BioEdit“.

Komponente	Eingesetztes Volumen/Konzentration
DNA	1 µl (150-300 ng)
Sequenzierprimer (10 µM)	0,5 µl
Big Dye	2 µl
5xABI-Puffer	1 µl
Aqua bidest	ad 10 µl

Tabelle 14: Reaktionsansatz einer Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungs-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

2 min 96 °C initiale Denaturierung	} 25 x
10 sec 96 °C Denaturierung	
10 sec 53 °C (spezifische Annealing-Temperatur) Primer-Annealing	
4 min 60 °C Elongation	

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Puffer und Medien

Puffer und Medien	Bezugsquelle bzw. Zusammensetzung
CIP-Waschpuffer	1 % Triton-X 100, 20 mM Tris (pH 7,7), 150 mM NaCl, 0,1 % SDS
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
FKS (Fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Isoton II Diluent	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
PBS (Phosphate buffered saline)	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
Zelllysispuffer	1 % Triton-X 100; 20 mM Tris (pH 7,7); 150 mM NaCl
1 % Marvel	1 % Milchpulver in PBS
100 x Penicillin / Streptomycin	10000 IE Penicillin/10000 g/ml Streptomycin; TPP/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 Na ₂ HPO ₄ ; ad. 100 ml Aqua bidest
200 mM L-Glutamin	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland

Tabelle 15: Zusammensetzung bzw. Bezugsquelle der in der Zellkultur verwendeten Puffer und Medien

2.2.2.2. Zellbiologische Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Chamberslides, Lab-Tek II	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Filter für Spritzen, 0,45µm	Whatman Schleicher & Schuell, Springfield Mill, UK
Kyroröhrchen, 2 ml	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Spritzen, Injekt, 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen UZ, Cellulose Nitrate Tubes	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Zellkulturflaschen, 75	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkulturflaschen, 150	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellschaber	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
6-Well-Plates	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
100 mm Plates	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland

Tabelle 16: Zellbiologische Verbrauchsmaterialien

2.2.2.3. Zellkultivierung

Für sämtliche durchgeführte Experimente wurde die Zelllinie HEK 293T verwendet, da diese das „SV40 large T-Antigen“ exprimiert und somit die Vermehrung episomaler Plasmide ermöglicht. [41]

HEK 293T-Zellen stammen aus dem humanen embryonalen Nierenkarzinom. Die Kultivierung dieser Zelllinie fand in 75 - oder 150 - Zellkulturflaschen statt und als Medium wurde DMEM verwendet, welches zuvor mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin und 1 x Penicillin / Streptomycin versetzt wurde. Die optimalen Wachstumsbedingungen der HEK 293T wurden bei 37 °C, 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 98 % erreicht. Die Zellen wurden regelmäßig entsprechend ihrer Konfluenz passagiert. Dazu wurde der Zellrasen zunächst mit 10 ml PBS vorsichtig gewaschen und durch Zugabe von Trypsin / EDTA vom Flaschenboden gelöst, wobei durch leichtes Klopfen der Zellkulturflasche das Ablösen erleichtert wurde. Entsprechend ihrer Wachstumsrate wurde nun ein Teil der Zellen weiterkultiviert und der Rest entweder verworfen oder für nachfolgende Versuche weiterverwendet. Dazu wurden die abgelösten Zellen zunächst für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und in 10 ml neuem Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mithilfe des Coulter Counters Z2 (Coulter Electronics) bestimmt und die Zellen in die gewünschten Zellkulturgefäße ausgesät. Für die Kultivierung im 100 mm-Format wurden 3.000.000 Zellen, für die Kultivierung im 6-Well-Format 500.000 und in Chamberslides 100.000 Zellen ausgesät.

2.2.2.4. Transfektion

Die Transfektion der HEK 293T-Zellen in 100 mm-Platten oder 6-Wells erfolgte mithilfe der Calciumphosphat-Präzipitations-Methode, sobald die Zellen eine entsprechende Zelldichte von 30-50 % erreicht hatten. Bei der Calciumphosphat-Transfektion bildet sich ein feiner Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA, welcher über Endozytose von den Zellen aufgenommen wird. [37] Die adhärent wachsenden Zellen auf den 100 mm-Platten wurden mit insgesamt 25 µg DNA transfiziert. Zunächst wurde die DNA auf ein Endvolumen von 450 µl mit A. bidest verdünnt und mit 50 µl 2,5 M Calciumchlorid versetzt und gut durchmischt. Dieser Ansatz wurde anschließend sehr vorsichtig mit kleinen Tropfen auf 500 µl 2 x HBS gegeben. Während der dreißigminütigen Inkubationszeit dieses Ansatzes wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 8 ml neuem Medium versorgt. Der Transfektionsansatz wurde auf die Zellen gegeben und diese wurden bei ihren gewohnten Bedingungen kultiviert, bis die gewünschte Expressionsstärke erreicht war. Nach ca. zehn Stunden wurde das Medium gewechselt.

Zellen im 6-Well-Format wurden mit nur 2,5 µg DNA transfiziert und von den übrigen Reagenzien wurde in der Folge nur ein Zehntel der für die 100 mm-Platten beschriebenen Menge eingesetzt.

2.2.3. Protein-Analytik

2.2.3.1. Zellyse / Proteinextraktion

Für die Analyse der HERV-K- und HIV-1-Proteine wurden die in 100 mm-Platten transfizierten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl Lysispuffer (Tabelle 15) resuspendiert. Dem Lysispuffer wurde zuvor eine Protease-Inhibitor-Tablette zugefügt, um die Degradation der lysierten Proteine zu verhindern. Durch Detergenzien im Puffer wird die Zellmembran lysiert, allerdings nicht die Kernmembran. Die Zellysate wurden in Reaktionsgefäße auf Eis überführt und für 10 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt und das Pellet, welches aus Zelltrümmern besteht, verworfen. Die so gewonnenen Zellysate wurden anschließend bei -20°C gelagert und schließlich für weitere Analysen wie Western Blot und Proteinbestimmung verwendet.

2.2.3.2. Co-Immunpräzipitation

Mithilfe von Co-Immunpräzipitationsversuchen kann die Interaktion verschiedener Proteine nachgewiesen werden. Außerdem dient die Immunpräzipitation der Anreicherung von Proteinen. Dazu wurden Zellysate mit 20-25 µl einer spezifischen Antikörper-konjugierten Sepharose versetzt und mit CIP-Puffer, der mit einer Protease-Inhibitor-Tablette versetzt war (siehe Tabelle 15), auf 1 ml aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden für 4 Stunden bei 4 °C drehend inkubiert und anschließend mithilfe des CIP-Puffers zehnmal gewaschen. Dazu wurden die Protein-Sepharose-Gemische zunächst für fünf Minuten bei 2000 rpm und 4 °C in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor zentrifugiert, sodass die Sepharose in der Spitze des Reaktionsgefäßes deutlich sichtbar wurde. Anschließend wurde jeweils 1 ml CIP-Puffer mit Protease-Inhibitor zugegeben, vorsichtig geschwenkt und erneut unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zehnmal wiederholt und das verbleibende Pellet wurde in 20 µl gelöst und bei -20 °C gelagert oder direkt für Analysen im Western Blot verwendet.

2.2.3.3. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mithilfe des „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dieses Kit beruht auf der Methode der Proteinbestimmung

nach Bradford. [42] Zusätzlich erfolgte eine densitometrische Bestimmung der Proteinmenge anhand eines BSA-Standards im coomassiegefärbten SDS-Gel.

2.2.3.4. Herstellung rekombinanter Proteine

Für eine Proteinüberexpression wurde das zu exprimierende Plasmid in *Escherichia coli*-Bakterien des Stamms BL21/DE3 transformiert, welche eine Induktion der Proteinexpression durch IPTG ermöglichen. Die DNA-Sequenz, die für die entsprechenden Proteine kodiert, wurde zuvor in einen pET16b-Vektor kloniert. Der Vektor besitzt einen 6 x His-Tag, der die spätere Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie möglich macht.

Eine Kolonie der Transformation wurde in 20 ml LB, welches mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol versetzt wurde, über Nacht schüttelnd inkubiert und am nächsten Morgen wurde die Vorkultur in 250 ml des LB-Mediums inokuliert und bis zu einer von 0,6 bei 37 °C stark schüttelnd inkubiert. Bei Erreichen dieses Wertes erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch 1mM IPTG und die Kultur wurde 4-5 h bei 37 °C inkubiert bzw. bei den Rec-Konstrukten bei Raumtemperatur über Nacht, um die Bildung von sogenannten „Inclusion Bodies“ zu verhindern. Die Kulturen wurden schließlich bei 4000 rpm bei 4 °C für 20 min zentrifugiert und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Proteinaufreinigung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.5. Native Proteinaufreinigung

Da das aufzureinigende Protein HERV-K Rec unter bestimmten Bedingungen in sogenannten „Inclusion Bodies“ eingeschlossen ist und somit nicht zugänglich gemacht werden kann, wird ein Protokoll zur Proteinaufreinigung angewendet, das sich in seinen Puffern (siehe Tabelle 17) vom Standardprotokoll zur nativen Proteinaufreinigung unterscheidet. [43]

Die Bakterien wurden in 5 ml Lysispuffer aufgeschlossen. Der Suspension wurde anschließend eine Spatelspitze Lysozym zugegeben und das Gemisch für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Ultraschallbehandlung der Suspension, wobei drei Pulse à 10 Sekunden bei 250 Watt mit jeweils 10 sekundiger Unterbrechung durch Inkubation auf Eis erfolgten. Diese Behandlung sorgt für den Aufschluss der Bakterien. Das Lysat wurde mit NaCl auf eine Endkonzentration von 2 M aufgefüllt und mit 50 µg/ml RNaseA und 50 U/ml RNase T1 für 10-15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 30 min bei 4 °C vom löslichen Protein entfernt. In der Zwischenzeit wurde 1 ml Ni-NTA-Sepharose (Qiagen) in Puffer A+ equilibriert. Der klare Bakterienüberstand wurde zu der Ni-NTA-Sepharose gegeben und für 60 min bei 4 °C langsam über Kopf geschwenkt. Anschließend wurde der Protein-Sepharose-Mix auf Leersäulen (PolyPrep Chromatography Columns, BioRad) überführt und konnte nun bei 4 °C

durchtropfen. Die Sepharose wurde nun zwei Mal mit Puffer A+ und ein Mal mit Puffer A gewaschen. Schließlich folgte die schrittweise Elution des Proteins von der Sepharose, indem Puffer A eine ansteigende Imidazol-Konzentration (250 mM, 500 mM, 1 M) zugefügt wurde. Die einzelnen Fraktionen wurden für die anschließende Analyse im SDS-Gel aufgefangen. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthalten, wurden gepoolt und für die Pull Down-Analysen gegen Puffer B und für die Immunisierung gegen PBS dialysiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde densitometrisch mithilfe einer BSA-Standardreihe am Odyssey bestimmt.

