

**UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION DES  
HERV-K(HML-2)-GENS *np9* IN  
VERSCHIEDENEN TUMORENTITÄTEN  
UND ANALYSE DER TRANSKRIPTIONELL  
AKTIVEN PROVIREN**

**SANDRA KEHR**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

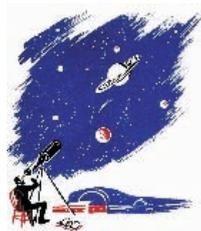
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel

**und**

dem Institut für Virologie  
der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar

Betreuer: Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch

**Untersuchung der Expression des HERV-K(HML-2)-Gens *np9* in  
verschiedenen Tumorentitäten und Analyse der transkriptionell  
aktiven Proviren**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von  
**Sandra Kehr**  
Tierärztin aus St. Ingbert

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Thiel  
Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch

Tag der Disputation: 24.01.2008

Widmung

---

Meinen Eltern gewidmet.

---

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Müller-Lantsch für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Betreuung der Doktorarbeit und sein Entgegenkommen, eine externe veterinärmedizinische Dissertation in der Abteilung für Virologie durchführen zu können.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thiel dafür, dass er sich dazu bereit erklärt hat, diese Doktorarbeit als externe Dissertation zu betreuen und die Arbeit kritisch zu sichten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Marlies Sauter für die hervorragende und vor allen Dingen herzliche Betreuung während der Zeit im Labor, aber auch danach.

Ein ähnlicher Dank geht an Barbara Best, ohne deren Hilfe und Tipps diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Bei Herrn PD Dr. Jens Mayer möchte ich mich für die gute Kooperation und die wertvollen Ratschläge bedanken und insbesondere dafür, dass ihm keine Frage zu „banal“ war.

Eine Erwähnung möchte ich Isabel Brand zukommen lassen, auch mir wird die Zeit als Gute Zeit in Erinnerung bleiben.

Mein Dank geht auch an Rouven Meidlinger, der für Fragen stets zur Verfügung stand und mir auch bei den „kleinen Dingen“ eine große Hilfe war.

Von Herzen danke ich meinem Freund Christian, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit wohl nie fertig geworden wäre, und natürlich meinen Eltern, die mir immer zur Seite gestanden haben.

---

**I Inhaltsverzeichnis**

**II Abbildungsverzeichnis**

**III Tabellenverzeichnis**

**IV Abkürzungsverzeichnis**

1	Einleitung .....	1
1.1	Viren .....	1
1.2	Retroviren .....	2
1.2.1	Klassifikation der Retroviren.....	3
1.2.2	Morphologie der Viruspartikel.....	5
1.2.3	Genom und Genomaufbau.....	6
1.2.4	Genprodukte .....	7
1.3	Virusinduzierte Zelltransformation und Tumorgenese .....	9
1.3.1	Tumorinduktion durch Viren mit DNA-Genom .....	9
1.3.2	Tumorinduktion durch Retroviren .....	10
1.4	Endogene retrovirale Elemente .....	11
1.5	Die Bedeutung animaler endogener Retroviren für die Xenotransplantationsmedizin.....	12
1.6	Humane endogene Retroviren .....	14
1.6.1	Einteilung humaner endogener Retroviren .....	15
1.6.2	Das Humane Endogene Retrovirus K.....	16
1.7	Biologische Relevanz endogener Retroviren.....	18
1.7.1	Einfluss retroviraler Insertionen auf zelluläre Regulationsmechanismen	18
1.7.2	Die Bedeutung endogener Retroviren für die Plazentation.....	19
1.7.3	Negative Aspekte retroviraler Insertionen für den Wirtsorganismus .....	20
1.8	Genprodukte von HERV-K(HML-2) .....	22
1.8.1	Expression von Partikeln und Proteinen.....	22
1.8.2	Das akzessorische Protein Rec.....	22
1.8.3	Das Protein Np9 (Nukleäres Protein der Masse 9 kDa).....	23
1.8.3.1	Die Struktur von Np9.....	24
1.8.3.2	Expressionsstudien zu Np9.....	25
1.8.3.3	Interaktionspartner von Np9 .....	26

1.9	Ziele der Arbeit.....	28
2	Material .....	30
2.1	Enzyme und Oligonukleotide.....	30
2.2	Puffer und Lösungen .....	30
2.3	Molekulargewichtsmarker.....	30
2.4	Bakterienstämme und Nährmedien .....	30
2.4.1	Bakterienstämme .....	30
2.4.2	Nährmedien .....	31
2.5	Zelllinien und Nährmedien.....	31
2.5.1	Zelllinien.....	31
2.5.2	Nährmedien .....	31
2.6	Oligonukleotide .....	31
2.7	Vektoren .....	32
2.8	Testkits, Chemikalien und weitere Materialien.....	33
2.8.1	Testkits .....	33
2.8.2	Chemikalien .....	33
2.8.3	Weitere Materialien .....	33
2.9	Biopsiematerial .....	33
2.10	RT-PCR-Produkte .....	34
2.11	Zentrifugen, Computersoftware, Internetseiten .....	34
2.11.1	Zentrifugen.....	34
2.11.2	Computersoftware.....	35
2.11.3	Internetseiten .....	35
3	Methoden .....	36
3.1	DNA-Techniken.....	36
3.1.1	Ligation von DNA-Fragmenten.....	36
3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mittels alkalischer Lyse.....	36
3.1.3	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen .....	37
3.1.4	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	38
3.1.5	DNA Agarose-Gelelektrophorese .....	39
3.1.6	DNA-Sequenzierung .....	40
3.1.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	40

3.2	RNA-Techniken.....	40
3.2.1	RNA-Isolierung.....	40
3.2.1.1	RNA-Elution aus eukaryotischen Zellen .....	40
3.2.1.2	RNA-Elution aus Gewebe .....	41
3.2.2	DNase-Verdau .....	41
3.2.3	RNA Agarose-Gelelektrophorese .....	42
3.2.4	Synthese von cDNA, RT-PCR.....	42
3.3	Zellkulturtechniken .....	43
3.3.1	Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	43
3.3.2	Kultivierung und Lagerung immortalisierter Säugerzelllinien .....	43
3.3.3	Transformation von Bakterien .....	43
3.3.4	Blue/White-Screening .....	44
3.4	BLAST .....	45
4	Ergebnisse .....	47
4.1	Identifikation Np9-kodierungskompetenter HERV-K-(HML-2)-Loci .....	49
4.1.1	Strukturelle Voraussetzungen zur Np9-Expression .....	49
4.1.2	Die Analyse des menschlichen Genoms .....	50
4.1.3	Die potentiell zur Np9-Produktion befähigten Proviren .....	53
4.1.4	Die prädiktiven Aminosäuresequenzen der HERV-K(HML-2)-Loci .....	53
4.2	Analyse der RT-PCR-Produkte .....	55
4.2.1	Seminome.....	57
4.2.2	Germinom .....	59
4.2.3	Mammakarzinome.....	60
4.2.4	Glioblastome .....	61
4.2.5	Anaplastische Astrozytome .....	63
4.2.6	Melanome .....	64
4.2.7	Nierenzellkarzinome.....	65
4.3	Untersuchung des nativen Gewebes.....	66
4.3.1	RNA-Elution und RNA Agarose-Gelelektrophorese.....	66
4.3.2	RT-PCR .....	67
4.3.2.1	Zelllinie Tera-1 .....	68
4.3.2.2	Patient A; gesundes Hodengewebe .....	69

4.3.2.3	Patient A; Seminombiopsie .....	69
4.3.2.4	Patient B; gesundes Hodengewebe .....	70
4.3.3	Klonierung in pGEM®-T .....	71
4.3.4	Sequenzanalyse .....	71
4.4	Zusammenfassende Darstellung der Sequenzanalysen.....	72
5	Diskussion.....	74
5.1	Identifizierung Np9-kodierungskompetenter HERV-K(HML-2)-Loci und multiples Alignment der prädiktiven Aminosäuresequenzen .....	76
5.2	Analyse der RT-PCR-Produkte .....	77
5.3	Analyse der nativen Gewebeproben.....	80
6	Zusammenfassung.....	83
7	Summary.....	85
8	Literaturverzeichnis .....	87
9	Anhang .....	101

## II Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Darstellung der Familie Retroviridae einschließlich Subfamilien, Genera und Spezies. ....</i>	<i>4</i>
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Retrovirus.....</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung der Proviren HERV-K101 und HERV-K(HML-2.HOM). ....</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 4: Np9-Protein .....</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 5: pGEM®-T Vektor.....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 6: Ausschnitt aus pGEM®-T .....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 7: Auszug aus BlastN von Klon 2503/00S-3 .....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 8: Schematische Darstellung eines HERV-K(HML-2) Typ 1-Provirus.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 9: RNA-Agarose-Gelelektrophoresen .....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 10: Expressionsnachweis der beiden env-Transkripte np9 und rec in Zellen der Zelllinie Tera-1. ....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 11: RT-PCR der aus gesundem Hodengewebe (Patient A) eluierten Gesamt-RNA.....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 12: Expressionsnachweis der beiden env-Transkripte np9 und rec in Seminomgewebe. ....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 13: RT-PCR der aus gesundem Hodengewebe (Patient B) eluierten Gesamt-RNA.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 14: Multiples Alignment der Provirus Typ 1-Sequenzen und np9 cDNAs. .</i>	<i>104</i>
<i>Abbildung 15: Multiples Alignment der Provirus Typ 2-Sequenzen und rec cDNAs. ..</i>	<i>108</i>

### **III Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Wichtigste Vertreter der humanen endogenen Retroviren.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 2: RT-PCR-Produkte.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 3: Zusammenfassung der proviralen Sequenzcharakteristika .....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 4: Multiples Alignment der prädiktiven Np9-Aminosäuresequenzen .....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 5: Die generierten Klone .....</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 6: Die sequenzierten Klone.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 7: Analyseresultate der Seminom-cDNA-Sequenzen.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 8: Analyseresultate der Germinom-cDNA-Sequenzen .....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 9: Analyseresultate der Mammakarzinom-cDNA-Sequenzen.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 10: Analyseresultate der Glioblastom-cDNA-Sequenzen .....</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 11: Analyseresultate der Astrozytom-cDNA-Sequenzen .....</i>	<i>64</i>
<i>Tabelle 12: Analyseresultate der Melanom-cDNA-Sequenzen .....</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 13: Analyseresultate der Nierenzellkarzinom-cDNA-Sequenzen.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 14: Analyseresultate der Seminom-cDNA-Sequenzen.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 15: Zusammenfassende Darstellung der transkriptionell aktiven Loci .....</i>	<i>72</i>

## IV Abkürzungsverzeichnis

### A

A	Adenin
aa	amino acid
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenzgen des pGEM-T®-Vektors
AS	Aminosäure
Aqua bidest.	destilliertes Wasser

### B

BaEV	Baboon endogenous retrovirus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLAT	BLAST-Like Alignment Tool
bp	Basenpaar
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise

### C

C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CA	Capsid
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CD4	Cluster of Differentiation 4
Chr.	Chromosom
<i>c-myc</i>	zelluläres Onkogen des Avian myelocytomatosis virus
<i>c-onc/c-Onc</i>	cellular-oncogen (Gen/Protein)
cORF	central ORF
Crm1	Rezeptorprotein für NES-abhängigen Proteintransport

### D

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase I	Desoxyribonuklease I

DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<b>E</b>	
<i>env/Env</i>	Envelope (Gen/Protein)
ERV	endogenes Retrovirus
<i>EDNRB</i>	Endothelin-B-Rezeptor-Gen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERVW1	Endogenous retroviral sequence W 1
enJSRV	endogenes JSRV
etc.	et cetera
<b>F</b>	
FeLV	Felines Leukämievirus/Felines Leukosevirus
FeSV	Felines Sarkomvirus
FIV	Feline immunodeficiency virus
<i>Fv1</i>	Friend virus susceptibility-1
<i>Fv4</i>	Friend virus susceptibility-4
<b>G</b>	
G	Guanin
<i>gag/Gag</i>	Group specific antigen (Gen/Protein)
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GHR	Growth Hormone Receptor
<b>H</b>	
HERV	Humanes Endogenes Retrovirus
HIV	Human immunodeficiency virus
HML	human MMTV-like
HTDV	Human Teratocarcinoma-Derived Virus-like Particles
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämievirus (Humanes T-Zell-lymphotropes Virus)
HRE	Hormone Responsive Element
<b>I</b>	
IN	Integrase
IPTG	Isopropylthiogalactosid
<i>INSL4</i>	Insulin-like-growth-factor-Gen 4

**J**

JSRV Jaagsiekte Sheep Retrovirus

**K**

kb Kilobasen

kDa Kilodalton

**L**

LacZ  $\beta$ -Galactosidasegen des Vektors pGEM-T®

LB Luria broth base

LNX Ligand of Numb Protein X

LTR Long Terminal Repeat

**M**

M Molar

MA Matrixprotein

MCS Multiple Cloning Site (Polylinkerregion)

mg Milligramm

$\mu$ g Mikrogramm

MHC Major histocompatibility complex

ml Milliliter

$\mu$ l Mikroliter

min Minute

*MID1* Opitz-Syndrom-Gen

mM Millimolar

MMTV Maus-Mammatumor-Virus

MOPS Morpholinpropansulfonsäure

mRNA messenger-RNA

MuLV Murines Leukämievirus

**N**

NES Nuclear Export Signal

NLS Nuclear Location Signal

nm Nanometer

NOD Non-Obese Diabetic

*np9/Np9* Nukleäres Protein der Masse 9 (Gen/Protein)

nt Nukleotid

**O**

ORF Open Reading Frame

ori origin of replication

<i>onc</i>	oncogene; Onkogen
<b>P</b>	
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Primer Binding Site
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBL	peripheral blood lymphocyte
PERV	Porcines Endogenes Retrovirus
PLZF	Promyelocytic Leukemia Zinc Finger
<i>pol/Pol</i>	Polymerase (Gen/Protein)
PR	Protease
Pro	Protease
<i>prt</i>	Protease
<i>PTN</i>	Pleiotropin
PV	Provirus
<b>R</b>	
<i>ras</i>	rat sarcoma (Proto-Onkogen des Rattensarkoms)
RE	Restriktionsendonuklease
rpm	rounds per minute
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Rous-Sarkomvirus
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
<b>S</b>	
S	Svedberg
SA	Spleißakzeptorstelle
SCID	severe combined immunodeficiency
SD	Spleißdonorstelle
SDS	Sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunden
SOB	Salt Optimized Broth
SU	Surface
<b>T</b>	
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tera-1	Teratokarzinomzelllinie 1
TM	Transmembrane
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tRNA	transfer RNA
<b>U</b>	
U	Unit
UV	ultraviolett
<b>V</b>	
<i>v-fms</i>	Onkogen des Felinen Sarkomvirus
<i>v-myc</i>	Onkogen des Avian myelocytomatosis virus
<i>v-onc/v-Onc</i>	viral-onc; virales Onkogen (Gen/Protein)
v/v	Volumen pro Volumen
<b>W</b>	
WHO	World Health Organization
<b>X</b>	
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Viren

Viren sind bei allen Arten von Lebewesen als Zellparasiten und Krankheitserreger zu finden. Ihr Ursprung und ihre Entwicklung sind eng mit der Evolution von Einzellern, Pflanzen und Tieren verbunden.