Puffer	Zusammensetzung
Lysispuffer	25 mM HEPES pH 7,5 100 mM 400 mM (200 mM NaCl 0,1 % Tween-20 2 mM β -ME 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid Protease Inhibitor Tablette (Roche)
Puffer A	50 mM Tris pH 8,0 250 mM NaCl 100 mM 400 mM (2 mM β -ME 10 mM Imidazol
Puffer A+	50 mM Tris pH 8,0 2 M NaCl 0,1 % Tween-20 100 mM 400 mM (2 mM β -ME 10 mM Imidazol
Puffer B	40 mM Tris pH 8,0 200 mM NaCl 100 mM 400 mM (2 mM β -ME

Tabelle 17: Puffer der Proteinaufreinigung und ihre Zusammensetzung

2.2.3.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient dazu, Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts elektrophoretisch aufzutrennen. [44] Die Porengröße des Gels wird durch die Acrylamidkonzentration bestimmt. Das Acrylamid polymerisiert in Gegenwart von freien Radikalen zu langen Ketten, die durch Bisacrylamid zusätzlich quervernetzt werden. Zum Starten der Polymerisierung und zur Stabilisierung der Radikale werden Ammonium-Persulfat (APS) und N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED,

Sigma) zugegeben. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteine zunächst denaturiert. Dazu wurden zuerst die kovalenten Schwefelbrücken mithilfe von β -ME aufgespalten, dann wurden nicht-kovalente Bindungen durch SDS gespalten. Die Proben wurden hierzu mit 2 x Laemmli-Puffer (BioRad), dem 5 % β -ME zugegeben werden, versetzt und anschließend für 5-10 min auf 75°C - 95°C erhitzt. Durch das SDS, welches negativ geladen ist, wird die Eigenladung der Proteine überdeckt. Dies ist notwendig, da ansonsten negativ geladene Proteine schneller zur Anode wandern würden. Wird die Eigenladung aber überdeckt, wird das Wanderverhalten im Gel lediglich durch das Molekulargewicht der Proteine bestimmt.

Es handelt sich bei der SDS-PAGE um ein diskontinuierliches Puffersystem, da es aus Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten, Puffersalzen und Acrylamidkonzentrationen besteht. Ganz oben in der Versuchsanordnung befindet sich ein Puffer-Reservoir, gefolgt von einem 5 prozentigem Sammelgel. Die Proteine wandern zunächst in das Sammelgel, wo sie fokussiert werden und anschließend alle gleichzeitig in das 10-15 prozentige Trenngel einwandern, wo die eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgt. Die Prozentigkeit des Trenngels ist abhängig vom erwarteten Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine. Bei kleineren Proteinen ist eine höhere Acrylamid-Konzentration zu wählen, da durch die kleinere Porengröße das Wanderverhalten der Proteine verlangsamt wird.

Als Größenstandard wurde der „PageRuler Prestained Protein Ladder“ von Fermentas eingesetzt. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von zunächst 100 Volt für 10 min und dann 180 Volt für weitere 30-40 min wandern die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung zum positiven Pol. Dabei wandern kleine Proteine schneller, da sie leichter durch die Poren des Gels gelangen können als große Proteine. Die Gele konnten nun mittels Coomassie Colloidal Blau (Sigma) gefärbt oder für den Western Blot verwendet werden. .

2.2.7.7. Coomassie-Färbung

Die Färbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie Colloidal Blau (Sigma) erfolgte nach Herstellerangaben. Diese Methode wurde vor allem dazu benutzt, um die Konzentration von aufgereinigten Proteinen zu bestimmen. Hierzu wurde auf dem Gel zusätzlich zur Proteinprobe eine BSA-Standardreihe aufgetragen. Die coomassiegefärbten Gele wurden am Odyssey (LI-COR) eingescannt und ausgewertet.

2.2.3.8. Western Blot

Die Methode des Western Blots ermöglicht eine Übertragung von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran. Hier werden die Proteine dann zugänglich für den spezifischen Nachweis durch konjugierte Antikörper.

Die verwendeten Puffer und Reagenzien sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet:

Puffer und Reagenzien	Zusammensetzung und Hersteller
Acrylamid	Rotiphorese 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
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 % β -Mercaptoethanol (BioRad, Hercules, California, USA)
PBS/Tween 0,1 %	0,1 % Tween 20 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in PBS
Stripping Puffer	62,5 mM Tris pH 6,7; 100 mM β -ME; 2 % SDS
TEMED	BioRad, Hercules, California, USA

Tabelle 18: Puffer und Reagenzien, die für SDS-PAGE und Western Blot eingesetzt wurden

Zunächst wurde das Polyacrylamidgel für mindestens 20 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Die Trägermembran, eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran (Sigma) wurde für 2 min mit Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer überführt. Für jedes Gel wurden zwei Filterpapiere in der Größe des Gels vorbereitet und ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Es folgte das Blotting, also das Überführen der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran nach dem Semi-Dry-Blotting Verfahren. Hierzu wurde ein Sandwich in der Blottingapparatur aufgebaut, in dem sich zwischen zwei Filterpapieren das Gel auf der Membran befindet. Die Apparatur wurde nun an das Netzgerät angeschlossen und es wurde bei 20 Volt für 35 min geblottet. Anschließend wurden die Filterpapiere und das Gel verworfen und die Membran für eine Stunde in Blockierungspuffer geschwenkt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Danach wurde der erste Antikörper in entsprechender Verdünnung in Blockierungspuffer zugegeben und die Membran über Nacht bei 4 °C drehend inkubiert. War der erste Antikörper nicht mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert und somit kein direkter Nachweis möglich,

so musste, nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS Tween 0,1 % für jeweils fünf Minuten, ein zweiter HRP-konjugierter Antikörper verdünnt in Blockierungspuffer auf die Membran gegeben werden. Dieser wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende dieser Inkubationszeit wurde die Membran nochmals drei Mal mit PBS Tween 0,1 % gewaschen. Die Detektion des mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten Antikörpers erfolgte mit Hilfe der Substratlösung „Super Signal West Dura Extended Duration Substrate“ (Pierce). Hierbei wurden die Proteinbanden durch Schwärzung auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.2.3.9. Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung dient dazu, entsprechende Antigene in der Zelle mithilfe von spezifischen Antikörpern unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop sichtbar zu machen. Dazu wurden zunächst adhärent wachsende Zellen in 6-Well- oder Chamberslides ausgesät und transfiziert. Ca. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen vorsichtig gewaschen und mit 800 µl 2 %igem Paraformaldehyd in PBS für mindestens 30 Minuten bei 37 °C fixiert. Für die Stressversuche wurden die Zellen vor der Fixierung für eine Stunde mit 0,5 mM Natriumarsenit behandelt. Anschließend wurden sowohl die gestressten als auch die ungestressten Zellen drei Mal mit je einem Milliliter PBS gewaschen. Handelte es sich bei den Versuchen um intrazelluläre Antigene, so wurden die Zellen mit 800 µl 0,5 %igem Triton für 15 min permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen und es wurden unspezifische Proteinbindungen mit 1 % Marvel (siehe Tabelle 15) für 15-20 min blockiert. Zum Nachweis der Antigene wurden die spezifischen Antikörper in der entsprechenden Verdünnung auf die Zellen gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Waren diese Antikörper nicht direkt konjugiert, musste nach dreimaligem Waschen mit PBS ein sekundärer, fluoreszenzmarkierter Antikörper zugegeben werden, der an den primären Antikörper bindet und somit den Nachweis der Antigene ermöglicht. Die Inkubation der sekundären Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Die weiteren Arbeiten erfolgten möglichst lichtgeschützt, da die Antikörper lichtsensitiv sind und die Gefahr des Ausbleichens besteht. Die Zellen wurden nochmals drei Mal mit PBS gewaschen. Bei Bedarf wurden die Zellkerne mit Hoechst gegengefärbt und schließlich mit Moviol in einem Deckgläschen eingebettet. Die fertigen Präparate wurden lichtgeschützt bei 4 °C gelagert und nach dem Aushärten des Moviols unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop cLSM 780 (Zeiss) untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Proteinaufreinigung von HERV-K oricoRec, oricoRec Δ NES und Staufen-1

Bisherige Untersuchungen zur Interaktion des HERV-K Rec Proteins mit dem Staufen-1-Protein wurden dadurch erschwert, dass für keines der beiden Proteine funktionierende Antikörper vorhanden sind. Die für die Proteinaufreinigung verwendeten Konstrukte oricoRec, oricoRec Δ NES und Staufen-1 lagen bereits in einem pET16b-Vektor vor, der einen 6 x His-Tag besitzt und somit die Aufreinigung mittels einer Affinitätschromatographie ermöglicht. Bei dem oricoRec Δ NES handelt es sich um eine Deletionsmutante des oricoRec, die keine Kernlokalisationssequenz NES besitzt und somit etwa um die Hälfte verkürzt ist. Dies erhöht die Chance auf eine erfolgreiche Aufreinigung des Proteins, beeinträchtigt jedoch nicht eine spätere Antikörpergenerierung. Alle Konstrukte weisen außerdem einen V5-Tag auf, der den spezifischen Nachweis im Western Blot ermöglicht. Es sollte im Rahmen dieser Bachelorarbeit die Vorarbeit für eine Antikörpergenerierung gegen diese Proteine geleistet werden, indem die Proteine in Bakterien exprimiert und anschließend aufgereinigt werden.

3.1.1. Proteinüberexpression von Staufen-1, HERV-K oricoRec und oricoRec Δ NES

Es wurde für die Proteinüberexpression ein doppelter Ansatz für jedes der drei zu exprimierenden Proteine gemacht und eine Probe vor und nach der Induktion der Proteinexpression durch IPTG genommen. Diese Proben wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Brillant-Blue angefärbt um zu überprüfen, ob die Bakterien die gewünschten Proteine exprimieren. Die gefärbten SDS-Gele sind in Abbildung 9 dargestellt.

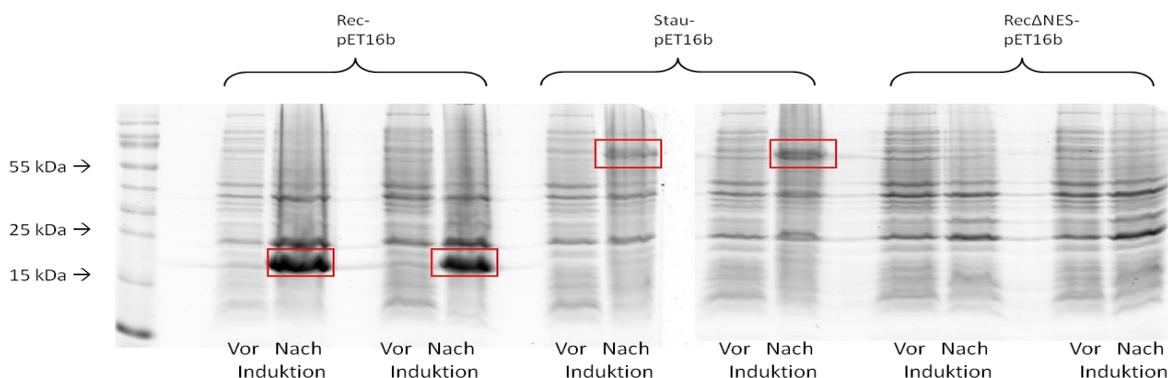


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt die coomassiegefärbten Gele der SDS-PAGE. Es sind jeweils die Proben vor und nach der Induktion durch IPTG nebeneinander aufgetragen. Die roten Rechtecke zeigen die induktionsbedingten Änderungen in der Proteinexpression an.

Bei den beiden oricoRec-pET16b- und den Staufen-1-pET16b-Ansätzen ist zu erkennen, dass das Bandenmuster nach der Induktion durch IPTG im Gegensatz zur Probe vor der Induktion verändert ist und somit die Proteinexpression angeregt werden konnte. Bei den Rec-pET16b-Proben sind sehr starke Banden zwischen den Marker-Banden für 15 kDa und 25 kDa zu erkennen. Die Staufen-pET16b-Proben zeigen nach der Induktion die Expression eines Proteins, welches ca. 55 kDa groß ist. Das Bandenmuster der Rec Δ NES-Proben vor und nach der Induktion zeigt ein weitgehend identisches Bandenmuster für beide Ansätze.

3.1.2. Proteinaufreinigung von Staufen-1, HERV-K oricoRec und oricoRec Δ NES

Nach erfolgter Proteinaufreinigung wurde der Erfolg der Aufreinigung erneut im SDS-Gel überprüft und die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthalten, vereint gegen PBS dialysiert. Bei der Staufen-1-Aufreinigung wurde die erste und dritte Fraktion vereint und die dritte Fraktion einzeln dialysiert. Die Analyse der Staufen-1-Aufreinigung ist der Abbildung 10 zu entnehmen.

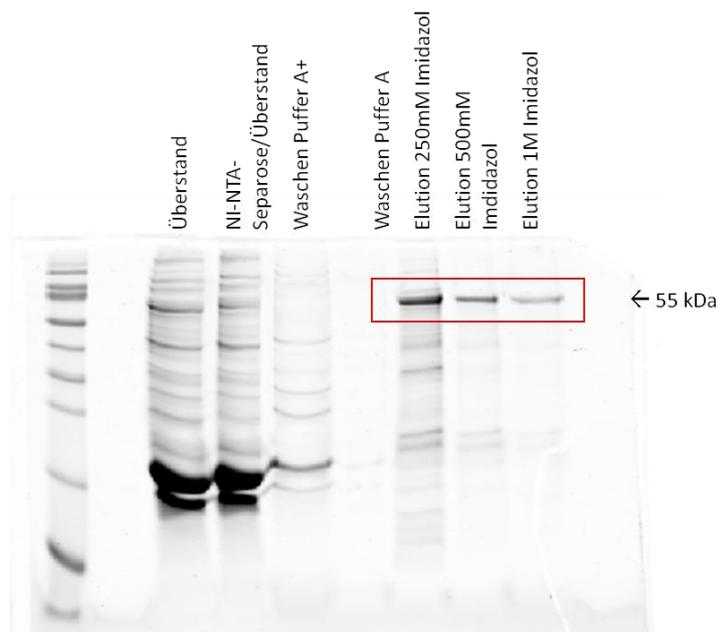


Abbildung 10: Die Abbildung zeigt ein coomassiegefärbtes SDS-Gel der schrittweisen Elution des exprimierten Proteins mithilfe einer ansteigenden Imidazol-Konzentration. Mit einem roten Quadrat markiert ist das eluierte Protein, was mit einem Molekulargewicht von 55 kDa der Größe des Staufen-1 Proteins entspricht.

Es sind der Reihe nach die verschiedenen Wasch- und Elutionsschritte aufgetragen. Hierbei ist zu sehen, dass im Überstand und im ersten Säulenschritt, wo der Überstand zusammen mit der Ni-NTA-Sepharose auf die Leersäulen gegeben wurde, ein sehr diffuses Bandenmuster zu sehen ist. Beim Waschen der Ni-NTA-Sepharose mit Puffer A+ und Puffer A werden die

verschiedenen Proteine, die keinen 6 x His-Tag besitzen allmählich ausgewaschen. Bei den drei anschließenden Elutionsschritten, bei dem Puffer A Imidazol in aufsteigender Konzentration von 250 mM über 500 mM bis zu 1 M zugegeben wird, ist ein Protein zu erkennen, welches der gesuchten Größe des Staufen-1 Proteins von 55 kDa entspricht. Die Stärke der Bande des eluierten Proteins nimmt dabei mit aufsteigender Imidazolkonzentration ab und die Reinheit des Proteins nimmt zu, was daran zu erkennen ist, dass keine weiteren Banden bei den letzten beiden Elutionsschritten zu erkennen sind.

Um sicherzugehen, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um Staufen-1 handelt und nicht um ein anderes Protein mit derselben Größe, wurden die Proben zusätzlich im Western Blot analysiert. Hierbei wurde die Membran mit einem α V5-Antikörper, der spezifisch an den V5-Tag des Staufen-1 binden soll, inkubiert und über einen zweiten HRP-konjugierten Antikörper nachgewiesen. Das Ergebnis dieses Western Blots ist der Abbildung 11 zu entnehmen. Hier konnte das Staufen-1-Protein anhand des V5-Tags mit einem Molekulargewicht von 55 kDa spezifisch durch einen α V5-Antikörper nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten bei den Proben des Überstands, des ersten Waschschriffs und des ersten Elutionsschritts Doppelbanden mit einem Molekulargewicht von ca. 15 kDa detektiert werden, wobei es sich vermutlich um ein c-terminales Degradationsprodukt des Staufen-1 handelt.

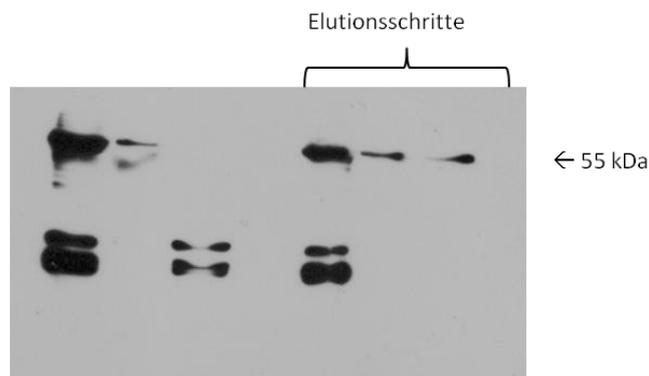


Abbildung 11: Die Abbildung zeigt einen Western Blot zur Überprüfung des aufgereinigten Proteins. Die Proben wurden analog zum Coomassie-Gel aufgetragen. Die Membranen wurden mit einem α V5-Antikörper inkubiert und anschließend durch den sekundären HRP-konjugierten Antikörper nachgewiesen.

Für das Volllängen-oricoRec war eine Aufreinigung leider nicht erfolgreich. Die Gründe, die dafür verantwortlich sein können, werden in der Diskussion erörtert. Allerdings konnten für die Rec-Mutante oricoRec Δ NES, bei der zunächst keine Expression zu erkennen war, Banden auf der richtigen Höhe von etwa 14 kDa durch die SDS-Page (siehe Abbildung 12) nachgewiesen werden.

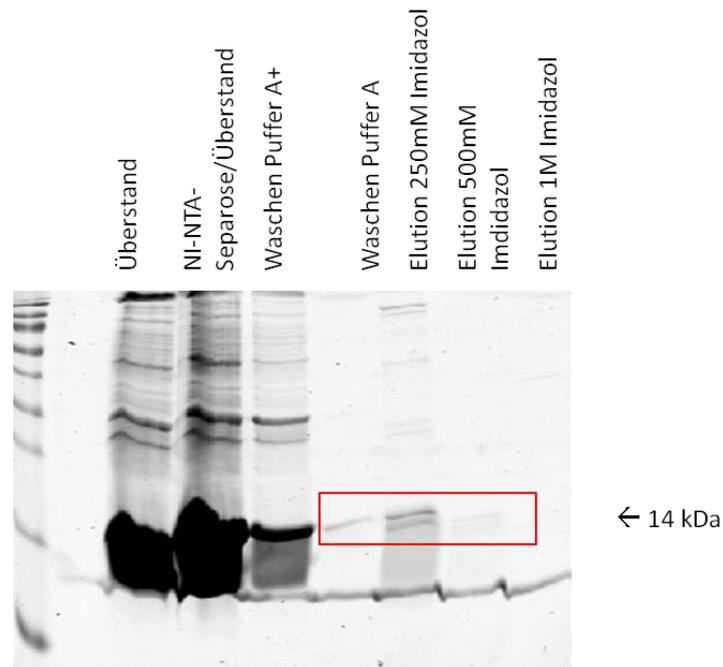


Abbildung 12: Die Abbildung zeigt ein coomassiegefärbtes SDS-Gel der schrittweisen Elution des exprimierten Proteins oricoRec Δ NES mithilfe einer ansteigenden Imidazol-Konzentration. Mit einem roten Quadrat markiert ist das eluierte Protein, was mit einem Molekulargewicht von 14 kDa der Größe des oricoRec Δ NES Proteins entspricht.

Die zum Staufen-1-Protein analoge Überprüfung des aufgereinigten Proteins auf einen V5-Tag fiel leider negativ aus und wird hier deshalb nicht dargestellt. Die Gründe hierfür werden im Kapitel 4.1. erörtert.

3.1.3. Bestimmung der aufgereinigten Proteinmenge

Im Anschluss an die Dialyse wurde das aufgereinigte Protein zusammen mit einer BSA-Standardreihe aufgetragen, was der Abbildung 13 zu entnehmen ist. Es wurde mithilfe des Odyssey-Scanners von LI-COR eine densitometrische Bestimmung der Proteinmenge des Staufen-1-Proteins durchgeführt.

Die densitometrische Bestimmung der Proteinmenge ergab einen Wert von 34 ng / μ l für die 1. + 2. Fraktion und einen Wert von 11,7 ng / μ l für die 3. Fraktion der Aufreinigung.

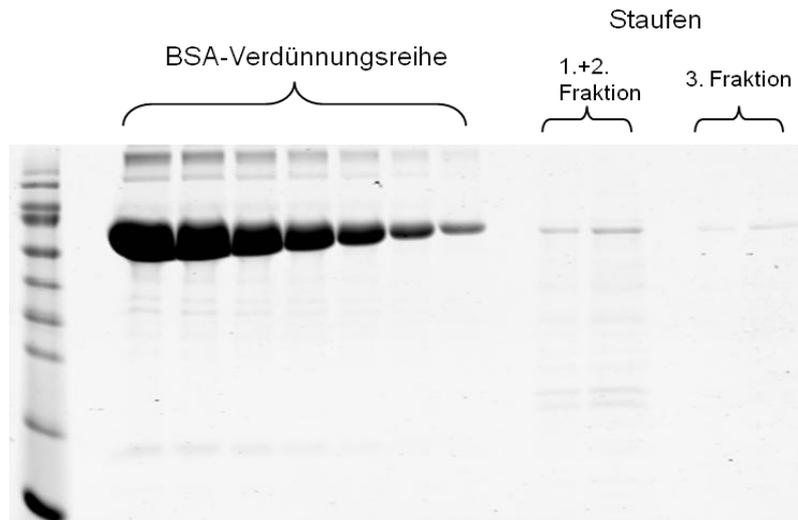


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt das coomassiegefärbte Gel der Proteinmengenbestimmung. Die Bestimmung der Proteinmenge wurde densitometrisch durchgeführt und als Referenz wurde eine BSA-Standardreihe aufgetragen. Es wurden je 20 µl folgender Konzentrationen aufgetragen: 2000 µg / ml, 1500 µg / ml, 1000 µg / ml, 750 µg / ml, 500 µg / ml, 250 µg / ml und 125 µg / ml. Es wurden für die beiden Dialysefraktionen jeweils zwei verschiedene Volumina (10 µl und 20 µl) aufgetragen und daraus bei der Bestimmung der Proteinmenge der Mittelwert errechnet.