Die Existenz von Viren als krankheitsauslösende Agenzien konnte erstmals im Jahre 1832 durch Dimitri I. Iwanowski anhand des Tabakmosaikvirus belegt werden. Der erste Nachweis eines tierpathogenen Virus gelang Friedrich Loeffler im Jahr 1898 mit dem Erreger der Maul- und Klauenseuche. Die Erforschung von Viren als Krankheitserreger wurde vorangetrieben im Zuge ihrer Nachweismöglichkeiten. Negri entdeckte 1903 die nach ihm benannten Einschlusskörperchen in den Ganglienzellen tollwutkranker Tiere, zu deren Nachweis färberische Methoden genutzt werden konnten. Zwischen 1918 und 1920 forderte die pandemisch auftretende Spanische Grippe weltweit etwa 20 Millionen Todesopfer. In den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts gelang es erstmals, die hierfür verantwortlichen Viren in bebrüteten Hühnereiern zu züchten, wobei ihre hämagglutinierenden Eigenschaften zu Tage traten. Damit wurde der Grundstein für den Hämagglutinationstest gelegt, welcher künftig als Virusnachweis genutzt werden konnte. Den Übergang zur molekularbiologischen Untersuchung von Virusinfektionen jedoch stellte in erster Linie die aus Spendenmitteln geförderte Erforschung der Poliomyelitis dar, deren Erfolg in der Entdeckung des zytopathischen Effekts im Jahre 1949 durch J. F. Enders, T. H. Weller und F. C. Robbins gipfelte. Durch Weiterentwicklung der Gewebekultur und die Methode der Zellkultur gelang es schließlich, Viren *in vitro* zu züchten, was unter anderem die Herstellung spezifischer Vakzine ermöglichte („Molekulare Virologie“, Kapitel 1, 2003; Waterson and Wilkinson, 1978).

Viren vermehren sich generell intrazellulär, d.h. infizierte Zellen synthetisieren nach Anweisung des Virusgenoms Nachkommenviren. Außerhalb lebender Zellen sind Viren vermehrungsunfähig und biologisch inaktiv. Sie verfügen nicht über eigene Stoffwechselaktivitäten, weshalb sie als obligate Zellparasiten betrachtet werden müssen. Viruspartikel beinhalten mindestens zwei chemische Bestandteile: eine Nukleinsäure als Genom und Proteine. Die Nukleinsäure, bei der es sich entweder um eine Desoxyribonukleinsäure (DNS) oder eine Ribonukleinsäure (RNS) handelt, bildet mit dem Virusprotein eine biologische Einheit. Sie steuert - je nach Nukleinsäuretyp - die Art der Virusvermehrung, vermittelt die Infektiosität und kodiert die einzelnen Virusreproduktionsschritte. Die virale Nukleinsäure ist von einem Kapsid aus Protein

umgeben, welches sie sowohl vor enzymatischen Angriffen als auch vor mechanischer Beschädigung schützt. Kapsid und Nukleinsäure als Einheit werden als Nukleokapsid bezeichnet. Zusätzlich besitzen viele Viren eine äußere Hülle, die Lipide und Glykoproteine enthält. Hier bilden dann Nukleokapsid und Hülle das komplette infektionstüchtige Virion.

## 1.2 Retroviren

Aufgrund ihrer fehlenden zellulären Organisation und der damit verbundenen obligat intrazellulären Vermehrung haben Viren im Laufe der Evolution unterschiedliche Methoden entwickelt, ihre Wirtszellen zur Replikation des viralen Genoms und zur Synthese viraler Proteine zu nutzen. Neben morphologischen und biochemischen Eigenschaften wird daher auch die Art und Weise der Replikation zur Klassifikation von Viren herangezogen.

In die Familie der Retroviren sind diejenigen viralen Erreger eingeordnet, die eine reverse Transkriptase (RT) besitzen und teilweise onkogen sind. Ihre Einzigartigkeit besteht in dieser enzymatischen Ausstattung. Sie benötigen und verwenden die RT, um nach dem Eindringen in eine permissive Zelle ihr RNA-Genom in einem als „reverse Transkription“ bezeichneten Prozess in eine DNA umzuschreiben, um diese dann als Provirus in das zelluläre Genom der Wirtszelle integrieren zu können. Das derart integrierte Provirus verliert seine Individualexistenz. Es verhält sich wie ein zelluläres Gen und wird bei der Teilung der Wirtszelle mit dem zellulären Genom vermehrt und an die Tochterzellen weitergegeben. Entdeckt wurde dieser Mechanismus 1970 durch den späteren Nobelpreisträger Howard M. Temin, der damit das „Zentrale Dogma der Molekularbiologie“ – Informationsfluss von DNA über RNA in Protein – widerlegte (Temin, 1974).

Luc Montagnier und seiner Arbeitsgruppe gelang es 1983 am Pariser Pasteur-Institut, bei einem Patienten mit chronischer Lymphknotenerkrankung das humane Immundefizienzvirus (HIV) als Erreger des damals insbesondere in den USA epidemieartig auftretenden Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) zu isolieren und dessen Zugehörigkeit zu den Retroviren zu dokumentieren (Barre-Sinoussi et al., 1983). Die große Forschungsaktivität, die diese Entdeckung nach sich zog, führte dazu, dass Retroviren heute zu den am besten untersuchten Viren gehören.

In der Veterinärmedizin zählen retroviral verursachte Erkrankungen zum Praxisalltag. Im Jahr 1986 wurde in Davis, Kalifornien, das Feline Immundefizienzvirus (FIV), ein T-Zell-lymphotropes Lentivirus isoliert. Es führt bei Katzen zu einem dem humanen erworbenen Immundefizienzsyndrom AIDS sehr ähnlichen Krankheitsbild. FIV teilt viele

morphologische und biochemische Eigenschaften mit HIV. Die Pathogenese ist charakterisiert durch eine lange Periode klinischer Latenz, während der sich das Immunsystem progredient verschlechtert. Getriggert durch diverse Koinfektionen entwickelt sich schließlich das Immundefizienzsyndrom, welches durch opportunistische Infektionen, Myelosuppression, Tumoren oder auch neurologische Erkrankungen im Terminalstadium zum Tod der infizierten Tiere führt („Textbook of Veterinary Internal Medicine“, Volume 1, Chapter 171, p. 659, 2005). Die feline Immunschwäche ist wissenschaftlich von überragender Bedeutung, da Infektionen durch das feline Immundefizienzvirus ein wertvolles Modell für die Erforschung des humanen Immundefizienzvirus beziehungsweise der durch dieses verursachten AIDS-Erkrankung geworden sind.

### **1.2.1 Klassifikation der Retroviren**

Ursprünglich basierte die Klassifikation der Retroviren auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen retroviraler Partikel, eine Untergliederung erfolgte in die Genera A – D. Die Anzahl an Genera wurde schließlich auf der Basis neuer Kriterien erweitert und die Genera wurden durch das International Committee on the Taxonomy of Viruses (2005) neu benannt („Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses“, Part II, p. 421, 2005; „Fields Virology“, Chapter 55, 2007). Zum heutigen Zeitpunkt wird die Familie *Retroviridae* in die Subfamilien *Orthoretrovirinae* und *Spumaretrovirinae* untergliedert. Die Subfamilie *Orthoretrovirinae* umfasst die Genera Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, und Epsilonretroviren sowie Lentiviren, während die Subfamilie *Spumaretrovirinae* einzig das Genus Spumaretrovirus beinhaltet („Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses“, Part II, p. 421, 2005; „Fields Virology“, Chapter 55, 2007) (Abb.1). Die Untergliederung der Familie orientiert sich an Vorgängen während der Replikation sowie an Besonderheiten während der Infektionen und den durch sie verursachten Erkrankungen. Zudem stützt sie sich auf genetische und morphologische Aspekte („Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses“, Part II, p. 421-425, 2005). Dabei werden die Genera Alpha-, Beta- und Gammaretrovirus als „simple retroviruses“ betrachtet, während Deltaretroviren, Epsilonretroviren und Lentiviren wie auch Spumaviren zu den „complex retroviruses“ gezählt werden („Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses“, Part II, p. 422, 2005; „Fields Virology“, Chapter 55, 2007). Die einfachen Viren kodieren nur für die Gag-, Pro-, Pol- und Env-Genprodukte; die komplexen Viren kodieren zusätzlich zu den genannten Produkten für eine Reihe regulatorischer Proteine mit weitem Funktionsbereich („Fields Virology“, Chapter 55, 2007) (Kapitel 1.2.4).

<b>Orthoretrovirinae</b>	
<b>Alpharetrovirus</b>	
<i>Avian leukosis virus</i>	<u>Reptilian virus group:</u> <i>Viper retrovirus</i>
<u>Oncogene containing viruses:</u> Replication competent: <i>Rous sarcoma virus</i>	<u>Avian (Reticuloendotheliosis) virus group:</u> <i>Chick syncytial virus</i> <i>Reticuloendotheliosis virus</i> <i>Trager duck spleen necrosis virus</i>
Replication defective: <i>Avian carcinoma Mill Hill virus 2</i> <i>Avian myeloblastosis virus</i> <i>Avian myelocytomatosis virus 29</i> <i>Avian sarcoma virus CT10</i> <i>Fujinami sarcoma virus</i> <i>UR2 sarcoma virus</i> <i>Y73 sarcoma virus</i>	
<b>Betaretrovirus</b>	
<i>Jaagsiekte sheep retrovirus</i> <i>Langur virus</i> <i>Mason-Pfizer monkey virus</i> <i>Mouse mammary tumor virus</i> <i>Squirrel monkey retrovirus</i>	<b>Deltaretrovirus</b> <i>Bovine leukemia virus</i> <i>Primate T-lymphotropic virus 1</i> <i>Primate T-lymphotropic virus 2</i> <i>Primate T-lymphotropic virus 3</i>
<b>Gammaretrovirus</b>	
<u>Mammalian virus group:</u> Replication competent viruses: <i>Feline leukemia virus</i> <i>Gibbon ape leukemia virus</i> <i>Guinea pig type-C oncovirus</i> <i>Murine leukemia virus</i> <i>Porcine type-C oncovirus</i>	<b>Epsilone retrovirus</b> <i>Walleye dermal sarcoma virus</i> <i>Walleye epidermal hyperplasia virus 1</i> <i>Walleye epidermal hyperplasia virus 2</i> <i>Peach hyperplasia virus *</i> <i>Snakehead retrovirus *</i>
Replication defective viruses: <i>Finkel-Biskis-Jenkins murine sarcoma virus</i> <i>Gardner-Arnstein feline sarcoma virus</i> <i>Hardy-Zuckermann feline sarcoma virus</i> <i>Harvey murine sarcoma virus</i> <i>Kirsten murine sarcoma virus</i> <i>Moloney murine sarcoma virus</i> <i>Snyder-Theilen feline sarcoma virus</i> <i>Woolly monkey sarcoma virus</i>	<b>Lentivirus</b> <u>Bovine lentivirus group:</u> <i>Bovine immunodeficiency virus</i>  <u>Equine lentivirus group:</u> <i>Equine infectious anemia virus</i>  <u>Feline lentivirus group:</u> <i>Feline immunodeficiency virus</i> <i>Puma lentivirus</i>  <u>Ovine/caprine lentivirus group:</u> <i>Caprine arthritis encephalitis virus</i> <i>Visna/maedi virus</i>  <u>Primate lentivirus group:</u> <i>Human immunodeficiency virus 1</i> <i>Human immunodeficiency virus 2</i> <i>Simian immunodeficiency virus</i>
<b>Spumaretrovirinae</b>	
<b>Spumavirus</b>	
<u>Simian foamy virus group:</u> <i>African green monkey simian foamy virus</i> <i>Macaque simian foamy virus</i> <i>Simian foamy virus</i>	<u>Equine foamy virus group:</u> <i>Equine foamy virus</i>
<u>Bovine foamy virus group:</u> <i>Bovine foamy virus</i>	<u>Feline foamy virus group:</u> <i>Feline foamy virus</i>

Abbildung 1: Darstellung der Familie Retroviridae einschließlich Subfamilien, Genera und Spezies<sup>1</sup>.

Die Spezies innerhalb der Genera erfahren eine Gruppeneinteilung. \*: Spezies vorläufig in diesem Genus zu finden.

<sup>1</sup> Einteilung nach „Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses“, Part II, 2005; modifiziert

Die Genera Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilonretrovirus besitzen pathogenes Potential aufgrund von onkogenen Elementen innerhalb ihres Genoms und werden als kausale Agenzien in der Tumorgenese diskutiert (Kapitel 1.3.2). Während auch die Pathogenität von Lentiviren sicher belegt ist, konnten Spumaviren bisher noch keine definierten Krankheitsbilder zugeordnet werden („Fields Virology“, Chapter 60, 2007). Lentivirusinfektionen wiederum sind generell gekennzeichnet durch eine lange Inkubationsdauer, gefolgt von einem progressiven Krankheitsverlauf mit meist letalem Ende („Fields Virology“, Chapter 59, 2007).