Analog wurde eine Bestimmung der Proteinmenge für das oricoRecΔNES durchgeführt. Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Abbildung 14 dargestellt. Es ergab sich hierbei ein Wert von 4,9 ng/µl für die zweite, reinere Bande.

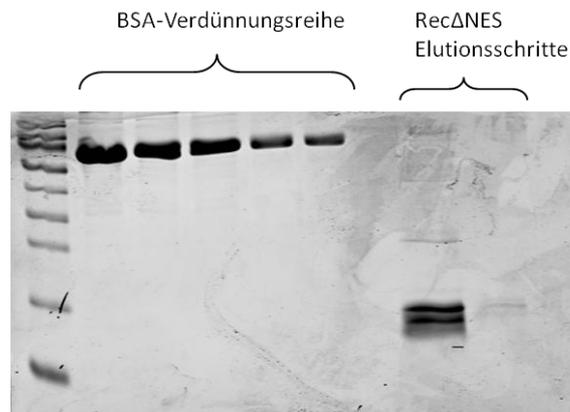


Abbildung 14: Die Abbildung zeigt das coomassiegefärbte Gel der Proteinmengenbestimmung. Die Bestimmung der Proteinmenge wurde densitometrisch durchgeführt und als Referenz eine BSA-Standardreihe aufgetragen. Es wurden je 20 µl folgender Konzentrationen aufgetragen: 1000 µg / ml, 750 µg / ml, 500 µg / ml, 250 µg / ml und 125 µg / ml. Es wurden zwei verschiedene Elutionsschritte aufgetragen.

3.2. Untersuchungen zur Interaktion zwischen HIV-1 coRev und Staufen-1

Es konnte bereits mithilfe von Immunfluoreszenz- und Co-Immunpräzipitationsversuchen gezeigt werden, dass HERV-K oricoRec und Staufen-1 miteinander interagieren (Dr. Kirsten Hanke, Dissertation). Es sollte nun im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob dies auch auf das HIV-1 Rev zutrifft. Es wurden hierzu zunächst Co-Immunpräzipitationen durchgeführt und die Ergebnisse anschließend mittels Immunfluoreszenzexperimenten bestätigt. Für die Versuche wurde ein codonoptimiertes HIV-1 Rev (HIV-1 coRev) und HIV-1 Gag (HIV-1 coGag) eingesetzt, um eine ausreichende Expression der Proteine zu gewährleisten.

3.2.1. Co-Immunpräzipitation von HIV-1 coRev und Staufen-1

Um eine Interaktion von HIV-1 coRev und Staufen-1 mithilfe einer Co-Immunpräzipitation nachzuweisen, wurden HEK 293T-Zellen mit HIV-1 coRev-V5 und Staufen-1-Flag transfiziert und die Zelllysate mit einer α V5-Sepharose aus der Maus inkubiert. Der Nachweis des Staufen-1 erfolgte über einen α Flag-Antikörper aus dem Kaninchen, der Nachweis des HIV coRev-V5 mittels eines α V5-Antikörpers aus der Ziege. Als Positivkontrolle wurden Zelllysate untersucht, die mit Staufen-1-Flag und HIV coGag-V5, welches bekanntermaßen mit Staufen-1 interagiert, transfiziert waren. [29] Die Negativkontrolle enthält nur Staufen-1-Flag und darf somit nicht von der α V5-Sepharose gebunden werden.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist der Abbildung 15 zu entnehmen. Sie zeigt, dass bei der Positivkontrolle in Spur 2 wie erwartet bei der Immunpräzipitation Staufen-1 auf einer Höhe von 55 kDa spezifisch nachgewiesen werden kann. Ebenso kann Staufen-1 bei der Probe in der ersten Spur, die HIV coRev-V5 und Staufen-1-Flag enthält, spezifisch über den α Flag-Antikörper auf einer Höhe von 55 kDa nachgewiesen werden, wobei diese Bande etwas schwächer als die der Positivkontrolle ausfällt. Es handelt sich hierbei um eine spezifische Interaktion des Staufen-1-Flag mit dem HIV coRev-V5. Die Negativkontrolle, die in Spur 3 dargestellt ist und nur Staufen-1-Flag enthält, welches nicht an die Sepharose bindet, zeigt nur eine kaum zu erkennende Bande für das Staufen-1.

Der Nachweis durch den α V5-Antikörper zeigt eine spezifische Bande für das HIV-1 Protein coRev auf der Höhe von 14,5 kDa und mehrere Banden für coGag-V5. Außerdem sind bei allen drei Proben Banden auf der Höhe von 55 kDa und 26 kDa zu sehen, die alle in etwa die gleiche Bandenstärke aufweisen. Dabei handelt es sich um die antikörperspezifischen IgG-Banden des Primärantikörpers, die durch den sekundären Antikörper mitdetektiert werden. Diese Banden zeigen aufgrund ihrer vergleichbaren Intensivität, dass in jeder Spur in etwa die

gleiche Menge an Probe aufgetragen wurde. Der Nachweis durch einen α Flag-Antikörper, der auf die Lysate aufgetragen wurde, zeigt bei allen drei Proben nahezu gleich starke Banden auf der Höhe von 55 kDa. Diese Probe dient als Nachweis dafür, dass in allen Proben nahezu die gleiche Menge Staufen-1 eingesetzt wurde.

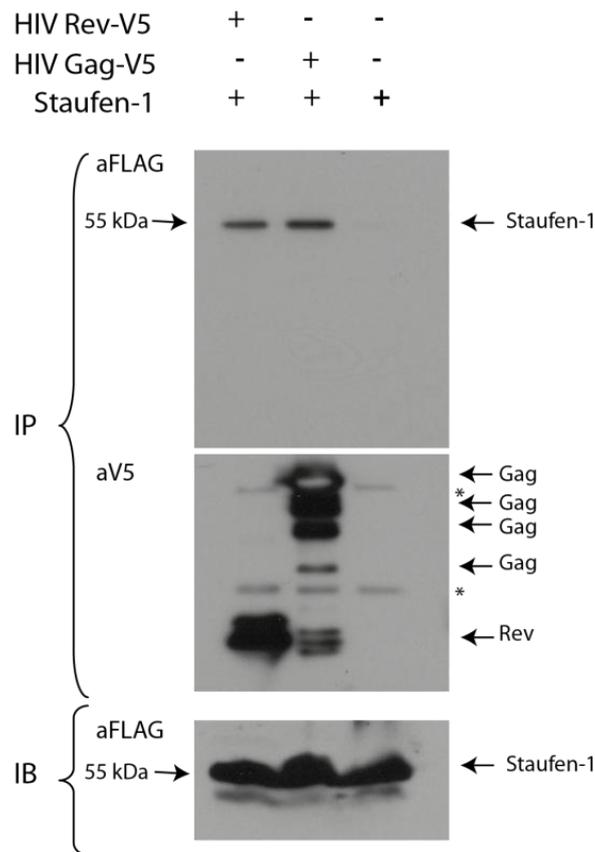


Abbildung 15: Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Co-Immunpräzipitation von HIV coRev-V5 und Staufen-1-Flag. Als Positivkontrolle wurde eine Co-Immunpräzipitation von HIV coGag-V5 und Staufen-1 durchgeführt (Spur 2). Die Negativkontrolle enthält nur Staufen-1 (Spur 3). Im oberen Bereich der Abbildung sind die Immunpräzipitationen (IP) dargestellt, wobei die Proben jeweils mit einem α V5- und einem α Flag-Antikörper inkubiert wurden. Im unteren Bereich der Abbildung sind die Lysate (IB=Immunoblot) dargestellt, welche mit einem α Flag-Antikörper nachgewiesen wurden.

3.2.2. Bestätigung der Interaktion durch Immunfluoreszenz-Versuche

Die in den Co-Immunpräzipitationsversuchen gezeigte Interaktion von HIV-1 coRev und Staufen-1 sollte nun in Immunfluoreszenzversuchen bestätigt werden. Dazu wurden HEK 293T-Zellen mit HIV-1 coRev-pEGFP, Staufen-1-Cherry und HIV-1 coGag-V5 transfiziert. Es wurde außerdem Plasmid zur Produktion viraler Vollängen-RNA cotransfiziert, da bekannt ist, dass diese Einfluss auf HIV-1 Rev hat, indem Rev erst durch Bindung an seine

Ziel-RNA seine Konformation ändert und ins Cytoplasma wandert. Dieses Plasmid stellt eine Mischung von HIV und SIV dar und wird als „SHIV“ bezeichnet. Es folgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem α V5-Antikörper, der durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper nachgewiesen werden konnte. Die Proben wurden unter dem cLSM780 untersucht. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 16 dargestellt.

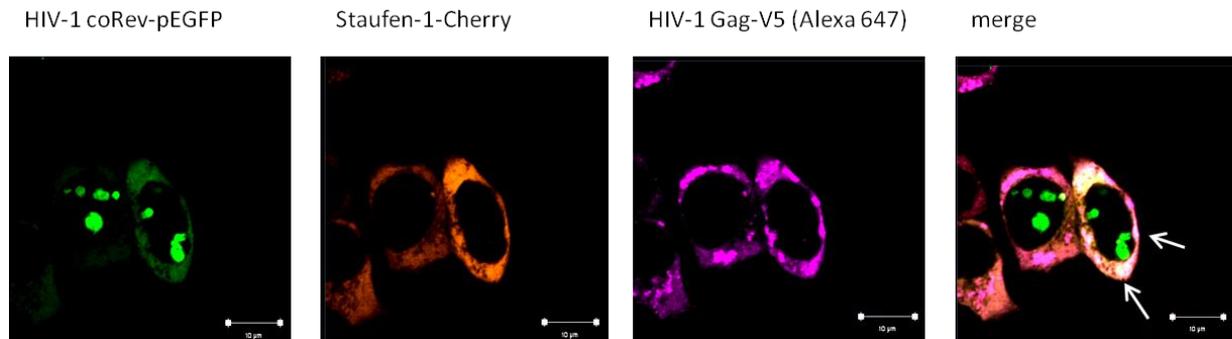


Abbildung 16: HEK 293T-Zellen wurden mit HIV-1 coRev-pEGFP, Staufen-1-Cherry, HIV-1 coGag-V5 und SHIV-Luzi transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und mit einem α V5-Antikörper aus der Maus inkubiert. Die Fluoreszenzmarkierung des primären Antikörpers fand mithilfe von Alexa647 statt, der spezifisch gegen den Maus-AK gerichtet ist. Die Detektion erfolgte mittels cLSM780. Die weißen Pfeile zeigen Orte der Colokalisation von Staufen-1 mit coRev bzw. coGag an.

Das HIV-1 coRev-pEGFP ist hierbei vor allem im Zellkern und den Nukleoli lokalisiert und es konnte nur ein sehr schwaches und diffuses cytoplasmatisches pEGFP-Signal detektiert werden. Das Staufen-1-Cherry befindet sich ausschließlich im Cytoplasma, wo es gleichmäßig verteilt vorliegt. Außerdem gibt es einige Orte, an denen es zu einer Akkumulation von Staufen-1 kommt.

Das HIV-1 coGag-V5 konnte ausschließlich im Zytoplasma detektiert werden. Auch hier konnten einige stärker konzentrierte Punkte nachgewiesen werden, die sich vom übrigen, diffusen zytoplasmatischen Signal abheben. Es sind einige Stellen zu erkennen, an denen es zu einer Colokalisation von Staufen-1-Cherry und HIV-1 coRev-pEGFP bzw. HIV-1 coGag-V5 kam. Die Interaktion zwischen Staufen-1 und coGag stellt ebenso wie bei der Co-Immunpräzipitation die Positivkontrolle dar.

3.3. Stressgranula

Stressgranula sind cytoplasmatische Orte des mRNA-Silencing und werden immer dann in der Zelle gebildet, wenn die Translation der mRNAs zweitrangig ist. Es ist daher interessant zu zeigen, welche Proteine mit den Stressgranula assoziiert sind und zu verstehen, inwiefern

Stressgranula auf die Funktion der viralen RNA Einfluss nehmen können. Es ist möglich, dass die Bildung von Stressgranula einen antiviralen Wirtsmechanismus darstellt. Es gibt verschiedene Publikationen, die darauf hindeuten, dass das RNA-bindende Wirtsprotein Staufen-1 unter Stressbedingungen in Stressgranula einwandert. [28]

Das RNA-bindende Protein TIA-1 kann bei Untersuchungen zu Stressgranula als Markerprotein eingesetzt werden, da dieses bei Stressbedingungen mit sich selbst interagiert und somit maßgeblich zur Bildung der Stressgranula beiträgt. Die Bildung der Stressgranula wurde durch die Inkubation der 24 Stunden zuvor transfizierten Zellen mit 0,5 mM Natriumarsenit induziert. Es wurden für die Versuche HEK 293T-Zellen mit coRev-V5, Staufen-1-Cherry, TIA-YFP und SHIV transfiziert, nach 24 Stunden für eine Stunde mit Natriumarsenit gestresst und anschließend für die Immunfluoreszenz gefärbt. Das Ergebnis dieses Versuchs ist der Abbildung 17 zu entnehmen.

Die obere Reihe zeigt den Grundzustand in der Zelle, die keinem Zellstress ausgesetzt wurde. Hierbei wurde ein TIA-YFP-Signal detektiert, dass sich sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma passiv und gleichmäßig verteilt ohne Bereiche höherer Konzentration aufzuweisen. Staufen-1 und coRev weisen ein diffuses cytoplasmatisches Signal auf.

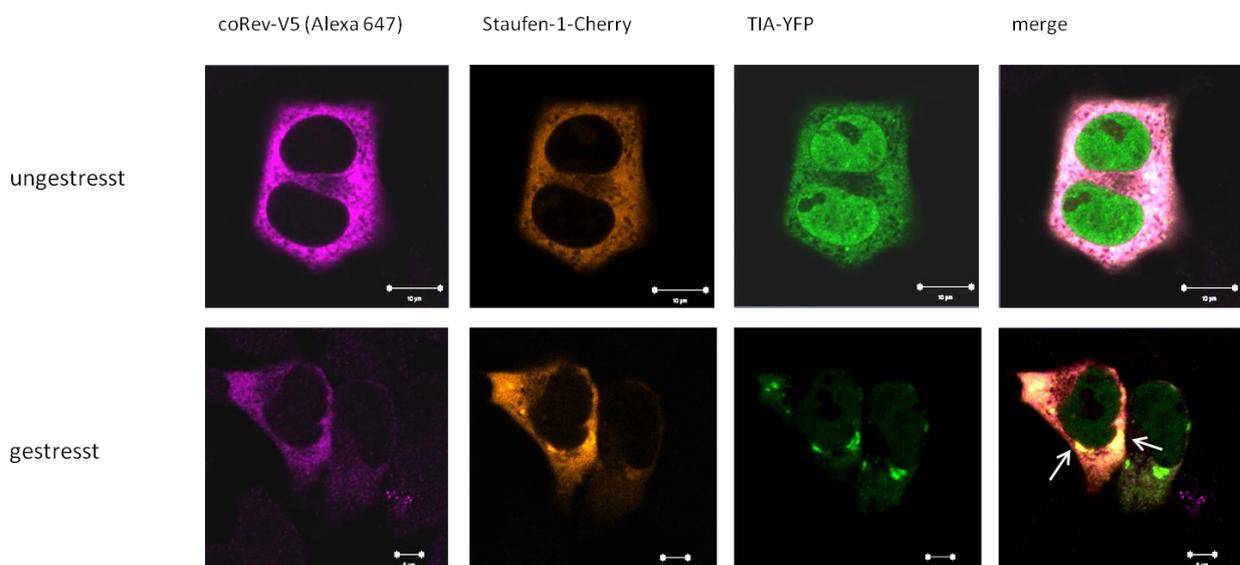


Abbildung 17: HEK 293T-Zellen wurden mit HIV-1 coRev-V5, Staufen-1-Cherry, TIA-1-YFP und SHIV-Luzi transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gegebenenfalls mit Natriumarsenit gestresst, fixiert und mit einem α V5-Antikörper aus dem Kaninchen inkubiert. Die Fluoreszenzmarkierung des primären Antikörpers fand mithilfe von Alexa647 statt, der spezifisch gegen den Kaninchen-AK gerichtet ist. Die Detektion erfolgte mittels cLSM780. Die weißen Pfeile zeigen Orte der Colokalisation von Staufen-1 mit TIA-YFP an.

In der unteren Reihe sind Zellen dargestellt, die mit Natriumarsenit behandelt wurden und sich somit in einem sogenannten ER-Stress befinden. Die Verteilung der verschiedenen Proteine unterscheidet sich deutlich vom Grundzustand der Zelle. Es kommt zu Bereichen einer deutlichen TIA-1-Anreicherung im Cytosol, die die Stressgranula markieren. Staufen-1 ist ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert und weist dort ein diffuses Signal auf, akkumuliert jedoch auch im Bereich der Stressgranula. Die beiden Proteine liegen hier in Colokalisation zueinander vor. Diese Colokalisation kann für das coRev-Protein nur in einem sehr schwachen Ausmaß gezeigt werden. Das coRev zeigt ein gleichmäßiges, diffuses Signal über das Cytoplasma verteilt und es gibt nur wenige Punkte einer höheren Konzentration.

3.4. Colokalisation von HIV-1 coRev mit HMM A3G

In aktivierten, d.h. gestressten Zellen, bildet sich häufig HMM-A3G Granula. Wissenschaftler konnten nachweisen, dass Staufen eines der dominierenden Proteine in diesen Granula darstellt. Da A3G dafür bekannt ist, endogene Retroelemente in ihrer Replikation zu hemmen, war es eine logische Fragestellung zu prüfen, ob auch Retroviren, sowohl endogene als auch exogene, dadurch in ihrem Replikationszyklus gestört werden. Für die humanen endogenen Retroviren ist noch nicht bekannt, warum sie nicht replizieren können. Es wäre möglich, dass der Wirt eine erfolgreiche Replikation verhindert, indem HMM-A3G-Granula gebildet werden. Zumindest konnte bereits nachgewiesen werden, dass HERV-K Rec in räumlicher Nähe zu HMM-A3G vorliegt. In den durchgeführten Versuchen sollte nun überprüft werden, ob dies auch für HIV-1 Rev zutrifft. Da aber das HIV erfolgreich replizieren kann, ist es durchaus möglich, dass sich HIV-1 einer Restriktion durch HMM-A3G entziehen kann.

Es sollte nun untersucht werden, ob coRev auch in räumlicher Nähe zu HMM A3G und Staufen-1 vorliegen. Dazu wurden die Zellen mit HIV-1 coRev-V5, Staufen-1-Cherry, A3G-Cyan und SHIV transfiziert, gegebenenfalls gestresst, für die Immunfluoreszenz gefärbt und unter dem cLSM untersucht.

Bei den ungestressten Zellen, die das Verhalten der Zellen im Grundzustand zeigen (siehe Abbildung 18) sieht die Verteilung der verschiedenen Proteine über die Zelle für die coRev-Proben sehr ähnlich aus wie bei den oricoRec-Proben (nicht dargestellt, siehe Dr. Kirsten Hanke, Dissertation). HIV-1 coRev zeigt ein diffuses cytoplasmatisches Signal und konzentrierte Punkte im Zellkern. Staufen-1-Cherry lässt sich ausschließlich cytoplasmatisch detektieren und zeigt dabei ein diffuses Signal, ebenso wie A3G-Cyan.

Wurden die Zellen nun in einen metabolischen Stresszustand versetzt, so konnte bei den oricoRec-Versuchen eine deutliche Colokalisation von HMM A3G, Staufen-1 und oricoRec festgestellt werden. Bei den analog dazu durchgeführten Versuchen mit HIV-1 coRev konnte dies nicht nachgewiesen werden. A3G-Cyan bildete zwar hier auch Akkumulationen im Cytoplasma, coRev akkumulierte jedoch nicht in diesen Punkten, sondern zeigte ein diffuses cytoplasmatisches Signal. Staufen-1-Cherry liegt in einigen Punkten in Colokalisation zu A3G-Cyan vor.

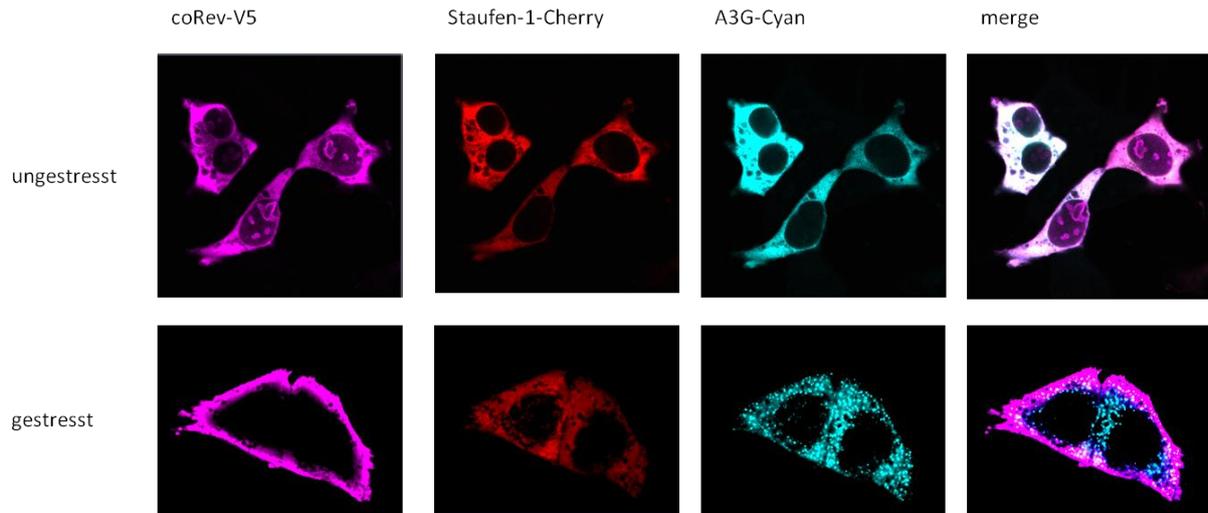


Abbildung 18: HEK 293T-Zellen wurden mit HIV-1 coRev-V5, Staufen-1-Cherry, A3G-Cyan und SHIV-Luzi transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gegebenenfalls mit Natriumarsenit gestresst, anschließend fixiert und mit einem α V5-Antikörper aus dem Kaninchen inkubiert. Die Fluoreszenzmarkierung des primären Antikörpers fand mithilfe von Alexa647 statt, der spezifisch gegen den Kaninchen-AK gerichtet ist. Die Detektion erfolgte mittels cLSM780.