Neben den exogenen Retroviren existieren in den Genera Alpha-, Beta- und Gammaretrovirus auch endogene Retroviren. Auch für das Genus Spumaretrovirus wurde ein entfernt verwandtes endogenes Virus beschrieben („Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses“, Part II, p. 438, 2005). Endogene Retroviren sind in allen Zellen eines Organismus in das Genom integriert. Sie werden vertikal über die Keimbahnzellen übertragen und können unter bestimmten Umständen zur Produktion von exogenen, infektiösen Partikeln aktiviert werden („Molekulare Virologie“, Kapitel 18, 2003) (Kapitel 1.4).

### 1.2.2 Morphologie der Viruspartikel

Retroviren sind Partikel mit einem Durchmesser von 80 – 100 nm. Das Kapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, welche von der Zytoplasmamembran abgeleitet ist. Mit ihr sind die viralen Glykoproteine assoziiert, die als vom Virus kodierte Spikes erscheinen (Abb. 2).

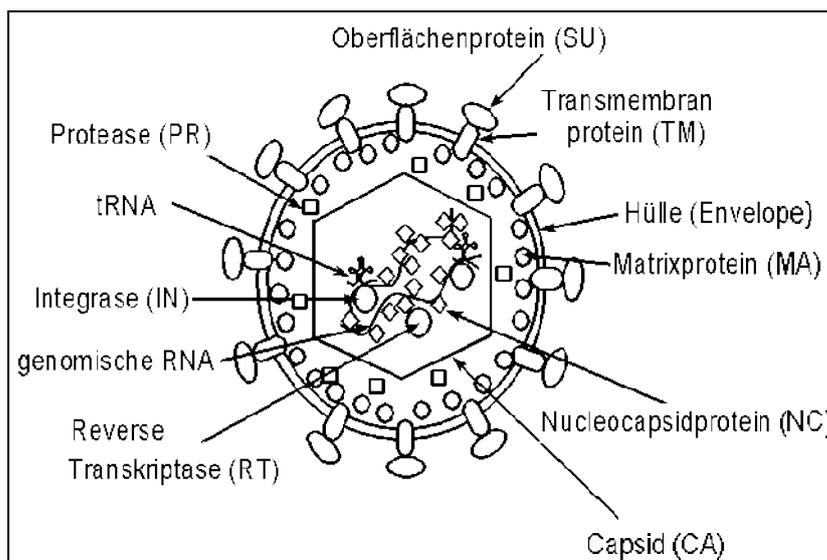


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Retrovirus.

Das transmembranäre Protein (TM) ist über eine Region von ca. 20 hydrophoben Aminosäuren verankert, während das externe Glykoprotein (SU) nichtkovalent mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des transmembranären Proteins verbunden ist. Beide werden als gemeinsames Vorläuferprotein gebildet. In der Membran stecken die amorphen Matrixproteine (MA), die das Kapsid überlagern und über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden sind. Im Partikelinneren befindet sich das Viruskapsid (CA), das – je nach Virustyp - eine sphärisch-ikosaedrische (Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltaretroviren sowie Spumaviren) oder eine konische Form aufweist (bei einem Teil der Betaretroviren sowie dem Mason-Pfizer-Affen-Virus und den Lentiviren). Nur bei einigen Betaretroviren wie dem Maus-Mammatumortumor-Virus befindet es sich exzentrisch im Viruspartikel („Molekulare Virologie“, Kapitel 18, 2003). Das Kapsid besteht aus Kapsidproteinen, die wie die Matrixproteine Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine) sind. Es enthält zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA als Virusgenom. Diese sind weder kovalent noch durch Basenpaarung miteinander verbunden. Die RNA ist mit den Nukleokapsidproteinen (NC) komplexiert (Abb. 2), welche ebenfalls Komponenten der Gag-Proteine sind. Als weitere virale Komponenten befinden sich im Viruspartikel die essentiellen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR).

### **1.2.3 Genom und Genomaufbau**

Es existieren signifikante Unterschiede zwischen der Genomstruktur des infektiösen Partikels und der ins Wirtsgenom integrierten proviralen Form.

Beim Genom des Virions handelt es sich um ein Dimer einer linearen einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität, deren Aufbau sich konform zu dem Aufbau eukaryoter messenger-RNA (mRNA) verhält. Sie ist am 3`Terminus polyadenyliert und trägt am 5`Terminus eine methylierte Kopfgruppe. Der Poly(A)-Schwanz und die Kopfgruppe bieten Schutz vor enzymatischem Abbau der RNA durch Endonukleasen.

Die Größe des Genoms liegt bei tiermedizinisch relevanten Retroviren zwischen 7000 und 11000 Basen, beim komplexen Genom des humanen Spumaretrovirus erreicht sie sogar 12000 Basen.

Die Genome aller infektiösen Retroviren kodieren mit offenen Leserahmen für die Produkte Gag (gruppenspezifische Antigene), Pol (enzymatische Aktivitäten) und Env (Glykoproteine). Die kodierenden Abschnitte werden am 3`- und am 5`-Ende des Genoms von regulatorischen Kontrollsequenzen flankiert, welche sowohl für die reverse Transkription als auch für die Integration der viralen Erbinformation in das Wirtszellgenom essentiell sind. Sie enthalten neben der Promotorsequenz auch die

Primer Binding Site (PBS). Diese ist mit dem 3`-Ende eines transfer-RNA (tRNA)-Moleküls über Basenpaarung komplexiert und übernimmt somit eine essentielle Rolle bei der reversen Transkription („Molekulare Virologie“, Kapitel 18, 2003).

Nach Ablauf der reversen Transkription liegt eine doppelsträngige DNA vor, welche in die zelluläre DNA integriert, es entsteht das Provirus. Das provirale Genom wird nun am 3`- und am 5`-Ende von den Long Terminal Repeats (LTR) eingefasst. Bei diesen regulatorischen Elementen handelt es sich um eine DNA-Sequenz, die an beiden Enden des integrierten retroviralen Genoms direkt wiederholt und nicht im retroviralen Genom gefunden wird. Die Long Terminal Repeats entstehen im Verlauf des Umschreibens der einzelsträngigen RNA in die DNA und lassen sich in die Regionen U3, R und U5 unterteilen. An die U3-Sequenzen binden insbesondere zelluläre, transaktive Proteine, welche die Transkription der integrierten Virusgene induzieren, während die U5-Region diejenigen Sequenzen enthält, die für die Integration des Provirus in das zelluläre Genom von Bedeutung sind. Des Weiteren enthalten sie einen aktiven RNA-Polymerase-II-Promotor, welcher die Transkription der integrierten Proviruskopien durch die Wirtszelle und damit eine neue Kopie des retroviralen Genoms erlaubt. Zusätzlich fördern sie die Integration der gebildeten Virus-DNA in das Wirtsgenom („Lexikon der Veterinärmedizin“, 2000). Die Initiation der viralen Transkription erfolgt entsprechend einem zellulären Gen durch Veränderung der Zusammensetzung der Transkriptionsaktivatoren und -repressoren am LTR. Dies konnte eindrucksvoll anhand der glukokortikoidgesteuerten Transkriptionsregulation am LTR des Maus-Mammatumor-Virus demonstriert werden (Collingwood et al., 1999).

#### **1.2.4 Genprodukte**

Retroviren besitzen für Gag, Pol und Env kodierende Sequenzen. Der *gag*-Leserahmen befindet sich unmittelbar stromabwärts des 5`-LTRs. Zum Komplex der kodierten gruppenspezifischen Antigene zählen Matrix- (MA), Kapsid- (CA) und Nukleokapsidproteine (NC) der infektiösen Virionen. Synthetisiert werden die Gag-Proteine als gemeinsames Vorläuferprodukt, welches durch die retrovirale Protease in die einzelnen Komponenten gespalten wird. MA und CA werden in der Wirtszellmembran eingelagert und während der als „budding“ bezeichneten Abknospung des Virions an der Zelloberfläche mit RNA beschickt und abgeschnürt (Kraeusslich und Welker, 1996). NC binden über ein Zinkfingermotiv an die virale RNA, kondensieren sie und bereiten sie so auf das „packaging“ vor. Komplexe Retroviren wie Spumaviren, Lentiviren und einige Vertreter der Onkoviren besitzen zusätzlich eine Vielzahl kleiner, offener Leserahmen zur Synthese akzessorischer Proteine, deren

Bedeutung in vielen Fällen bislang noch nicht eindeutig geklärt ist (Loewer et al., 1995).

Der *pol*-Leserahmen, dessen weitere Unterteilung in die Regionen *prt* und *pol* möglich ist, befindet sich im zentralen Bereich des Genoms stromabwärts des *gag*-Gens und kodiert für essentielle retrovirale Enzyme. Auch die Produkte des *pol*-Gens werden als Vorläuferprotein synthetisiert, hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein zwischen den Gag-Proteinen im aminoterminalen Bereich und den sich anschließenden Pol-Domänen. Zu der enzymatischen Ausstattung zählen die Protease (*prt*-kodiert), die Reverse Transkriptase und die Integrase (beide *pol*-kodiert). Bei der aktiven Protease handelt es sich um ein Dimer aus zwei identischen Proteineinheiten. Sie ist für die Prozessierung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine in die einzelnen Komponenten verantwortlich. Die reverse Transkriptase enthält mehrere funktionelle Aktivitäten: Sie besitzt neben einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase und einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase am C-terminalen Ende des Proteins auch eine Domäne mit RNase-H-Aktivität, die spezifisch RNA-Moleküle in RNA/DNA-Hybriden abbaut. Ihr fehlt jedoch ein Mechanismus zur Überprüfung der Lesegenauigkeit. Somit werden mit hoher Wahrscheinlichkeit falsche Basen in die neusynthetisierten Stränge eingebaut, was zur Entstehung von Virusmutanten führt. Die Integrase wirkt sowohl als Endonuklease als auch als Ligase. Sie bindet sich an die Enden des linearen revers transkribierten Virusgenoms und vermittelt dessen Integration in die DNA der Wirtszelle.

Der Leserahmen für das *env*-Gen befindet sich am 3'-Ende des viralen Genoms. Er kodiert ein Vorläuferprodukt, zum Beispiel gp160 bei HIV oder ein 80 kDa-Vorläuferprotein bei FeLV (Felines Leukosevirus), welches durch einfaches Spleißen aus der RNA hervorgeht, während *gag*- und *pol*-Proteine von ungespleißter Vollängen-RNA translatiert werden. Das Protein ist Bestandteil der Hüllmembran, wobei bei HIV der gp120-Anteil an der Außenseite der Virusmembran und der gp41-Anteil in der Virusmembran liegt. Die ausschließlich außerhalb der Wirtszellmembran bindende Untereinheit stellt den SU-Anteil dar (Surface), der membranäre Anteil den TM-Anteil (Transmembrane) (Abb.2). SU ist mittels Rezeptorbindung für die Adsorption des Virus zuständig. Das kleinere TM-Protein ist über eine hydrophobe Sequenz in der Membran verankert („Molekulare Virologie“, Kapitel 18, 2003).

### 1.3 Virusinduzierte Zelltransformation und Tumorgenese

Bereits 1910 gelang Peyton Rous, einem jungen Biologen und Arzt am Rockefeller Institute of Medical Research, der Nachweis, dass sich Hämösarkome einer bestimmten Hühnerart (Rous-Sarkom) mit zellfreien Extrakten auf andere Hühner übertragen lassen. Rous folgerte aus seinen Versuchen, dass sich in dem Extrakt ein winziger Erreger befinden musste, der den Tumor in den zuvor gesunden Tieren ausgelöst hatte. Erst Jahrzehnte später konnte sein Verdacht auf ein infektiöses Agens bestätigt und das Rous-Sarkom-Virus, ein Mitglied der Familie *Retroviridae*, als Tumovirus identifiziert werden. Hinweise, dass auch Retroviren existieren, die beim Menschen Tumorerkrankungen verursachen, fand man erst im Jahr 1980, als Robert Gallo die humanen T-Zell-Leukämieviren (HTLV) entdeckte (Poiesz et al., 1980). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind eine Vielzahl tierpathogener und ca. 220 humanpathogene Viren bekannt, die nach einer produktiven Infektion das Wachstum von Zellen fördern. Expertenschätzungen zufolge werden fünfzehn bis 20% aller humanen Tumorleiden ätiologisch durch Virusinfektionen ausgelöst („Molekulare Virologie“, Kapitel 6, 2003), wobei sowohl Viren mit DNA- als auch Viren mit RNA-Genom in die Tumorgenese involviert sein können.

#### 1.3.1 Tumorinduktion durch Viren mit DNA-Genom

Zu den klinisch relevanten humanpathogenen Vertretern zählen hierbei insbesondere die Papillomaviren, die neben Karzinomen der Genitalschleimhaut auch verschiedene maligne Hauttumoren verursachen können (Kirwan und Herold, 2002), und auch das Hepatitis-B-Virus, das an der Entstehung des primären Leberkarzinoms des Menschen beteiligt ist (Chen et al., 2004). Das Epstein-Barr-Virus, das als Erreger des Pfeifferschen Drüsenfiebers (infektiöse Mononukleose) bekannt ist, ist bei Menschen mit dauerhaft stark verminderter Immunkompetenz maßgeblich an der Entstehung von bösartigen Erkrankungen beteiligt. Es handelt sich dabei um Erkrankungen von B-Lymphozyten (B-Zell-Lymphome). Vermutet wird, dass das Virus auch bei der Entstehung von Hodgkin-Lymphomen eine Rolle spielen könnte (Hammerschmidt und Sugden, 2004). Außerhalb Europas wird ein maßgeblicher Zusammenhang mit der Entstehung des Burkitt-Lymphoms und des nasopharyngealen Karzinoms gesehen („Molekulare Virologie“, Kapitel 19, 2003). DNA-Viren besitzen keine klassischen *onc*-Gene, wie sie bei den Retroviren zu finden sind. Sie schalten durch bestimmte virale Regulatorproteine insbesondere die Funktion der zellulären Tumorrepressoren aus und

leiten so die maligne Entartung der Zellen ein („Molekulare Virologie“, Kapitel 19, 2003).