4. Diskussion

4.1. Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung der Proteine Staufen-1, oricoRec und oricoRec Δ NES sollte die Vorarbeit für eine Antikörpergenerierung gegen diese Proteine darstellen und konnte zumindest für das Staufen-1 erfolgreich realisiert werden, da Staufen-1 im Western Blot spezifisch durch einen α V5-Antikörper nachgewiesen werden konnte. Im Western Blot zeigten sich allerdings bei einigen Fraktionen weitere Banden, die eine Größe von etwa 15 kDa aufweisen und Doppelbanden bilden. Diese Fragmente ließen sich spezifisch über einen V5-Tag nachweisen, weshalb es sich vermutlich um c-terminales Degradationsprodukt des Staufen-1 Proteins handelt. Für His-Tag abhängige Pull-Down Folgeexperimente, die natives Volllängen-Staufen-1 benötigen, kann die dritte Elutionsfraktion verwendet werden, die kein degradiertes Protein enthält. Für die Antikörpergenerierung wird gegen Volllängen-Staufen-1 immunisiert. Eine Aufreinigung des HERV-K oricoRec war leider nicht möglich, obwohl eine starke Expression des Proteins gezeigt werden konnte. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass Rec in sogenannten „Inclusion Bodies“ eingeschlossen wurde, wodurch der 6 x His-Tag des oricoRec-pET16b nicht mehr für die Ni-NTA-Sepharose zugänglich war. [43] Dies geschieht dadurch, dass die retroviralen Transportproteine häufig sehr hydrophobe Eigenschaften aufweisen, wenn Sie nicht als Polymere an ihrer Ziel-RNA gebunden vorliegen. [43] Aus diesem Grund wurden die Pufferbedingungen bei der Aufreinigung bereits so angepasst, dass Rec nicht sofort aggregiert und nicht mehr aufgereinigt werden kann. Offenbar sind diese von Daugherty et al. für HIV Rev publizierten Bedingungen für Rec noch nicht optimal. Auch die Expressionsbedingungen wurden für das Rec-Protein so angepasst so, dass die Bildung von Inclusion Bodies möglichst verhindert wird, indem niedrigere Temperaturen für die Expression gewählt wurden. Eventuell müssen auch hier die Versuchsbedingungen weiter optimiert werden. Auch kann in nachfolgenden Versuchen eine denaturierende Aufreinigung mit 8 M Urea (Harnstoff) ausprobiert werden, da hierbei die Inclusion Bodies aufgeschlossen werden können. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass das aufgereinigte Protein dann nicht mehr korrekt gefaltet vorliegt und dadurch seine Eigenschaften verändern kann und eventuell auch andere Epitope für die Immunisierung aufweist als das native Protein.

Bei der Deletionsmutante Rec Δ NES war nach der Induktion der Expression kein verändertes Bandenmuster festzustellen. Allerdings kann dies durch das geringe Molekulargewicht des

Proteins von 14 kDa bedingt sein. Im unteren Bereich eines SDS-Gels ist die Auflösung oftmals nicht optimal und die Aufreinigung wurde daher dennoch durchgeführt. Die Aufreinigung zeigte schließlich ein Protein, dessen Molekulargewicht dem des Rec Δ NES entspricht. Allerdings konnte das Protein im Western Blot nicht über den V5-Tag nachgewiesen werden. Auch war das Ergebnis eines mit dem aufgereinigten Protein durchgeführten Pull Down Versuch nicht den Erwartungen entsprechend. Diese beiden Tatsachen lassen darauf schließen, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein nicht um das oricoRec Δ NES handelt, sondern um ein bakterielles Protein mit ähnlicher Größe. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass der V5-Tag während der Aufreinigung verloren gegangen ist und somit kein direkter Nachweis mehr möglich ist. Diese Möglichkeit zeigt auch auf, wie wichtig es ist einen Rec-spezifischen Antikörper zu generieren.

4.2. Untersuchungen zur Interaktion zwischen HIV-1 coRev und Staufen

Mithilfe der durchgeführten Co-Immünpräzipitationsversuche konnte eine spezifische Interaktion von HIV coRev mit Staufen-1 gezeigt werden. Die Negativkontrolle zeigt eine sehr schwache Staufen-1-Bande, was dadurch zustande gekommen sein kann, dass die Sepharose nicht gründlich genug gewaschen wurde und somit noch Staufen-1 in der Probe vorhanden war, welches jedoch nicht spezifisch an die α V5-Sepharose bindet. Die mit Sternchen markierten Banden auf der Höhe von 26 kDa und 55 kDa entsprechen den α V5-antikörperspezifischen IgG-Banden, die durch den sekundären α Maus-Antikörper mit detektiert wurden und als Maß dafür genommen werden können, wie gleichmäßig die Proben aufgetragen wurden. Da diese Banden sehr gleichmäßig erscheinen, kann davon ausgegangen werden, dass überall gleich viel Probe aufgetragen wurde und diese somit quantitativ miteinander verglichen werden können.

Es konnte mithilfe der Co-Immünpräzipitation somit gezeigt werden, dass es in Gegenwart von HIV-1 coRev zu einem eindeutigen Staufen-1-Signal kommt, welches sich deutlich von der Negativkontrolle unterscheidet. Somit ist von einer spezifischen Rev-Staufen-Interaktion auszugehen, die allerdings noch mithilfe von Immunfluoreszenz-Versuchen bestätigt werden sollte.

Auch die Immunfluoreszenz-Versuche deuten auf eine Interaktion von Staufen-1 mit dem HIV-1 coRev hin, da in den untersuchten Zellen einige Bereich der Kolo-kalisation zwischen diesen Proteinen nachgewiesen werden konnten.

Es ist bekannt, dass die Staufen-1-Gag-Interaktion eine wichtige Rolle bei der Viruspartikelbildung spielt. [45] Versuche, bei denen Staufen-1 überexprimiert oder ausgeschaltet wurde, zeigten eine verminderte Infektiosität der gebildeten Viruspartikel.

Außerdem wird Staufen-1 für die genomische Verpackung der ungespleißten, genomischen RNA in Viruspartikel benötigt. [46] Staufen-1 ist somit ein zelluläres Protein, welches vom Virus zu seinen Zwecken genutzt wird. Allerdings konnte bislang nicht geklärt werden, wie Staufen-1 und HIV p55Gag in räumliche Nähe zueinander gelangen, was die Voraussetzung für eine Interaktion ist. Unklar ist auch, durch welche Mechanismen Staufen-1 die Virus-RNA bindet. [29]

Im Rahmen ihrer Dissertation wurde von Dr. Kirsten Hanke ein Modell für die HERV-K Rec-Funktion entwickelt (siehe Abbildung 19), welches möglicherweise in der Lage ist, diese ungeklärten Fragen zu beantworten. Da nun auch eine Interaktion von HIV-1 Rev und Staufen-1 gezeigt werden konnte, gibt es aufgrund der funktionellen und strukturellen Ähnlichkeit der retroviralen RNA-Transportproteine weitere Indizien, die dieses Modell unterstützen.

In diesem Modell, welches hier für das HERV-K Rec dargestellt ist, aber genauso auch für das HIV-Rev gelten könnte, bindet das RNA-Transportprotein im Zytoplasma über die Kernimportsequenz NLS an Importin- β , wodurch ein Import des RNA-Transportproteins in den Zellkern ausgelöst wird. Im Zellkern bindet es sein entsprechendes responsives Element in der viralen RNA. Dies bewirkt einen Konformationswechsel und das Transportelement multimerisiert an der RNA. Somit wird ein frühzeitiges Spleißen dieser RNA unterbunden.

Die Konformationsänderung bewirkt auch, dass die Kernexportsequenz NES zugänglich gemacht wird und andere Proteine der Ribonukleoproteinpartikel (RNP) wie das Staufen-1 an das RNA-Transportprotein binden können. Die Interaktion mit Staufen-1 bewirkt eine Assemblierung des Transportkomplexes und es erfolgt eine Interaktion mit den Kernexportfaktoren, zu denen Crm1 gehört. Schließlich wird der Komplex durch die Kernpore ins Zytoplasma transportiert, indem es zur Spaltung von RanGTP kommt. Es folgt ein gerichteter Transport des viralen RNA-Protein-Komplexes zu den Ribosomen, der mithilfe der Tubulin-bindenden Domäne des Staufen-1 möglich ist. An den Ribosomen erfolgt schließlich die Translation der viralen Vollängen-RNA und Gag wird gebildet. Gag akkumuliert an den Ribosomen und interagiert ebenfalls mit Staufen-1. Außerdem kommt es zu einer Verpackung der viralen RNA in Viruspartikel.