### **1.3.2 Tumorinduktion durch Retroviren**

Auch Retroviren als Viren mit Einzelstrang-RNA-Genom kommt als auslösendes Agens für Tumorerkrankungen sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin eine große Bedeutung zu. Das tumorerzeugende Potential akut transformierender Retroviren beruht auf den bereits angesprochenen transformationsaktiven Proteinen (*v-Onc*). Diese ähneln zellulären Produkten (*c-Onc*), die gewöhnlich an der geregelten Zellteilung beteiligt sind. Die viralen *Onc*-Proteine sind gegenüber zellulären Produkten durch Mutationen derart verändert, dass sie keiner Kontrolle mehr unterliegen und somit konstitutiv aktiv sind („Molekulare Virologie“, Kapitel 18, 2003). Die Wirtszelle kann spontan zur Urzelle eines wuchernden Klons von Tumorzellen werden. Viele dieser onkogenen Viren sind jedoch defekt. Ihnen fehlen essentielle Informationen für einen produktiven Infektionszyklus. Diese sind unter Umständen durch die Sequenzen der Onkogene ersetzt. Für die Produktion infektiöser Viren und ihre Weiterverbreitung benötigen die defekten Retroviren die Hilfe eines weiteren Virus, welches als Helfervirus die fehlenden Funktionen ergänzt. Ein Beispiel für diese Art der Kooperation stellt die Infektion der Katze mit dem feline Leukosevirus (FeLV) dar. Dieses koexistiert in der Katzenpopulation mit dem feline Sarkomvirus (FeSV), welches nicht horizontal übertragen werden kann („Kleintieronkologie“, Teil I, Kapitel 2, 1999), sondern neu durch Rekombination zwischen dem Genom des FeLV und Genen der Wirtszelle entsteht („Kleintieronkologie“, Teil I, Kapitel 2, 1999). Das feline Sarkomvirus ist ein defektes, nicht replikationsfähiges Retrovirus, dessen *env*-Gen deletiert ist, das aber stattdessen ein virales Onkogen (*v-myc* oder *v-fms*) besitzt. Seine Vermehrung ist von der gleichzeitigen Infektion der Zellen mit dem feline Leukosevirus abhängig, welches Helferfunktionen, so z.B. die Env-Proteine, für die Morphogenese und Freisetzung neuer feline Sarkomviren zur Verfügung stellt („Molekulare Virologie“, Kapitel 18, 2003). Das Rekombinationsereignis führt zur Entstehung akut transformierender Viren. Die beiden genannten Viren FeLV und FeSV sind in der Veterinärmedizin auch aus seuchenhygienischen Aspekten von essentieller Bedeutung. Die primären Folgen einer FeLV-Infektion bestehen in der Genese lymphatischer Leukosen und myeloproliferativer Tumoren. Die Infektion mit FeLV/FeSV wiederum führt zur Entstehung von Fibrosarkomen („Kleintieronkologie“, Teil I, Kapitel 2, 1999). Ein Retrovirus von besonderer humanmedizinischer Bedeutung ist das humane T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV-1). Bei Erwachsenen vermag es lympho-

proliferative Erkrankungen CD4-tragender T-Lymphozyten auszulösen (Sieburg et al., 2004).

Jedoch nicht alle in die Tumorgenese involvierten Retroviren sind onkogentragend. Bei nicht onkogentragenden Retroviren basiert der Mechanismus auf der zufälligen Integration in ein zelluläres Gen oder in unmittelbare Nähe eines zellulären Gens, welches an der Wachstumskontrolle beteiligt ist (Proto-Onkogen oder Tumorsuppressorgen). Aus dem Einbau des viralen Genoms unmittelbar vor einem Onkogen resultiert eine Überexpression oder eine zeitlich fehlerhafte Determination der Genexpression. Eine Integration mit nachfolgender Beeinflussung eines Tumorsuppressorgens führt bei Verlust des entsprechenden Genproduktes zur Wachstumsenthemmung und damit zur Tumorentwicklung („Molekulare Virologie“, Kapitel 18, 2003).

Wiederum einen anderen Mechanismus der Tumorinduktion nutzt das Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV), ein in der Schafpopulation sowohl exogen als auch endogen existierendes Retrovirus. Während dem endogenen JSRV (enJSRV) durch den Mechanismus der Interferenz eine positive Auswirkung auf den Wirtsorganismus zugesprochen wird, da dieser Schutz vor einer Infektion mit dem exogenen Virus bietet (Kapitel 1.7.2), induziert das exogene JSRV pulmonale Adenokarzinome aufgrund der onkogenen Eigenschaften seines Hüllproteins selbst. Hierbei handelt es sich um eine Env-medierte Aktivierung der zellulären Proliferation. Dabei stellen die zytoplasmatische TM-Region sowie bestimmte Domänen der SU-Region die ausschlaggebenden Determinanten zur Zelltransformation dar (Leroux et al., 2007).

#### **1.4 Endogene retrovirale Elemente**

Bei endogenen Retroviren (ERV) handelt es sich um Elemente, die während der Evolution in die Genome der menschlichen Vorläuferspezies integriert und in der Population fixiert wurden (Barbulescu et al., 1999). Sie existieren vermutlich als endogen integrierte Varianten exogener Virusarten (Loewer et al., 1996) und stellen somit „fossile“ Überreste exogener Retroviren dar. Das Maus-Mammatumor-Virus und das Jaagsiekte Sheep Retrovirus beispielsweise werden sowohl als exogene als auch als endogene Agenzien in ihren Wirtsspezies gefunden (Loewer et al., 1996; de Martini et al., 2003). ERVs bilden den Ursprung der heute im menschlichen Genom zu findenden retroviralen Sequenzen. Wird eine Zelle der Keimbahn infiziert, kann das Provirus auf die nächste Generation übertragen werden und ist somit in jeder Zelle dieses Organismus vorhanden. Endogene Retroviren werden vertikal über die Keimbahn weitergegeben und entsprechend den Mendelschen Gesetzen an die

Folgegenerationen vererbt (Nelson et al., 2003). Vermutlich enthalten die Genome aller Vertebraten einen erheblichen Anteil an endogenen Retroviren. Auch in Pflanzen, Pilzen, Eukaryoten und Prokaryoten, die den Mechanismus der reversen Transkription zur Reproduktion verwenden, wurden retrovirusähnliche genetische Elemente, sogenannte Retrotransposons, entdeckt (Garfinkel, 1992). Retrotransposons unterscheiden sich von echten Retroviren einzig durch das Fehlen der Hüllproteine aufgrund eines deletierten oder defekten *env*-Gens. Sie sind von großem wissenschaftlichem Interesse, da sie einen Einblick in Herkunft und Entwicklung von Retroviren und insbesondere der retroviralen Sequenzen geben, die als HERVs bezeichnet werden (Urnovitz und Murphy, 1996). Es wird vermutet, dass die endogenen Retroviren sich nach der ersten Integration innerhalb des Genoms vermehrt und damit wesentlichen Einfluss auf das Wirtsgenom genommen haben. Die Mehrzahl dieser im Genom integrierten Viren ist jedoch nicht mehr replikationskompetent. Je länger die Integration des Retrovirus im Verlauf der Evolution zurückliegt, desto wahrscheinlicher ist es, dass durch Mutationsereignisse Defekte entstehen. Oft sind nur noch die ursprünglich das Virusgenom flankierenden LTR-Sequenzen vorhanden (Loewer et al., 1996). Diese sind weder selbst produktiv noch können sie über ein Helfervirus aktiviert werden.

### **1.5 Die Bedeutung animaler endogener Retroviren für die Xenotransplantationsmedizin**

Auch in der Veterinärmedizin sind endogene Retroviren wie das BaEV (Baboon Endogenous Retrovirus) oder das PERV (Porcines Endogenes Retrovirus) bekannt. Eine besondere Rolle spielen diese beiden Retroviren in der kontrovers diskutierten und disziplinenübergreifenden Xenotransplantationsmedizin. Die beiden genannten Viren sind zwar nicht mehr in der Lage, eine aktive Infektion in ihrem natürlichen Wirt hervorzurufen, sie produzieren allerdings infektiöse Viren (Patience et al, 1997). Diese Viren sind zum Teil xenotrop und können somit Zelllinien anderer Spezies wie die des Menschen infizieren (Huang et al., 1989; McAllister et al., 1978). Da endogene Retroviren im Genom jeder Zelle vorhanden sind und zum heutigen Zeitpunkt keine Möglichkeit besteht, sie aus dem Genom zu entfernen (Boneva et al., 2001), stellt sich die Frage, ob die Xenotransplantationsmedizin in ihrer Durchführung nicht ein hohes Risiko für die menschliche Population darstellt. In den letzten zehn Jahren wurden detaillierte Infektionsstudien insbesondere mit PERV durchgeführt. Dessen Wirt, das Schwein, stellt die Tierart dar, die aus anatomischen, immunologischen und ethisch-moralischen Gesichtspunkten als Lieferant für Xenotransplantationsprodukte am

geeignetsten scheint. Die Schwein-zu-Mensch-Xenotransplantation birgt das Potential, den Mangel an allogenen Organen zur Transplantation zu beheben (Advisory Group on the Ethics of Xenotransplantation for the Departement of Health, 1997). Eine Untersuchung der Infektiosität zweier porciner Zelllinien (PK15 und MPK) durch Patience et al. (1997) belegte unter anderem die Entwicklung einer produktiven Infektion einiger Zellen der menschlichen Zelllinien 293 und HT1080 nach Kokultivierung mit röntgenbestrahlten PK15-Zellen. Auch PBMCs (Peripher Blood Mononuclear Cells) wurden infiziert, diese allerdings im Rahmen einer nichtproduktiven Infektion. Wilson et al. (1998) führten Studien an primären bzw. sekundären Schweinezellen durch. Primäre porcine PBMCs setzten nach mitogener Stimulation Retrovirus Typ C-Partikel frei und zeigten die Fähigkeit zur Infektion porciner ST-lowa-Zellen und menschlicher 293-Zelllinien. Nach Kokultivierung mitogen aktivierter porciner PBMCs mit Zelllinien von Mensch oder Schwein konnte die Expression PERV-spezifischer Sequenzen und die Entwicklung einer produktiven Infektion nachgewiesen werden. Die Freisetzung von infektiösem PERV mit der Fähigkeit zur Infektion humaner Zelllinien erfolgt also nicht nur durch Zellen aus Schweinezelllinien, sondern auch durch primäre Schweinezellen (Martin et al., 1998).

Takeuchi et al. (1998) gelang es mittels eines Vektor-Transduktions-Assays drei PERV-Typen (PERV-A, -B und -C) zu identifizieren, die sich zwar im *env*-Gen deutlich voneinander unterscheiden, im restlichen Genom aber eine hohe Sequenzhomologie aufweisen. Auf den Zellen diverser Spezies, unter anderem des Menschen, können PERV-A- und PERV-B-Rezeptoren nachgewiesen werden. Eine Infektion sowohl menschlicher als auch porciner Zelllinien ist durch alle PERV-Typen möglich, woraus sich schlussfolgern lässt, dass prinzipiell das Potential zur Replikation im Xenograft und zur Infektion immunsupprimierter menschlicher Empfänger vorhanden ist.

Van der Laan et al. (2000) wiesen nach Transplantation von Schweinepankreaszellen in NOD/SCID-Mäuse tatsächlich eine PERV-Expression mit limitierter Infektion muriner Zellen in verschiedenen Gewebekompartimenten nach. Nach Transplantation von Schweinepankreaszellen in immundefiziente Mäuse fand eine „Cross-Species“-Transmission *in vivo* statt, wobei PERV durch Pankreaszellen produziert wurde.

Dennoch ergaben limitierte Studien an Menschen, die aus therapeutischen Gesichtspunkten kurzzeitig mit Schweinezellen/-geweben in Kontakt gekommen sind, keine klinischen oder labordiagnostisch erfassbaren Nachweise einer PERV-Infektion (Patience et al., 1998). Bis heute wurden aber noch keine Studien publiziert über Infektionen von primären humanen Zellen durch PERV, welches aus primären porcinen Zellen stammt. Daher und weil – auch für den Fall, dass sich die tierexperimentellen Studien nicht auf die Spezies Mensch übertragen lassen – die potentielle Gefahr der

Chimärenbildung zwischen humanen endogenen Retroviren und den Retroviren anderer Spezies besteht, wird die Xenotransplantationsmedizin kritisch hinterfragt. Das ethische Komitee der International Xenotransplantation Association hat Empfehlungen zur Wahrung ethischer Standards ausgesprochen. Fortschritte in der Xenotransplantationsmedizin werden abhängig sein von der Entwicklung der Schweine-Modelle, neuen immunsuppressiven Strategien und neuen Wegen zur Schaffung einer spender-spezifischen Toleranz. Man erhofft sich, dass die Xenotransplantation zukünftig das medizinische Dilemma einer zwar ausgereiften medizinischen Technik, jedoch unzureichenden Anzahl an menschlichen Spenderorganen lösen wird (Cox und Zhong, 2005).

### **1.6 Humane endogene Retroviren**

Ungefähr acht Prozent des menschlichen Genoms bestehen aus endogenen retroviralen Elementen (International Human Sequencing Consortium, 2001). Dabei zeigen Untersuchungen über die Verteilung dieser retroviralen Elemente im menschlichen Organismus eine hohe Verteilungsdichte auf den Chromosomen 4 und 20 sowie auf den beiden Geschlechtschromosomen X und Y (Kim et al., 2004). Das erste humane endogene Retrovirus wurde 1981 beschrieben (Martin et al., 1981). In den letzten beiden Jahrzehnten konnten daraufhin über zwanzig HERV-Familien identifiziert werden (Coffin, 1985; Leib-Moesch et al., 1990; Tristem, 2000). HERVs zeigen eine ähnliche genomische Organisation wie exogene Retroviren. Ihr Genom setzt sich aus den Regionen *gag*, *pol*, und *env* zusammen, welche sandwichartig von den LTR-Abschnitten eingefasst werden. Retroviren kompensieren die im Vergleich zu anderen pathogenen Viren relativ geringe Größe des Genoms durch die Verwendung mehrerer offener Leserahmen. Obwohl viele HERVs aufgrund einer Anhäufung von Mutationen und Terminationssignalen im genetischen Code defekt sind, besitzt dennoch eine begrenzte Anzahl von Viren das Potential, virale Produkte und virusähnliche Partikel zu produzieren (Nelson et al., 2003). Dabei führten zahlreiche Untersuchungen jedoch zu dem Ergebnis, dass diese Partikel keine Infektiosität mehr besitzen (Toenjes et al., 1997). Des Weiteren werden einige humane endogene Retroviren mit der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen und der Entstehung von Krebs in Zusammenhang gebracht (Boller et al.; 1993, Nelson, 1995; Nelson et al., 1999) (Kapitel 1.7).

### **1.6.1 Einteilung humaner endogener Retroviren**

Während die Klassifikation humaner endogener Retroviren sich über lange Zeit an Sequenzvergleichen mit animalen Retroviren orientierte (Wilkinson et al., 1994; Loewer et al., 1996), wird derzeit die tRNA-assoziierte Aminosäure als Einteilungskriterium genutzt, welche als Primer bei der Initiation der reversen Transkription dient. In der Nomenklatur wird das entsprechende Kürzel des Einbuchstaben-Codes der Aminosäuren an die Abkürzung HERV hinzugefügt. Die Unterteilung erfolgt wiederum in die Klassen I, II und III (Tabelle 1). Zur Klasse I zählen Viren, die ursprünglich zur Initiation der reversen Transkription tRNAs nutzten, die ein Glutamat (E)-, Arginin (R)-, Histidin (H)- oder Tryptophan (W)-spezifisches Antikodon besitzen. Sie zeichnen sich durch ihre Homologie zum Genus Gammaretrovirus aus. Es resultieren somit unter anderem die endogenen Retroviren HERV-E, -R, -I, -H und HERV-W. Retroviren der Klasse II nutzen eine Lysin(K)-assoziierte tRNA und werden entsprechend als HERV-K bezeichnet (Jurka, 2000). Sie zeigen eine Sequenzhomologie zu den Betaretroviren. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu MMTV im Bereich der *pol*-Region werden die HERV-Ks um den Terminus HML (human MMTV-like) ergänzt und – basierend auf Sequenzhomologien im RT-Bereich – in Gruppen von HML-1 bis HML-6 untergliedert. Diese sechs Subfamilien wurden im Jahre 1999 von Andersson et al. um vier neue Vertreter erweitert.

Die Klasse III, deren Mitglieder eine schwache Homologie zu den Spumaviren aufweisen, stellt insgesamt eine relativ heterogen zusammengesetzte Klasse dar.

Da bis heute noch keine einheitliche und eindeutig definierte Nomenklatur der Virustaxonomie existiert, werden die Mitglieder der einzelnen HERV-Klassen gewöhnlich als Familien bezeichnet, zum Beispiel Familie HERV-K. Streng genommen handelt es sich dabei jedoch nur um phylogenetisch verwandte Gruppen (persönliche Mitteilung PD Dr. Jens Mayer). Auch in dieser Arbeit findet der Begriff „Familie“ in diesem Zusammenhang Verwendung.

Eine Übersicht über die bedeutendsten HERV-Familien ermöglicht die nachfolgende Tabelle. Dabei bezieht sich die in Klammern angegebene Zahl in Spalte drei auf die Anzahl solitärer LTRs im humanen Genom.

Tabelle 1: Wichtigste Vertreter der humanen endogenen Retroviren<sup>2</sup>

übliche Bezeichnung	weitere Namen	Kopien/haploidem Genom
<b>Klasse I</b>		
HERV-I	RTL1	250 (1000)
HERV-E		250 (1000)
HERV-R	ERV-3	100 (125)
HERV-W	MSRV	40 (1100)
HERV-9	ERV-9	300 (5000)
HERV-H	RTL1-H, RGH	1000 (1000)
<b>Klasse II</b>		
HML-1	NM1V6	70 (350)
HERV-K(HML-2)	HERV-K, HERV-K10	60 (2500)
	HTDV, NM1V1	
HML-3	NM1V5	150 (700)
HML-4	HERV-K(T47D)	10 (800)
HML-5	NM1V2	100 (600)
HERV-K(HML-6)	NM1V4	50 (400)
HML-7	NM1V7	20 (140)
HML-8	NM1V3	60 (600)
HML-9	NM1V9	10 (40)
HERV-K(C4)	HML-10	10 (100)
<b>Klasse III</b>		
HERV-L		200 (6000)
HERV-S		50 (150)

### 1.6.2 Das Humane Endogene Retrovirus K

Mitglieder von HERV-K gehören zu den biologisch aktivsten humanen endogenen Retroviren (Toenjes et al., 1996). Sie sind die einzigen bekannten endogenen Retroviren mit intakten Leserahmen zur Synthese der zur Replikation erforderlichen Proteine. HERV-K wird der Klasse II zugeordnet (Tabelle 1).

Es werden zwei Typen von HERV-K-Proviren differenziert (Abb. 3). Sie unterscheiden sich in einer 292 bp langen Deletion im Grenzbereich zwischen *pol* und *env* (Loewer et al., 1993). 1986 veröffentlichten Ono et al. die aus zwei Klonen zusammengesetzte Sequenz von HERV-K10(+), einem neuen 9469 bp langen endogenen Retrovirus. HERV-K10(+) besitzt ein Stopcodon sowohl im putativen *gag*- als auch im *env*-Gen. Später wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass HERV-K sowohl für *gag* als auch für *env* vollständige offene Leserahmen besitzt (Loewer et al., 1993; Mueller-Lantzsch et al., 1993). Inzwischen werden zwei Typen von HERV-K

<sup>2</sup> nach Mager und Medstrand, *Encyclopedia of the human Genome*, 2003; gekürzt und modifiziert

beschrieben, Typ 2 mit einer Länge von 9471 bp sowie Typ 1, welcher eine Deletion von 292 bp im Übergangsbereich von *pol* zu *env* aufweist (Loewer et al., 1995).

Bis heute wurden zehn verschiedene HERV-K(HML-2) Typ 1 und elf verschiedene Proviren vom Typ 2 genauer charakterisiert (Barbulescu et al., 1999; Costas, 2001; Sugimoto et al., 2001; Turner et al., 2001).

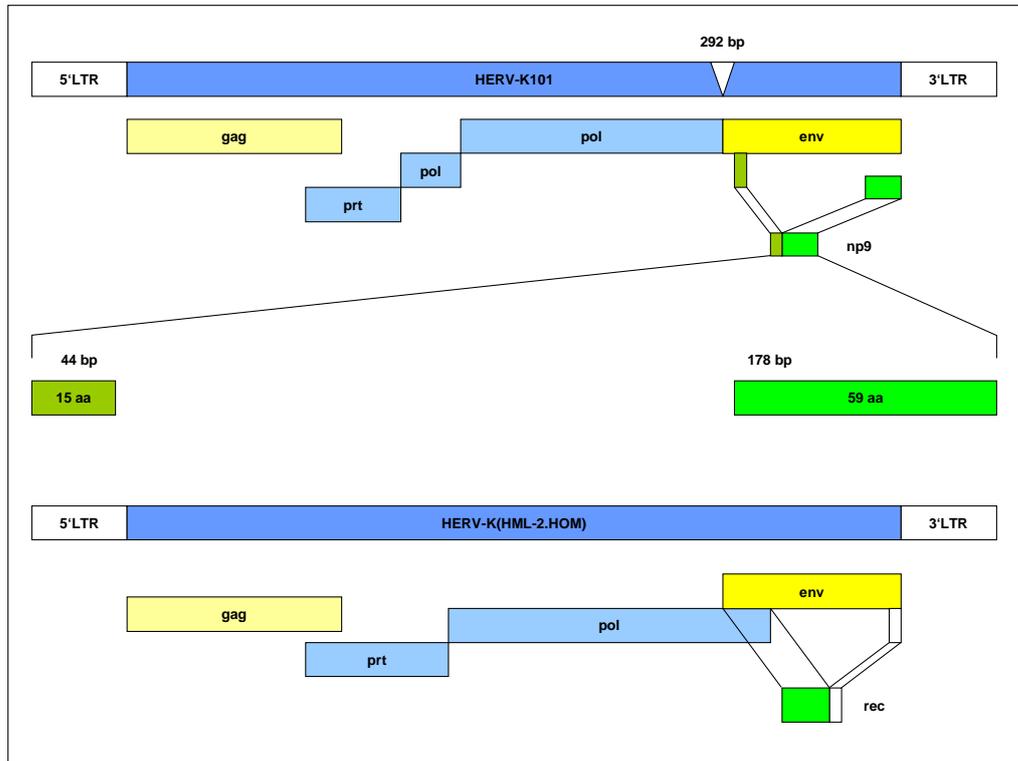


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Proviren HERV-K101 und HERV-K(HML-2.HOM).

Die beiden Proviren stellen repräsentative Vertreter der endogenen Retroviren Typ 1 (HERV-K101) und Typ 2 (HERV-K(HML-2.HOM)) dar. Die typunterscheidende 292 bp-Deletion ist durch einen Keil gekennzeichnet. Die unterschiedlichen Ebenen signalisieren die unterschiedlichen Leseraster der bislang charakterisierten Gene *gag*, *prt*, *pol* und *env*; *np9* und *rec* gehen durch alternatives Spleißen aus dem *env*-Leserahmen hervor.

Zwischenzeitlich sind zahlreiche HERV-K-Allele auf humanen Chromosomen detektiert und untersucht worden. Mayer et al. fanden 1999 ein auf Chromosom 7 lokalisiertes, als HERV-K(HML-2.HOM) bezeichnetes Provirus, das offene Leseraster für alle grundlegenden viralen Proteine zeigt und nur in einer für die Aktivität der reversen Transkriptase essentiellen Aminosäuresequenz Mutationen aufweist. Daher ist das Enzym vermutlich nicht aktiv. Spätere Analysen zeigten, dass das Provirus als „tandem repeat“ organisiert ist, wobei die HERV-K(HML-2)-„tandem repeat“-Struktur weiteren Untersuchungen verschiedener humaner DNA-Proben zufolge eine relativ weite Verbreitung vermuten lässt (Reus et al., 2001). Zusätzlich konnte in dieser Studie die Existenz von HERV-K(HML-2)-Allelen nachgewiesen werden, welche ein intaktes

YXDD-Motiv innerhalb der Domäne der reversen Transkriptase aufwiesen und somit potentiell für eine aktive reverse Transkriptase kodieren könnten.

## 1.7 Biologische Relevanz endogener Retroviren

### 1.7.1 Einfluss retroviraler Insertionen auf zelluläre Regulationsmechanismen

Die Untersuchung der Plazenta, die das ERV-expressionsreichste Gewebe darstellt, ermöglichte die Darstellung der Regulationsmechanismen endogener Retroviren bezüglich benachbarter Gene (Prudhomme et al., 2005). Der Wachstumsfaktor Pleiotropin (*PTN*) wird hauptsächlich im zentralen Nervensystem im Verlauf der perinatalen Periode exprimiert. Die Insertion eines HERV-E-Elementes oberhalb des ersten Exons des *PTN*-Gens schafft einen neuen retroviralen Promotor, HERV-E LTR (Schulte et al., 1996). Dieser zusätzliche Promotor steuert die Expression des HERV-E.*PTN*-Transkriptes in normalen Trophoblast-Zellen und in Choriocarcinoma-Zelllinien. Durch die Insertion von HERV-E entsteht ein Tropismus des Nervensystems zur Plazenta. HERV-E führt ebenso zur plazentalen Expression des Endothelin-B-Rezeptor-Gens, *EDNRB* (Medstrand et al., 2001). Das native *EDNRB*-Transkript kann in diversen Geweben gefunden werden, wogegen das LTR-gesteuerte Transkript auf plazentales Gewebe limitiert erscheint. HERV-E LTR bedingt die Expression eines signifikanten Anteils der gesamten *EDNRB*-Transkripte, woraus sich schlussfolgern lässt, dass die LTR-Region als starker Promotor und Enhancer fungiert. Das Opitz-Syndrom Gen, *MID1*, wird ebenfalls in vielen Geweben exprimiert. Der plazentale Tropismus wird - wie bei *EDNRB* - verstärkt durch die Präsenz eines HERV-E-Elementes, welches sowohl gewebsspezifische Promotor- als auch Enhancer-Funktionen verleiht (Landry et al., 2002).

Familie HERV-E ist weiterhin involviert in die zelluläre Genregulation verschiedener Gewebe. Sie besitzt Enhancer-Funktionen für das Amylase-Gen der Speicheldrüsen (Ting et al., 1992) und zusätzliche Promotor-Aktivität bezüglich des Apolipoproteins C1 in vielen Geweben (Medstrand et al., 2001). Ein HERV-K-Gen inseriert sehr nah am Insulin-like growth-factor-Gen, *INSL4*, und verleiht dessen Promotor neue funktionelle Charakteristika. Der 3'-LTR dieses HERV-Elementes scheint die Plazenta-spezifische Expression des *INSL4*-Gens während der Bildung der Syncytiotrophoblasten zu vermitteln (Bieche et al., 2003). Die genannten Beispiele verdeutlichen, dass nicht nur kodierende Gensequenzen, sondern insbesondere die nicht kodierenden Bereiche wie die LTRs dazu in der Lage sind, Einfluss auf die Regulationsmechanismen der Zelle auszuüben. Schließlich wurde für das Growth Hormone Receptor-Gen (*GHR*) in der

Plazenta auch ein neuer Mechanismus beschrieben, der endogene Retroviren mit alternativem Splice-Mimikry in Verbindung bringt (Pantel et al., 2000).