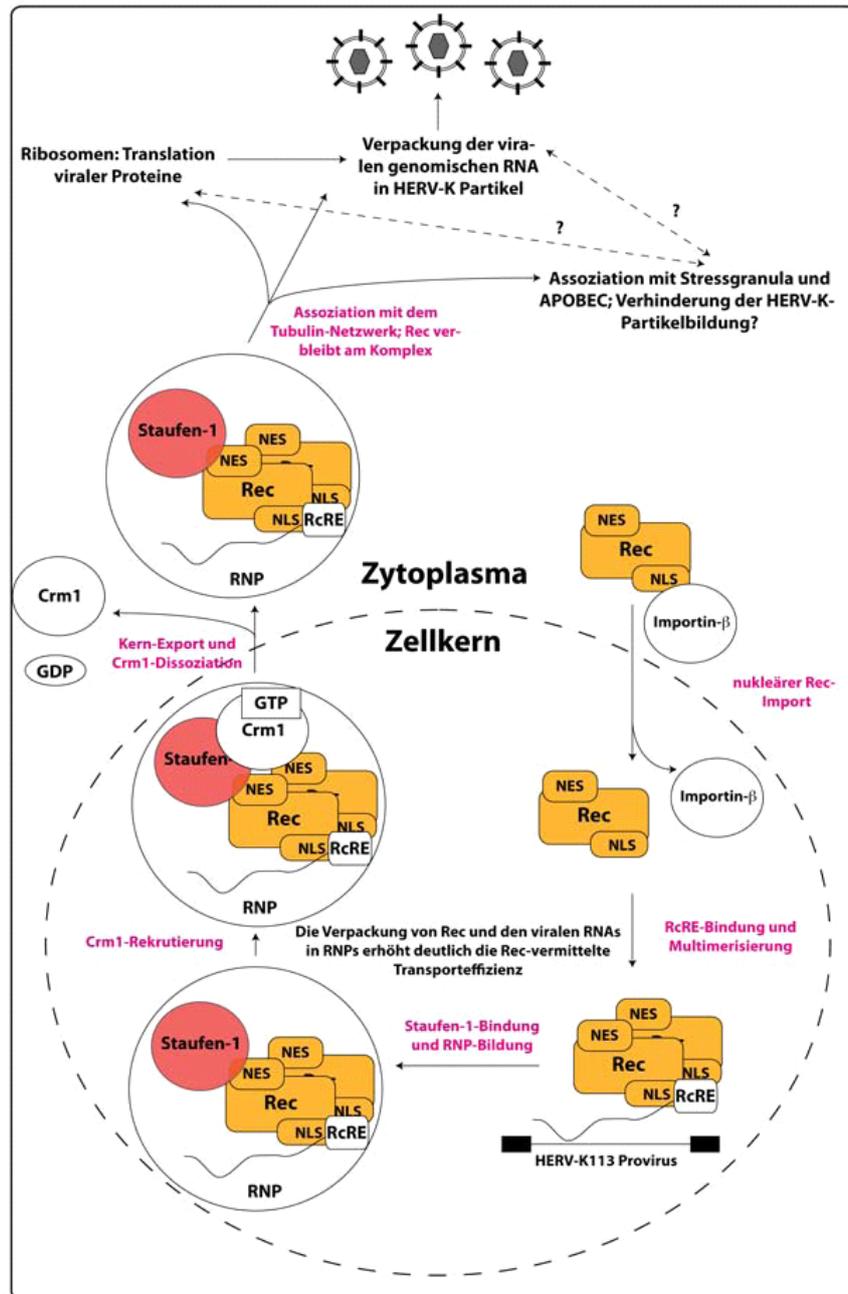


Abbildung 19: Die Abbildung zeigt ein Modell der HERV-K Rec-Interaktion mit Staufen-1, welches analog auch für die Interaktion von HIV-1 Rev angenommen wird. Nach der Synthese bindet das RNA-Transportprotein HERV-K Rec bzw. HIV-1 Rev über das Kernlokalisationssignal (NLS) an den Kernimportfaktor Importin-β, wodurch der Import in den Zellkern ausgelöst wird. Im Zellkern bindet das Protein an sein responsives Element, welches Teil der genomischen RNA ist und multimerisiert mit anderen Rec-/Rev-Proteinen. Der dadurch hervorgerufenen Konformationswechsel macht die Kernexportsequenz (NES) für Staufen-1 zugänglich und es wird ein Ribonukleoproteinkomplex (RNP) gebildet. Dieser Komplex interagiert mit dem Kernexportfaktor Crm1, das an Crm1 gebundene GTP wird gespalten und Crm1 wird aus dem Komplex freigesetzt. Staufen-1 interagiert mit dem Tubulinnetzwerk und befördert somit Rec/Rev und die virale RNA zu den Ribosomen, wo die viralen Proteine translatiert werden oder zum Ort der Viruspartikelbildung. Die Abbildung wurde übernommen aus Dr. Kirsten Hanke, Dissertation.

4.3. Stressgranula

In den durchgeführten Versuchen kam es zu einer deutlichen Colokalisation von TIA-1 und Staufen-1, was darauf hindeutet, dass Staufen-1 in die Stressgranula rekrutiert wird. Es gibt auch verschiedene Publikationen, die darauf hindeuten, dass das RNA-bindende Wirtsprotein Staufen-1 unter Stressbedingungen in Stressgranula einwandert.

Es konnte aber nur eine sehr schwache Akkumulation von HIV-1 Rev- im Bereich der Stressgranula beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu konnte bei analogen Versuchen mit dem HERV-K Rec-Protein, die von Dr. Kirsten Hanke im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt wurden, eine sehr starke Colokalisation aller drei Proteine nachgewiesen werden.

Mit dem RNA-Transportprotein wandert auch die daran gebundene virale RNA in die Stressgranula ein und ist dort möglicherweise regulatorischen Prozessen unterworfen, da Stressgranula cytoplasmatische Orte des mRNA-Silencing darstellen und dort zahlreiche regulatorische und antivirale Proteine vorkommen. So akkumulieren in den granulären Strukturen beispielsweise Proteine der Argonaute-Familie, für die antivirale Abwehrmechanismen bekannt sind. Welche Auswirkungen die Rekrutierung auf die Translation bzw. Verpackung der viralen RNA hat, wurde bisher für kein Retrovirus weiterführend untersucht.

Es ist somit möglich, dass die Bildung von Stressgranula und die Rekrutierung der viralen RNA über das RNA-Transportprotein einen antiviralen Wirtsmechanismus darstellt, indem die Funktion der viralen RNA inhibiert wird.

In den durchgeführten Versuchen konnte nicht gezeigt werden, dass das HIV-1 Rev in Stressgranula rekrutiert wird und somit auch nicht die daran gebundene virale RNA. Dies könnte ein Hinweis darauf sein könnte, dass HIV-1 einen Mechanismus entwickeln konnte, mit dessen Hilfe das Virus der Restriktion durch regulatorische Prozesse in den Stressgranula entgehen kann.

4.4. Colokalisation von HIV-1 coRev mit HMM A3G

Da HMM A3G dafür bekannt ist, endogene Retroelemente in ihrer Replikation zu hemmen und das LMM A3G exogene Retroviren inhibieren kann, sollte hier auch der mögliche Einfluss von HMM A3G auf HIV-1 untersucht werden. Die HMM A3G-vermittelte Virusinhibition beruht vermutlich auf der Tatsache, dass die virale RNA vom Ort der reversen

Transkription entfernt wird. Der Transport des Rec und damit auch der daran gebundenen viralen RNA könnte auch Einfluss auf die Translation und die Virusverpackung haben. Diese Rekrutierung der viralen RNA in HMM A3G-Komplexe könnte ein Grund dafür sein, warum die bisher bekannten HERV-K Proviren nicht replikationskompetent sind. Die Ausbildung der Stressgranula und die Assemblierung der HMM A3G-Komplexe können für die Zelle einen Mechanismus darstellen, mit dem sie übermäßige provirale Genexpression begrenzen kann.

Anders als für das HERV-K Rec, wo es zur Colokalisation von Rec, Staufen-1 und HMM A3G kommt, konnte für das HIV-1 Rev keine Akkumulation in räumlicher Nähe zu den HMM A3G-Komplexen festgestellt werden. HIV-1 hat möglicherweise einen Mechanismus entwickelt, mit dem es der Restriktion nicht nur durch Stressgranula, sondern auch durch HMM A3G-Komplexe entkommen kann. Da Staufen-1 aber in räumlicher Nähe zu HMM A3G vorkommt, scheinen sich HIV-1 Rev und Staufen-1 zu trennen, sodass Rev der Rekrutierung in die HMM A3G-Komplexe zusammen mit Staufen-1 entgehen kann.

Für zukünftige Forschungen zum Mechanismus der RNA-Transportproteine und dem viralen RNA-Transport wäre es interessant zu untersuchen, was mit der viralen HERV-K RNA in den Stressgranula und HMM A3G-Komplexen geschieht und wie lange HERV-K Rec und die virale RNA assoziiert bleiben. Zu zeigen wäre außerdem, ob die genomische RNA verpackt wird oder ob sie in den Stressgranula abgebaut wird. Eine Möglichkeit diese Versuche zu realisieren, bietet das MS2-Phagenprotein, das an spezifische Sequenzen der RNA binden kann und über eine Fluoreszenzmarkierung die Beobachtung der viralen RNA ermöglicht. Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde bereits an diesem Projekt gearbeitet, es konnten allerdings noch keine Ergebnisse erzielt werden. Diese werden vermutlich demnächst aus der Arbeitsgruppe folgen.

5. Zusammenfassung

Komplexe Retroviren wie das humane endogene Retrovirus K (HERV-K) oder das humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) besitzen häufig akzessorische Proteine, die für den viralen RNA-Transport zuständig sind und dabei mit einer Vielzahl von Wirtsfaktoren interagieren. Beim HIV-1 übernimmt das Rev-Protein diese Rolle, bei HERV-K wird dieses Protein Rec genannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle dieser RNA-Transportproteine während des nukleozytoplasmatischen RNA-Transports und der Virusassemblierung zu untersuchen. Dafür wurde vor allem das Zusammenspiel mit möglichen Interaktionspartnern wie dem humanen RNA-Transportprotein Staufen-1-Protein oder dem antiviralen hochmolekularen APOBEC3G untersucht.

Co-Immunpräzipitationsversuche konnten eine bereits gezeigte Interaktion zwischen HERV-K Rec und Staufen-1 auch für das HIV-1 Rev bestätigen. Die spezifische Interaktion, die hierbei zwischen Staufen-1 und HIV-1 Rev nachgewiesen wurde, konnte durch Immunfluoreszenzversuche bestätigt werden. Dies deutet darauf hin, dass Staufen-1 eine wichtige Rolle beim viralen mRNA-Transport haben könnte und lässt zudem vermuten, dass die Funktionalität von HERV-K Rec und HIV-1 Rev nicht auf den Kerntransport allein beschränkt ist, sondern sich auch über regulatorische Aktivitäten auf Translations- und Verpackungsebene ausbreitet.

Die Interaktion von Staufen-1 mit den RNA-Transportproteinen Rec und Rec könnte auch einen antiviralen Kontrollmechanismus der Wirtszelle darstellen, indem HIV-1 Rev und HERV-K Rec über die Interaktion mit dem Staufen-1 in Stressgranula und antivirale HMM APOBEC3G-Komplexe rekrutiert werden. Die räumliche Nähe von HERV-K Rec zu A3G konnte bereits gezeigt werden. Allerdings konnte dies für das HIV-Rev bei Versuchen im Rahmen dieser Bachelorarbeit nicht bestätigt werden auch keine Colokalisation mit TIA-1, einem Stressgranula-Markerprotein. Dies lässt vermuten, dass HIV-1 einen Mechanismus entwickelt hat, dem antiviralen Wirtsmechanismus durch die Rekrutierung der RNA-Transportproteine und der daran gebundenen viralen RNA in Stressgranula und HMM A3G-Komplexe zu entgehen, da diese dort der Regulation durch die Wirtszelle unterworfen würde.

Weiteres Ziel dieser Arbeit war die Aufreinigung von Staufen-1- und HERV-K Rec-Protein, da bisher keine spezifischen Antikörper vorhanden sind. Durch die Aufreinigung der Proteine sollte die Vorarbeit für eine entsprechende Antikörpergenerierung geleistet werden. Dies konnte für das Staufen-1 erfolgreich realisiert werden. Eine Aufreinigung des HERV-K Rec war leider nicht möglich, da die Bildung sogenannter „Inclusion Bodies“ dies erschwert haben und trotz verschiedener Versuchsanpassungen keine optimalen Bedingungen erreicht werden konnten.

A. Anhang

A.1 Literaturverzeichnis

1. Modrow SF, Dietrich; Truyen, Uwe (2003) *Molekulare Virologie* 2 Ed.
2. Kurth R & Bannert N (2010) Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 126(2):306-314.
3. Gallo RC & Montagnier L (2003) The discovery of HIV as the cause of AIDS. *The New England journal of medicine* 349(24):2283-2285.
4. Stock I (2011) [Infections with human immunodeficiency viruses. Part I: pathogens, epidemiology, and clinical presentation]. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* 34(6):190-198; quiz 199-200.
5. Hamouda O (2011) Schätzung der Prävalenz und Inzidenz von HIV-Infektionen in Deutschland *Epidemiologisches Bulletin* 46.
6. Stock I (2011) [Infections with human immunodeficiency viruses. Part II: Antiretroviral drugs, therapeutic options, and diagnostics]. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* 34(7):234-244; quiz 245-236.
7. Hanke K (2010) Humane Endogene Retroviren - genomischer Müss oder Krankheitserreger. *RetroVirus Bulletin* 3/2010.
8. Venter JC, *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-1351.
9. Lander ES, *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921.
10. Gallo RC (2005) History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene* 24(39):5926-5930.
11. Buzdin A K-AE, Gogvadze E, Sverdlov E (2006) At least 50% of human-specific HERV-K (HML-2) long terminal repeats serve in vivo as active promoters for host nonrepetitive DNA transcription. *Journal of Virology*.
12. Ponferrada VG, Mauck BS, & Wooley DP (2003) The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus. *Archives of virology* 148(4):659-675.
13. Mangeney M, *et al.* (2007) Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(51):20534-20539.