### **1.7.2 Die Bedeutung endogener Retroviren für die Plazentation**

Im Plazentationsprozess wird ERV-Proteinen durch den Aspekt der Interferenz ein Schutz des Wirtsorganismus vor Infektionen mit exogenen Retroviren zugesprochen. Zwei Mechanismen aus *in vitro*-Studien im Mausmodell deuten eine funktionelle Hypothese für HERV Gag und Env in der Plazenta an. Ein Gag-verwandtes Protein eines ERV-ähnlichen Elementes, das *Fv1* (Friend virus susceptibility-1)-Genprodukt, schafft es, exogene Viren im frühen viralen Lebenszyklus zu blocken, indem es einen Schritt des Zyklus vor der Integration ins Wirtsgenom stört (Best et al., 1996; Goff, 1996). In der menschlichen Plazenta wurden zwei HERV Gag-Proteine detektiert: HERV-W-Gag (Voisset et al., 2000), und HRES-1-Gag (Perl et al., 1989). Obwohl weder Funktion noch Lokalisation genau bekannt sind, könnten diese Proteine in einen solchen Mechanismus der Interferenz involviert sein (Blond et al., 2000). Eine weitere Studie demonstriert, dass bereits viral infizierte Zellen resistent sind bezüglich einer Superinfektion durch ein weiteres Virus, welches denselben Rezeptor nutzt. So hält das murine *env*-Produkt *Fv4* das exogene MLV (Murine Leukemia Virus) durch Rezeptor-Interferenz davon ab, die Wirtszelle zu infizieren (Nihrane et al., 1996). Auch dem *env*-Gen des endogenen JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus), welches in der ovinen Plazenta transkribiert wird (Spencer et al., 2003), wird durch Absättigung des zellulären Rezeptors Hyal-2 eine Schutzfunktion vor Infektion mit dem exogenen JSRV zugesprochen. In der menschlichen Plazenta werden drei Env-Proteine exprimiert: HERV-E (4-1) (Kitamura et al., 1994), ERV-3 (Kato et al., 1987), und HERV-W (Blond et al., 2000; Mi et al., 2000). Eine Interaktion mit einem Typ-D-Retrovirus-Rezeptor ist für HERV-W beschrieben (Blond et al., 2000). Zum anderen wird vermutet, dass die Proteine endogener Retroviren zu einer Immunsuppression führen, welche die Plazenta vor einer immunologischen Reaktion des maternalen Organismus schützt. Deren immunsuppressive Region kann Zytokine der Typen 1 und 2 modulieren und den Klasse I-MHC unterdrücken (Haraguchi et al., 1995). Im Mausmodell konnte diese Eigenschaft für HERV-H-Env demonstriert werden (Mangenev et al., 2001). Jedoch nicht alle der drei bereits genannten Env-Proteine zeigen die immunsuppressive Domäne. Tatsächlich sind die Proteine ERV-3 bei einem Prozent der kaukasischen Bevölkerung und HERV-E (4-1) generell um diese spezifische Region gekürzt, was wiederum Zweifel bezüglich der immunmodulierenden Kapazität dieser beiden HERVs aufwirft (Prudhomme et al., 2005). Die Proteine endogener Retroviren werden auch mit der Plazenta-Morphogenese assoziiert. Der Locus ERVW1 der Familie HERV-W

kodiert für ein Volllängen-*env* (Blond et al., 1999), bei dessen Produkt es sich um ein Membranfusionsprotein, Syncytin, handelt, welches *in vitro* die Bildung mehrkerniger Riesenzellen induziert (Blond et al., 2000; Mi et al., 2000). ERVWE1 Env-Protein wurde in der Syncytiotrophoblastenzellschicht der menschlichen Plazenta entdeckt, woraus auf eine Funktion in der Differenzierung der Cytotrophoblasten zu Syncytiotrophoblasten geschlossen wird (Blond et al., 2000; Frendo et al., 2003).

### **1.7.3 Negative Aspekte retroviraler Insertionen für den Wirtsorganismus**

Auf dem veterinärmedizinischen Sektor ist die kausale Beteiligung endogener Retroviren an klinisch apparenten Krankheitsbildern bei Mäusen und Hühnern (Vogt und Friis, 1971; „Fields Virology“, Chapter 55, 2007) eindeutig nachgewiesen. Das MMTV induziert bei Mäusen Neoplasien der Brustdrüse, das MLV ruft bei derselben Spezies Leukämien hervor.

Kontrovers diskutiert wird im humanmedizinischen Sektor die Beteiligung humaner endogener Retroviren an der Entstehung psychischer Erkrankungen wie Schizophrenie und schizoaffektiven Störungen (Frank et al., 2005) sowie an der Genese von Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematosus (Talal et al., 1992), rheumatischer Arthritis (Nelson, 1995; Nelson et al., 1999), Schuppenflechte (Molès et al., 2005) oder Typ-I-Diabetes (Conrad et al., 1997). Bei einigen Krankheitsbildern wie dem Typ-I-Diabetes konnte der vermutete Zusammenhang in neueren Untersuchungen bereits verworfen werden (Badenhoop et al., 2005). Für das bereits angesprochene HERV-W-kodierte Glykoprotein Syncytin (Kapitel 1.7.2) konnte wiederum eine eindeutige Assoziation mit der Genese der Multiplen Sklerose nachgewiesen werden. Bei Multiple-Sklerose-Patienten wurde eine erhöhte Expression dieses Proteins in Gliazellen innerhalb der akut demyelinierenden Läsionen detektiert. Die Expression von Syncytin in Astrozyten induziert die Freisetzung von Redox-Reaktionspartnern, welche sich toxisch auf Oligodendrozyten auswirken. Dies wiederum führt zu einer Syncytin-medierten Nervenentzündung (Antony et al., 2004). Eine Implikation humaner endogener Retroviren in karzinogene Erkrankungen des männlichen Reproduktionstraktes wurde in diversen Studien detektiert. In Epithelzellen von Prostatatumoren wurde die simultane Expression von ERV-3 und HERV-E(4-1) *env* mRNA beobachtet, nicht jedoch in gesundem Prostatagewebe oder in Gewebe von Patienten, die unter anderen Prostataerkrankungen litten (Wang-Johanning et al., 2003). HERV-K/HTDV wird nur im Kontext mit Tumoren des männlichen Reproduktionstraktes exprimiert (Boller et al., 1993; Larsson et al., 1994). In Keimzelltumoren wurden sowohl HERV-K-Transkripte als auch Partikelbildung beschrieben (Herbst et al., 1999) und im Serum von Seminompatienten und Patienten

mit Teratokarzinomen finden sich signifikante Mengen an Anti-HERV-K-Antikörpern (Sauter et al., 1995; Boller et al., 1997; Goeddert et al., 1999; Kleiman et al., 2004). Diese Antikörper wurden bei Seminompatienten in manchen Fällen über sechs Monate vor der Diagnose des Tumors nachgewiesen (Goeddert et al., 1999). Sauter et al. (1996) konnten belegen, dass die Antikörper-Serumspiegel nach erfolgreicher Therapie des Tumors auch wieder absinken.

Die Arbeitsgruppe Herbst, die sich intensiv mit der Genese von Keimzelltumoren befasst hat, konnte 1998 belegen, dass sich die verschiedenen Keimzelltumorarten alle von einer gemeinsamen Vorläuferläsion ableiten lassen. Diese Vorläuferläsion wird als *Carcinoma in situ* bezeichnet und weist bereits HERV-K-Expression auf (Herbst et al., 1998). Beeindruckend konnten Galli et al. (2005) folgend einen Nachweis für die Korrelation zwischen der Expression von *rec*, einem Spleißprodukt des *env*-Leserahmens von HERV-K(HML-2) (Abb. 3), und der Entstehung von Keimzelltumoren in Mäusen erbringen (Kapitel 1.8.2), welche als eindeutiger Hinweis für eine Tumorinduktion durch ein endogenes Retrovirus gewertet werden kann.

Auch der Zusammenhang zwischen der Entstehung des weiblichen Brustkrebses und humanen endogenen Retroviren wird eingehend untersucht. Ono et al. (1987) zeigten, dass die Östradiol- und Progesteron-induzierte Brustkrebs-Zelllinie T47 virus-ähnliche Partikel produziert und zytoplasmatisch HERV-K mRNA exprimiert. Die Partikel enthalten RNA-Sequenzen von HERV-K. Geringe Mengen an HERV-R mRNA konnten auch in Patienten mit kleinzelligem Lungenzellkarzinom detektiert werden (Anderson et al., 1998). Ansteigende HERV-K-Expression wird auch verzeichnet im Zusammenhang mit Östrogen- oder Progesteron-Behandlungen, weshalb vermutet wird, dass sich in der regulatorischen Region von HERV-K „hormone responsive elements“ befinden (Wang-Johanning et al., 2003). Diese Daten lassen einen Zusammenhang zwischen ERV-Expression in Mammatumoren und hormoneller Stimulation vermuten.

Unabhängig von ihrer Expression können endogene Retroviren das Wirtsgenom auch durch Rekombinationen beeinflussen, was zu chromosomalen Aberrationen und gezielter abnormaler Regulation benachbarter Gene führt. Ein Beispiel hierfür ist das Sertoli-only-cell-Syndrom. Hier kommt es durch Rekombination zwischen Elementen von HERV15-Proviren, welche die Region des Azoospermie-Faktors in derselben Orientierung flankieren, zur Deletion des Faktors mit dem Resultat der phänotypischen Infertilität aufgrund des Fehlens von Keimzellen (Blanco et al., 2000; Kamp et al., 2000; Sun et al., 2000). Vielen Tumortypen gemeinsam ist weiterhin die Aktivierung von Proto-Onkogenen der *ras*-Familie. Auch hier sprechen Studien HERV-K eine bedeutende Rolle zu (Bera et al., 1998).

## **1.8 Genprodukte von HERV-K(HML-2)**

### **1.8.1 Expression von Partikeln und Proteinen**

Loewer et al. konnten erstmals 1984 virale Partikel in Überständen der Zelllinie GH isolieren. Neun Jahre später gelang es Boller et al. (1993), diese HTDV-Partikel (Human Teratocarcinoma-Derived Virus Like Particle) als HERV-K(HML-2)-kodierte Partikel zu identifizieren. Eine durch diese Partikel verursachte Infektion konnte nicht nachgewiesen werden (Toenjes et al., 1997). Sauter et al. wiesen 1995 in Zellen der Zelllinie Tera-1 und in Gewebe von Seminompatienten Proteine nach, die vom gag-Leserahmen von HERV-K kodiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine spezifisch mit Keimzelltumoren assoziiert sind. Anhand serologischer Untersuchungen von Patienten mit Keimzelltumoren wurde der Nachweis erbracht, dass HERV-K-Proteine immunogenes Potential besitzen. Im Serum der untersuchten Patienten wurde die Produktion Gag-spezifischer Antikörper nachgewiesen. Auch gegen Env gerichtete Antikörper wurden im Rahmen dieser Studie detektiert.

Neuere Studien belegen, dass HERV-K TM- und Gag-Proteine auch in Melanomen und Melanommetastasen exprimiert werden. Auch hier konnten im Serum betroffener Patienten Antikörper gegen HERV-K nachgewiesen werden (Buescher et al., 2005).

### **1.8.2 Das akzessorische Protein Rec**

Loewer et al. wiesen 1995 die Expression eines Proteins der Masse 14 kDa in verschiedenen von Keimzelltumoren abgeleiteten Zelllinien nach. Diesem Protein, welches von einer zusätzlich gespleißten *env* mRNA von HERV-K(HML-2) translatiert wird, wird ein transformationsförderndes Potential zugesprochen (Boese et al., 2000). Das Produkt wurde zunächst als cORF (central Open Reading Frame) bezeichnet. Nachdem ihm jedoch eine HIV-Rev- bzw. HTLV (Humanes T-Zell-Leukämie Virus)-Rex-homologe Funktion zugeordnet wurde (Magin et al., 1999), erfolgte die Umbenennung in Rec. Das Protein ist in den Nukleoli lokalisiert und verfügt über potentielle Domänen für Kernimport, -export und RNA-Bindung (Loewer et al., 1995). Es ist in der Lage, HERV-K(HML-2) Vollängentranskripte zu binden und deren Export ins Cytoplasma zu vermitteln (Magin et al., 1999). In weiteren Studien zeigte sich außerdem, dass Rec analog zu den Rev/Rex-Proteinen in Abhängigkeit von Crm1 aus dem Zellkern exportiert wird, wobei ein leucinreiches, Rev-ähnliches Kernexportsignal (NES) in den Export involviert ist (Boese et al., 2000). Auch eine Multimerisierung des Proteins, wie sie auch für die Funktionalität der Rev/Rex-Proteine erforderlich ist, konnte nachgewiesen werden (Boese et al., 2001).

Studien bezüglich des transformationsfördernden Potentials von HERV-K-kodierten Proteinen zeigten, dass *rec* das Tumorwachstum in Nacktmäusen fördert (Boese et al., 2000). Nach stabiler Transfektion des *rec*-Gens wurden *rec*-exprimierende Rattenfibroblasten subkutan in immunsupprimierte Nacktmäuse injiziert, wo sie schließlich zu Tumoren heranwuchsen. Tiere aus Kontrollgruppen zeigten keine Neoplasien. Galli et al. (2005) konnten folgend einen Nachweis für die Korrelation zwischen der Expression von *rec* und der Entstehung von Keimzelltumoren in Mäusen erbringen. Sie generierten genetisch veränderte Mäuse, die das *rec*-Gen endogen in allen Zellen trugen. Nachdem sich bei diesen transgenen Tieren im Alter von zwölf Monaten erste histopathologische Veränderungen des Hodengewebes zeigten, entwickelten sie im Alter von achtzehn Monaten schließlich Hodentumoren.

Rec interagiert mit dem Promyelozytischen Leukämie Zink Finger Protein (PLZF) (Boese et al., 2000). PLZF wird beim Menschen mit der Genese von Leukämien assoziiert (Boese et al., 2000). Im Mausmodell wird dem Protein eine bedeutende Rolle in der Regulation von Prozessen zugeschrieben, die während der embryonalen Anlage der Extremitäten, des Zentralnervensystems und der Testis ablaufen (Hawe et al., 1996; Barna et al., 2000). Eine Störung der Spermatogenese aufgrund einer funktionellen Beeinträchtigung von PLZF könnte die Grundlage für weiterführende Schädigungen mit einem erhöhten Risiko testikulärer Tumoren darstellen (Heimdahl et al., 1997). Aufgrund der Korrelation von PLZF mit der Spermatogenese stellt Rec als dessen Interaktionspartner einen interessanten Faktor in der Keimzelltumorigenese dar. Späteren Publikationen zufolge ist PLZF für die Selbsterneuerung von Keimbahnstammzellen erforderlich. Die Zelle bleibt durch PLZF-Expression undifferenziert, bei Verlust geht sie auf Kosten der Selbsterneuerung in die Differenzierung über (Buaas et al., 2004; Costoya et al., 2004).

### **1.8.3 Das Protein Np9 (Nukleäres Protein der Masse 9 kDa)**

Im Kontext mit der Entdeckung von Rec, dessen Interaktion mit PLZF und der Korrelation dieser beiden HERV-K-Proteine mit der Genese von Keimzelltumoren, bestand Interesse daran herauszufinden, ob neben Rec noch weitere Spleißprodukte von HERV-K-*env*-Sequenzen mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht werden können. Hierzu wurden in der Arbeitsgruppe Müller-Lantzsch mittels RT-PCR transformierte Zelllinien und Tumorbiopsien untersucht. In allen bis dato untersuchten Seminombiopsien wurde ein 256 bp großes Fragment gefunden, welches detailliert analysiert wurde (Armbruester et al., 2002). Sequenzanalysen des neuen HERV-K-Gens ergaben eine 100%-ige Homologie zu der von Barbulescu veröffentlichten Sequenz des *env*-Gens von HERV-K101 auf Chromosom 22q11 (Barbulescu et al.,

1999). Das Fragment erhielt die Bezeichnung *np9*. In weiteren Analysen konnten zwei Varianten von *np9* charakterisiert werden, welche in vier Nukleotid-Positionen und daraus resultierend auf Proteinebene in drei AS-Austauschen differierten. Die Varianten wurden mit 100%-iger Homologie den HERV-K-Proviren auf Chromosom 3q13 [HERV-KII (Chr. 3q13)] und 22q11 [HERV-K (Chr. 22q11)] zugeordnet, wobei die zweite Variante vermutlich eine allelische Variabilität des 22q11 Locus darstellt.

#### 1.8.3.1 Die Struktur von *Np9*

Analysen der *np9*-Sequenz zeigen, dass das Transkript sein erstes verkürztes Exon mit den ersten 44 Basen von *env* und *rec* teilt. Zur Translation des zweiten Exons verwendet es jedoch ein zu *rec* und *env* unterschiedliches Leseraster (Abb. 3). Die Translation ergibt eine Übereinstimmung des ersten Exons von *np9* mit den ersten 15 der 87 Aminosäuren, die das erste Exon von *rec* darstellen. Das zweite Exon beginnt bei Position 8118 der HERV-K101-Sequenz und enthält 178 Basenpaare an kodierender Sequenz. Die COOH-terminalen 59 Aminosäuren von *Np9* sind zu *Env* und *Rec* unterschiedlich. Bedeutenderweise stammen alle *np9*-Gene von HERV-K(HML-2) Typ 1-Sequenzen ab, welche aufgrund der Typ 1-spezifischen 292 bp-Deletion nicht dazu in der Lage sind, intaktes *Rec* zu exprimieren (Loewer et al., 1993). Die Fähigkeit zur Expression von *Np9* durch Typ 1-Proviren ist nur möglich durch die Präsenz einer alternativen Spleißdonorstelle. Diese ist durch einen Nukleotidaustausch an den Positionen 6495 und 6496 des Provirus HERV-K101 von A und G (in Typ 2-Proviren) zu T und A (in Typ 1-Proviren) entstanden (Armbruster et al., 2002). Barbulescu et al. (1999) und Sugimoto et al. (2001) charakterisierten bisher insgesamt sieben HERV-K Typ 1-Sequenzen (HERV-K101, HERV-K102, HERV-K103, HERV-K107/HERV-K10, HERV-K105, HERV-K106 und HERV-K(II)), welche dem proviralen Typ 1 entsprechen und somit aufgrund der 292 bp-Deletion eine Grundvoraussetzung zur *Np9*-Produktion erfüllen.

Innerhalb des zweiten Exons von *np9* konnten drei putative Kernlokalisierungssignale (NLS; Nuclear Location Signal) identifiziert werden (Abb. 4). Die nukleäre Lokalisation von *Np9* wurde in weiteren Experimenten mit Hilfe eines fluoreszenz-basierten Zelllokalisations-Assays bestätigt. Spätere experimentelle Arbeiten zeigten, dass das als NLS1 bezeichnete Kernlokalisierungssignal ausschlaggebend für die nukleäre Lokalisation von *Np9* ist. NLS3 dirigiert das Protein in subnukleäre Kompartimente (Armbruster et al., 2004).

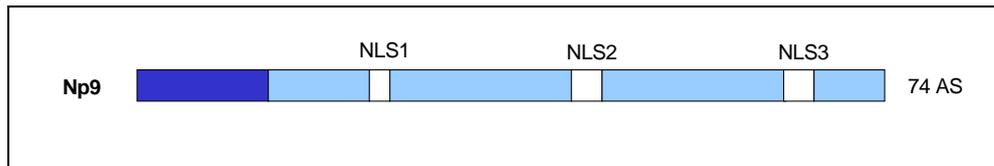


Abbildung 4: Np9-Protein

Dargestellt sind das erste Exon (dunkelblau) und das zweite Exon (hellblau). Die Positionen der drei putativen Kernlokalisationssignale (NLS1-3) sind kästchenförmig hervorgehoben.<sup>3</sup>

Np9 konnte bei seiner Entdeckung im Jahr 2002 in keiner Zelllinie und in keinem Gewebe als Protein in detektierbaren Mengen nachgewiesen werden (Armbruester et al., 2002). Der Proteinnachweis wurde erst möglich durch Hemmung des 26S Proteasoms mit MG132 (Armbruester et al., 2004).

### 1.8.3.2 Expressionsstudien zu Np9

In einer Studie wurde eine größere Anzahl an Proben auf *np9*-Transkription untersucht (Armbruester et al., 2002). Zur Analyse kam neben transformierten Zelllinien (Keimzelltumor-Zelllinien, Mammatumor-Zelllinien, B-Zelllinien und weitere Zelllinien wie Hela-Zellen etc.) und Tumorgeweben (Keimzelltumoren, Mammatumoren, leukämische Lymphozyten) auch gesundes Gewebe. In über 90% der transformierten Zelllinien konnte *np9* auf mRNA-Ebene detektiert werden. Auch *gag* (mRNA) wurde in über 90% der Zelllinien gefunden, während *rec* (mRNA) nur in 13% der Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Bei den untersuchten Tumorgeweben konnte *np9* in 45% der Gewebe nachgewiesen werden, wobei sich hier keine gleichmäßige Verteilung widerspiegelte. *np9* wurde in 52% der Mammakarzinome nachgewiesen. Bei den Keimzelltumoren erfolgte der Nachweis in 37% der untersuchten Proben, während die untersuchten leukämisch aberrierten Lymphozyten zu 33% *np9*-positiv waren. In den beiden untersuchten Ovarialkarzinom-Geweben konnte das Transkript nicht detektiert werden. Bedeutenderweise wurde *np9* in dieser Studie im Empfindlichkeitsbereich der eingesetzten Methoden jedoch in keiner der nicht entarteten Gewebeproben und Zellen (Darm, Magen, Plazenta sowie Fibroblasten und Lymphozyten) in messbaren Konzentrationen nachgewiesen. *rec* wurde in Keimzelltumoren prozentual anteilig wie *np9* exprimiert. In den Mammakarzinom-Biopsien konnte *np9* jedoch in mehr Proben nachgewiesen werden als *rec*. Analog zu *np9* wurde auch *rec* nicht in gesunden Zellen und Geweben aufgefunden. Konträr dazu wurden *gag*-Transkripte sowohl in transformierten Zellen und Tumorbiospien als auch in über 80% der normalen, nichttransformierten Zellen nachgewiesen. Dies unterstreicht die Tatsache, dass *np9* eng mit dem Transformationsgeschehen korreliert

---

<sup>3</sup> in Anlehnung an Armbruester et al., 2004

ist und zwar diesen Daten zufolge enger als *rec*. Somit könnte Np9 entweder als Tumormarker dienen oder selbst ein Onkoprotein darstellen (Armbruster et al., 2002).

### 1.8.3.3 Interaktionspartner von Np9

Untersuchungen von Armbruster et al. (2004) zeigen eine Interaktion von Np9 mit der E3-Ubiquitin-Ligase LNX (Ligand of Numb Protein X). Das LNX-Protein mit seinen beiden Isoformen p80LNX (mit terminaler RING-Finger-Domäne; beinhaltet Ubiquitinierungs-Mechanismus) und p70LNX (ohne terminale RING-Finger-Domäne) wurde erstmals 1998 von Dho et al. in der Maus als Interaktionspartner von Numb identifiziert. Bei der Entwicklung eukaryotischer Zellen stellt Numb einen wichtigen Differenzierungsfaktor dar. Seine asymmetrische Verteilung auf die Tochterzellen während der Embryogenese ist entscheidend für die spätere Differenzierung der Zelle (Hayashi et al., 2001). p80LNX agiert als E3-Ubiquitin-Ligase und markiert die Numb-Isoformen p72 und p66 für den proteasomalen Abbau. Numb wiederum fungiert als Antagonist im Notch-Signalweg. Diesem Signalweg wird eine Rolle bei der Gonozytendifferenzierung und der Entwicklung verschiedener Tumoren zugeschrieben (Dho et al., 1998; Nie et al., 2002). Das MMTV-Genom beispielsweise integriert gewöhnlich im Notch-4-Gen. Aus dieser Integration resultiert eine unregulierte ektoische Expression der extrazellulären Domäne von Notch-4, was stringent auf eine Verbindung zwischen Notch und der Genese von Mammatumoren hindeutet (Callahan und Raafat, 2001). Zusätzlich ist Notch unterhalb von p21<sup>Ras</sup> lokalisiert und beinhaltet einen essentiellen Teil des Signalwegs dieses Proto-Onkogens (Weijzen et al., 2002). Diese Tatsache unterstreicht die potentielle Rolle von Notch in der Tumorgenese. Numb bewirkt eine Downregulation sowohl des Notch-Rezeptors als auch der intrazellulären Domänen von Notch. Beides korreliert mit einer verminderten Notch-abhängigen Transkriptionsaktivität. Aus dem proteasomalen Abbau von Numb resultiert ein Anstieg der Gentransaktivierung durch nukleäres Notch. Armbruster et al. (2004) gelang es, die E3-Ubiquitin-Ligase als Interaktionspartner von Np9 zu identifizieren und die potentielle Regulation der Np9-Expression über den LNX/Numb/Notch-Signalweg in mehreren Systemen zu bestätigen. Np9 ist, wie Numb, ein instabiles Protein, dessen Abbau über den proteasomalen Weg erfolgt. LNX in seiner Funktion als Ubiquitin-Ligase markiert Np9 für den proteasomalen Abbau und ist somit für die geringe Stabilität des Np9-Proteins verantwortlich. Es ist jedoch noch nicht sicher, ob die Regulation von Np9 ausschließlich durch die Interaktion mit LNX erfolgt. Weiterhin konnte anhand von Fluoreszenzstudien gezeigt werden, dass Np9 die subnukleäre Lokalisation von LNX beeinflusst. Es transloziert LNX in die Nukleoli. Hierfür ist seine C-terminale Domäne verantwortlich, während das erste

Kernlokalisierungssignal die nukleäre Lokalisation von Np9 ermöglicht. Zusätzlich erfolgt eine Stabilisierung von ektopisch exprimiertem Np9 durch eine Überexpression von Numb. Dies bekräftigt die Hypothese, dass Np9 und Numb um den Liganden LNX konkurrieren. Unklar ist bisher, ob LNX, Numb und Np9 auch trimerische Komplexe formen können oder ob Np9 LNX von Numb sequestrieren kann. Armbruster et al. (2004) konnten letztendlich diverse Interaktionen zwischen Np9 und dem LNX/Numb/Notch-Signalweg nachweisen und die Hypothese aufstellen, dass Np9 eine Rolle bei der malignen Entartung von Zellen zugeschrieben werden kann. Die Expression von *np9* wurde bisher in Tumorzellen der Brust, in Keimzelltumoren und bei Leukämien nachgewiesen. Bezeichnenderweise sind dies genau die Tumorarten, mit deren Entstehung der Numb/Notch-Signalweg bisher assoziiert wurde (Callahan und Raafat, 2001; Hayashi et al., 2001).

Die Arbeitsgruppe Müller-Lantzsch konnte auch eine Interaktion zwischen Np9 und der Serin-Protease HumHtrA2 nachweisen, welche im Rahmen der Dissertation von Isabel Brand (2005) verifiziert wurde. Dieser Protease, welche erstmals 1989 als prokaryotisches, durch Hitzeschock induzierbares, membranassoziiertes Enzym im Periplasma von *E.coli* beschrieben wurde (Lipinsky et al., 1989) und aus deren Familie beim Menschen bisher drei Mitglieder bekannt sind, wird unter anderem eine proapoptotische Fähigkeit zugesprochen (Verhagen et al., 2002). Somit nimmt dieses Enzym eventuell Einfluss auf die Zellzykluskontrolle, in die damit auch Np9 als Serinproteasen-Bindungspartner involviert sein könnte.

Aufgrund der Interaktion von Np9 mit verschiedenen Proteinen wie beispielsweise LNX, die Np9 entweder regulatorisch beeinflussen könnten oder die direkt oder indirekt mit der Testisentwicklung in Zusammenhang stehen, drängt sich die Vermutung auf, dass Np9 sowohl mit der Entwicklung testikulären Gewebes als auch mit der Entstehung von Keimzelltumoren assoziiert sein könnte. An Stelle eines reinen Tumormarkers käme ihm somit eine aktive Rolle in der Karzinogenese zu.

## 1.9 Ziele der Arbeit

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte ein transformationsförderndes Potential für Rec, ein aus dem *env*-Leserahmen von HERV-K(HML-2) Typ 2-Proviren translatiertes Protein nachgewiesen werden (Boese et al., 2000; Galli et al., 2005). Bei *np9* handelt es sich um ein weiteres Produkt aus dem *env*-Leserahmen, welches nach doppeltem Spleißen aufgrund struktureller Besonderheiten jedoch ausschließlich von HERV-K(HML-2) Typ 1-Proviren exprimiert wird.