14. Kammerer U, Germeyer A, Stengel S, Kapp M, & Denner J (2011) Human endogenous retrovirus K (HERV-K) is expressed in villous and extravillous cytotrophoblast cells of the human placenta. *Journal of reproductive immunology* 91(1-2):1-8.
15. Boller K, *et al.* (1993) Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* 196(1):349-353.
16. Buscher K, *et al.* (2005) Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer research* 65(10):4172-4180.
17. Denne M, *et al.* (2007) Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Virol* 81(11):5607-5616.
18. Boese A, *et al.* (2000) Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Oncogene* 19(38):4328-4336.
19. Beimforde N, Hanke K, Ammar I, Kurth R, & Bannert N (2008) Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. *Virology* 371(1):216-225.
20. Wang WK, Chen MY, Chuang CY, Jeang KT, & Huang LM (2000) Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 33(3):131-140.
21. Palmeri D & Malim MH (1999) Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Molecular and cellular biology* 19(2):1218-1225.
22. Mann DA, *et al.* (1994) A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *Journal of molecular biology* 241(2):193-207.
23. Malim MH, McCarn DF, Tiley LS, & Cullen BR (1991) Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J Virol* 65(8):4248-4254.
24. Cullen BR (1998) Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* 249(2):203-210.
25. Pollard VW & Malim MH (1998) The HIV-1 Rev protein. *Annual review of microbiology* 52:491-532.
26. Cockrell AS, van Praag H, Santistevan N, Ma H, & Kafri T (2011) The HIV-1 Rev/RRE system is required for HIV-1 5' UTR cis elements to augment encapsidation of heterologous RNA into HIV-1 viral particles. *Retrovirology* 8:51.

27. Magin C, Hesse J, Lower J, & Lower R (2000) Corf, the Rev/Rex homologue of HTDV/HERV-K, encodes an arginine-rich nuclear localization signal that exerts a trans-dominant phenotype when mutated. *Virology* 274(1):11-16.
28. Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Desbats MA, Leishman CC, & Boccaccio GL (2009) Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *Journal of cell science* 122(Pt 4):563-573.
29. Chatel-Chaix L, Boulay K, Mouland AJ, & Desgroseillers L (2008) The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* 5:41.
30. Chiu YL & Greene WC (2009) APOBEC3G: an intracellular centurion. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 364(1517):689-703.
31. Chiu YL, *et al.* (2006) High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(42):15588-15593.
32. Gallois-Montbrun S, *et al.* (2007) Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *Journal of virology* 81(5):2165-2178.
33. Kedersha N, Tisdale S, Hickman T, & Anderson P (2008) Real-time and quantitative imaging of mammalian stress granules and processing bodies. *Methods in enzymology* 448:521-552.
34. Hall T (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser. 41*:S. 95-98.
35. Cline J, Braman JC, & Hogrefe HH (1996) PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic acids research* 24(18):3546-3551.
36. Weiner MP, *et al.* (1994) Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 151(1-2):119-123.
37. Müllhardt C (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics* (Heidelberg) 6 Ed.
38. Waring MJ (1965) Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of molecular biology* 13(1):269-282.
39. Dower WJ, Miller JF, & Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic acids research* 16(13):6127-6145.
40. Sanger F, Nicklen S, & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12):5463-5467.
41. Shein HM & Enders JF (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48:1164-1172.

42. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.
43. Daugherty MD, Booth DS, Jayaraman B, Cheng Y, & Frankel AD (2010) HIV Rev response element (RRE) directs assembly of the Rev homooligomer into discrete asymmetric complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(28):12481-12486.
44. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
45. Jouvenet N, Simon SM, & Bieniasz PD (2009) Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(45):19114-19119.
46. Chatel-Chaix L, *et al.* (2004) Identification of Staufin in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Molecular and cellular biology* 24(7):2637-2648.

A.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
A3G	APOBEC3G
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle medium
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
ddNTP	didesoxy-Nukleotidtriphosphat
dsDNA	double stranded DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FIV	felines Immundefizienz-Virus
G	Guanin
H	hour
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HERV	Humanes Endogenes Retrovirus
HIV	Human Immunodeficiency Virus

HMM	high molecular mass
HRP	horseradish peroxidase
HSRV	humanes Spumaretrovirus
HTLV	humanes T-lymphotropes Virus
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
HCl	Salzsäure
LB	Luria Bertani
LMM	low molecular mass
LTR	long terminal repeats
M	molar
min	Minute
MLV	murines Leukämievirus
MMTV	Maus-Mammatumovirus
NEB	New England Biolabs
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localization signal
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyninylidenfluorid
RcRE	rec responsive element
Rec	regulator of expression encoded by corf
Rev	regulator of expression of virion proteins
RKI	Robert Koch-Institui
RNA	ribonucleic acid
RRE	rev responsive element
rpm	rounds per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate

s	Sekunde
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
β -ME	β -Mercaptoethanol

A.3. Primer

A.3.1. Mutageneseprimer

Name des Primers	Sequenz (5' → 3')
coRev_pEGFP_HindIII_F	atgactaccAAGCTTgccgccgccATGGCCGGCAGGAGCGGGCGACTCC
coRev_pEGFP_KpnI_R	gggtggcgaccGGTACCggCTCCTTGGTCCCGCTCTCCAGCAC
coRev_pBud_NotI_F	atgactacCGCGGCCCGcgcgccgccATGGCCGGCAGGAGCGGGCGACTCC
coRev_pBud_XhoI_R	tacgtcgtCTCGAGggCTCCTTGGTCCCGCTCTCCAGC
Shuttle_Del-Apa_F	GGGCAGACAGGCGGCCGCCACCGCG GGAACC GCGGTTCTGAAGGTAAGCCTATCCCT
Shuttle_Del-Apa_R	AGGGATAGGCTTACCTTCGAACCGC GGTTCC CGCGGTGGCGGCCCGCCTGTCTGCC
Shuttle_Del-SphI_Env_F	GTAAACAGATGCTTGAAGGCA GCGAGC TCCTTAAGAGTCATCACCCTC
Shuttle_Del-SphI_Env_R	GAGTGGTGATGACTCTTAAGGA GCTCGC TGCCTTCAAGCATCTGTTAAC
Shuttle_newApaI_F	CGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTT GGGCCC GCGAACGACATTTATAATGAACGTG
Shuttle_newApaI_R	CACGTTCAATTATAAATGTCGTTTCGC GGGCCC AACTGCAACTCCGATAAATAACGCG
ShuttleRcRE_Del-ApaI_F	GGGCAGACAGGCGGCCGCCACCGCG GGAAC CGCGGTTCTGAAGGTAAGCCTATCCCT
ShuttleRcRE_Del-ApaI_R	AGGGATAGGCTTACCTTCGAACCGC GGTTCC CGCGGTGGCGGCCCGCCTGTCTGCC
pcDNA4_DelSphI-Pos1_F	GGATTGGGAAGACAATAGCAG GCGAGC TGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
pcDNA4_DelSphI-Pos1_R	ATAGAGCCCACCGCATCCCCA GCTCGC CTGCTATTGTCTTCCCAATCC
pcDNA4_DelSphI-Pos2_F	CCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA GCGAGC ATCTCAATTAGTCAGCAACCAG
pcDNA4_DelSphI-Pos2_R	CTGGTTGCTGACTAATTGAGAT GCTCGC TTTGCATACTTCTGCCTGCTGG
pcDNA4_DelSphI-Pos3_F	CCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA GCGAGC ATCTCAATTAGTCAGCAACCAG
pcDNA4_DelSphI-Pos3_R	CTGGTTGCTGACTAATTGAGAT GCTCGC TTTGCATACTTCTGCCTGCTGG

Tabelle 19: Die Tabelle listet die verwendeten Mutageneseprimer auf.

A.3.2. Sequenzierungsprimer

Name des Primers	Sequenz (5' → 3')
BGH-reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG
pEGFP_forward	GTCGTAACAACCTCCGCCCAT
pEGFP_reverse	TCGCCGTCCAGCTCGACCAG
oricoRec_reverse	TCTTGTTTCATCTTGTGGGTCAG
T3	ATTAACCCTCACTAAAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
M13_reverse	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
T7-Terminator	TATGCTAGTTATTGCTCAG
pcDNA4_seqSphI_forward	GGAAATTGCATCGCATTGTC
pcDNA4_seqSphI_reverse	GAGTTAGGGGCGGGATGGGC
Luzi_seq700_R	CTTAAAATCGCAGTATCCGGAATGATTTGATTG
Luzi_seq600_F	CTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCT
Luzi_seq1070_F	CCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCCG

Tabelle 20: Die Tabelle listet die verwendeten Sequenzierungsprimer auf, die zur Überprüfung der Konstrukte verwendet wurden.

B. Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank gilt Dr. Kirsten Hanke, die mich während meines Praktikums im Rahmen meiner Bachelorarbeit betreut hat. Sie hat mir stets großes Vertrauen geschenkt, meine Aufgaben selbständig zu erledigen und auch eigene Ideen mit einzubringen. Für offene Fragen oder Hilfestellungen stand sie jederzeit bereit. Vielen Dank dafür!

Ich möchte auch ganz herzlich Dr. Norbert Bannert danken, der es mir ermöglichte, das Praktikum in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und der mir auch zahlreiche Fortbildungsmöglichkeiten des Robert Koch-Instituts zugänglich machte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Kazimiersz Madela, der mich in die Grundkenntnisse des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops cLSM780 eingeführt hat. Dies ermöglichte es mir, meine Immunfluoreszenzversuche selbständig auszuwerten.

Ein ganz herzliches Dankeschön auch an Ewelina Caspers, die mich nicht nur in die Methode des Western Blots eingewiesen hat, sondern mir auch allgemein eine große Hilfe bei der Einarbeitung in die Laborabläufe war.

Ebenso möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe FG18 danken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank dafür; es war eine sehr schöne Zeit bei euch und ich habe mich gut aufgenommen und stets als vollwertiges Mitglied der Arbeitsgruppe gefühlt.

Ich danke meinen Eltern und Großeltern dafür, dass sie mich während meiner Schulzeit und durch das gesamte Bachelorstudium hindurch immer unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich meinem Partner Philipp Winkler dafür danken, dass er mit mir auch die Höhen und Tiefen des Studiums und der Bachelorarbeit durchgestanden hat und stets ein verlässlicher Partner war.

C. Erklärung

Die dieser Bachelorarbeit zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Robert Koch-Institut in Berlin in der Zeit vom 01. April bis 31. September 2011 durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den...

Linda Liedgens