Die Expression von *np9* wurde bisher auf der Basis weniger Tumorarten untersucht. Armbruster et al. (2002) beschränkten sich auf Seminome, Mammakarzinome und leukämisch aberrierte Lymphozyten. Die in diesen Untersuchungen detektierten *np9*-Transkripte stammten dabei von den beiden Proviren HERV-K101 auf Chromosom 22q11 (Barbulescu et al., 1999) und HERV-KII (Chromosom 3q13) ab. Die einzelnen Varianten zeigten geringe Sequenzunterschiede sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Aminosäureebene und konnten - wie beschrieben - mit bestimmten chromosomalen Loci assoziiert werden. In genomischen Analysen wurden bisher insgesamt sieben HERV-K Typ 1-Sequenzen (HERV-K101, HERV-K102, HERV-K103, HERV-K107/HERV-K10, HERV-K105, HERV-K106 und HERV-KII) detektiert, welche dem proviralen Typ 1 entsprechen und somit aufgrund der 292 bp-Deletion eine Grundvoraussetzung zur *Np9*-Produktion erfüllen (Barbulescu et al., 1999; Sugimoto et al., 2001). Armbruster et al. (2002) beschrieben die zur *np9*-Transkription essentielle Spleißdonorstelle in den Proviren HERV-K101, HERV-KII, HERV-K (Chr. 22q11), HERV-K102, HERV-K103 und HERV-K10.

Da bisher nicht bekannt ist, ob neben den genannten Proviren bzw. Loci weitere provirale Loci im menschlichen Genom existieren, welche zur Produktion von *Np9* auf mRNA- und Aminosäureebene fähig sind, sollte im ersten Teil der Arbeit das menschliche Genom unter Anwendung des Human Genome Browsers in Kooperation mit Herrn PD Dr. rer. nat. Jens Mayer, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum des Saarlandes auf weitere zur *Np9*-Produktion potentiell fähige Loci hin analysiert werden.

Weiterhin sollte eine Ausdehnung der *np9*-Expressionsstudien auf weitere Tumorarten erfolgen, mit dem Ziel, Hinweise auf eine potentielle Beteiligung von *np9* an der Genese weiterer Neoplasien zu erhalten. Hierzu wurde ein Panel zur Verfügung gestellter RT-PCR-Produkte, generiert unter Anwendung der *env*-spezifischen Primer GesENVFor und GesENVRev, zunächst mit Hilfe des Vektors pGEM®-T kloniert. Im Anschluss daran erfolgten Sequenzanalysen. Die Ziele der Analysen lagen

zunächst darin, herauszufinden, ob *np9* in weiteren als den bisher untersuchten Tumorarten exprimiert wird. Weiterhin sollten die Sequenzanalysen Rückschlüsse liefern, ob in den unterschiedlichen Tumorarten verschiedene HERV-K Typ 1-Proviren und daraus resultierend verschiedene chromosomale Loci transkriptionell aktiv sind oder ob bestimmte Loci in bestimmten Tumoren präferenziell exprimiert werden.

Zuletzt sollten natives entartetes und natives gesundes Hodengewebe eines Patienten im direkten Vergleich sowie gesundes Hodengewebe eines weiteren Patienten mittels RT-PCR unter Anwendung der *env*-spezifischen Primer GesENVFor und GesENVRev auf *np9*-Expression untersucht werden. Das Ziel dieser Analyse sollte darin bestehen, die propagierte Beteiligung von *np9* an der Genese testikulärer Tumoren nochmals zu bestätigen.

## 2 Material

### 2.1 Enzyme und Oligonukleotide

DNase I	Boehringer
DNTPs	Boehringer
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs Inc.
Superscript II	RT Invitrogen
Taq-Polymerase Amersham	Pharmacia Biotech
T4-DNA-Ligase	Promega
Rnase	Life Technologies, Gibco BRL
Viralex Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH

### 2.2 Puffer und Lösungen

TAE-Puffer (50x)	2 M Tris/HCl; 250 mM Natriumacetat; 500 mM EDTA; pH 7,8
5x MSE-Puffer	0,2 M MOPS, pH 7; 50 mM NaAc; 5 mM EDTA
T4 DNA Ligasepuffer 2x	Promega
GTE-Lösung	50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA
NaOH/SDS-Lösung	200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS
Natriumacetat-Lösung	3 M Na-Acetat, mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt; H <sub>2</sub> O

### 2.3 Molekulargewichtsmarker

Der DNA-Molekulargewichtsmarker 1 kb+ der Firma Invitrogen wurde zur Bestimmung der Größe doppelsträngiger DNA-Moleküle verwendet. Er enthält DNA-Fragmente folgender Größen:

12/11/10/9/8/7/6/5/4/3/2/1,65/1/0,85/0,65/0,5/0,4/0,3/0,2/0,1 kb.

### 2.4 Bakterienstämme und Nährmedien

#### 2.4.1 Bakterienstämme

Zur Klonierung rekombinanter DNA und zur Amplifikation von Plasmiden wurde der Stamm *E.coli* pMOSblue (Amersham, pMOS-blue T-vector-Kit) eingesetzt. Diese Bakterien können für ein Blue/White-Screening (Kapitel 3.3.4) genutzt werden. Durch

Zugabe von Ampicillin zum Nährmedium wurden restriktive Wachstumsbedingungen zur Selektion rekombinanter Bakterien erzeugt.

### **2.4.2 Nährmedien**

LB-Medium: Luria broth base (2,5%)

LB-Platten: Luria's Agar (3,75%)

- Herstellung nach Angaben des Herstellers (Gibco BRL)
- Erreichen selektiver Wachstumsbedingungen durch Zugabe von Ampicillin

## **2.5 Zelllinien und Nährmedien**

### **2.5.1 Zelllinien**

Tera-1            Etablierte humane epitheloide Keimzelllinie, aus der Lungenmetastase eines Keimzelltumors gezüchtet; sie exprimiert HERV-K (Fogh und Trempe, 1975).

### **2.5.2 Nährmedien**

McCoy            Nährmedium zur Kultivierung von Tera-1-Zellen; Supplementierung von McCoy's 5A (Invitrogen) mit 10% fötalem Kälberserum und 4er Antibiotikum (40 U/ml Penicillin G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat).

## **2.6 Oligonukleotide**

Die nachfolgend gelisteten Primer (MWG/Biotech AG) wurden im Rahmen der RT-PCR verwendet:

GesENVFor    5`-ATG AAC CCA TCG GAG ATG CAA-3`

GesENVRev    5`-AAC AGA ATC TCA AGG CAG AAG-3`

GAPDH-N      5`-AGT CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3`

GAPDH-M      5`-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC-3`

Zur Sequenzierung durch die Firma GATC (Konstanz) wurden die folgenden Primer verwendet:

pGEM/T7-Seq.    5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3`

pGEM/SP6-Seq. 5`-TAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3`

## 2.7 Vektoren

pGEM-T® Promega

Dieser prokaryotische Expressionsvektor wurde zur Klonierung der vorhandenen RT-PCR-Produkte verwendet (Abb. 5). Er ist an der ehemaligen *EcoRV* Site des zirkulären pGEM®-5Zf(+)-Vektors mit überhängendem T an beiden Enden aufgeschnitten. Da die Taq-Polymerase allen Amplifikaten am 3' Ende ein Desoxyadenosin anhängt, können alle durch die Taq-Polymerase amplifizierten Produkte direkt durch das überhängende A in pGEM®-T kloniert werden. Für die Ligation von Produkten ohne überhängende Desoxyadenosinenden steht alternativ ein Multiple-Cloning-Site (MCS) mit Erkennungssequenzen mehrerer Restriktionsenzyme zur Verfügung.

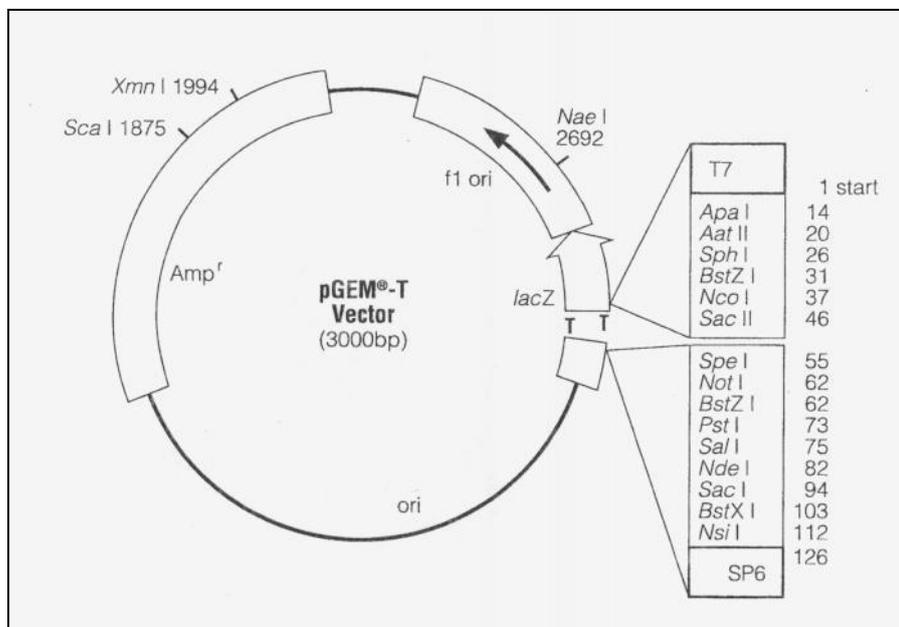


Abbildung 5: pGEM®-T Vektor

Der 3 kb große Vektor enthält zahlreiche singular vorhandenene Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, ein *lacZ*-Markergen, zwei „oris“, sowie ein Ampicillinresistenzgen und zwei Promotoren für die RNA-Polymerasen SP6 und T7.<sup>4</sup>

Zu beiden Seiten des geöffneten Vektors befindet sich das  $\beta$ -Galactosidase-Gen. Die erfolgreiche Insertion geht mit einem Verlust dieses Markergens (*lacZ*) einher. Das Gen kann nur abgelesen werden, wenn sich kein Insert im Vektor befindet. Der Vektor ermöglicht somit ein Blue/White-Screening zur Differenzierung transformierter und nicht transformierter Bakterien (Kapitel 3.3.4). Mittels T7- beziehungsweise SP6-RNA-Polymerasen, die ihre im Vektor enthaltenen spezifischen Promotoren erkennen, können „sense“- und „antisense“-RNA-Transkripte generiert werden. Zudem besitzt der

<sup>4</sup> entnommen aus „pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Technical Manual“, Promega



## 2.10 RT-PCR-Produkte

Die folgend gelisteten RT-PCR-Produkte verschiedener Tumorarten wurden von Herrn Prof. Dr. Hermann Herbst, Vivantes, Berlin zur Verfügung gestellt und im Rahmen dieser Dissertation kloniert.

*Tabelle 2: RT-PCR-Produkte*

Tumorart	RT-PCR-Produkt					
Seminom	412/01S	3022/00S	2371/00Srt	2196/00S	2503/00S	2653/00S
	2510/00Srt	2846/00Srt	905/00Srt	2874/00S	592/00Srt	2479/99S
	2164/00S	717/00S	2561/00S	406/00IIS	2789/00reS	374/00S
	144/01S	279/01S	330/01S	66/01S	112/00S	
	118/01S	2330/00IIS	406/00IS	1391/00Srt	1391/00S	
Nierenzellkarzinom	IH1304/01	IH137/01	IH817/01	IH1378/01	IH1062/01	
Mammakarzinom	7605/01	16637/01	6754/01	5558/01		
Glioblastom	TB153	TB34	TB110	TB105	TB26	TB152
Astrozytom	TB74	TB71				
Germinom	TB59					

Die Sequenzierung zufällig ausgewählter Klone wurde bei der Firma GATC (Konstanz) beziehungsweise beim Institut für Immunologie und Genetik (Klinikum Kaiserslautern) in Auftrag gegeben.

Zusätzlich standen die cDNA-Sequenzen der Klone folgender RT-PCR-Produkte zur Verfügung:

- Seminom 118 (vier cDNA-Sequenzen)
- Seminom 2371 (zwei cDNA-Sequenzen)
- Mammakarzinom 12348 (vier cDNA-Sequenzen)
- Nierenzellkarzinom 1496 (fünf cDNA-Sequenzen)
- Melanom 2 (vier cDNA-Sequenzen)

## 2.11 Zentrifugen, Computersoftware, Internetseiten

### 2.11.1 Zentrifugen

Sigma 202MK

Heraeus Megafuge 1.0

### **2.11.2 Computersoftware**

Microsoft XP

Microsoft Office 2000

ArcSoft: PhotoStudio 5

### **2.11.3 Internetseiten**

NCBI Sequences:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
NCBI Blast:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>
BCM-Search Launcher:	<a href="http://searchlauncher.bcm.tmc.edu">http://searchlauncher.bcm.tmc.edu</a>
Human Genome Browser:	<a href="http://www.genome.ucsc.edu">http://www.genome.ucsc.edu</a>

## **3 Methoden**

### **3.1 DNA-Techniken**

#### **3.1.1 Ligation von DNA-Fragmenten**

(Sgaramella et al., 1970; Dugaiczuk et al., 1975)

Unter Ligation versteht man die Verknüpfung zweier DNA-Moleküle durch das Enzym DNA-Ligase, welches den Vorgang katalysiert. In dieser Arbeit diente die Ligation der Verknüpfung des Vektormoleküls mit der zu klonierenden DNA, wobei die Durchführung mit der aus dem T4-Bakteriophagen stammenden T4-Ligase (Biolabs) erfolgte. Hierzu wurden äquimolare Mengen an dephosphoryliertem Vektor und dem zu inserierenden DNA-Fragment eingesetzt und mit T4 DNA-Ligase und T4 DNA-Ligasepuffer 2x über Nacht bei 4°C inkubiert.

#### **3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mittels alkalischer Lyse**

(Minipräparation nach Birnboim und Doily, 1979, modifiziert)

Die Methode dient der Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien. Nach der Transformation von *E.coli* pMOS-Kulturen wurden die Transformanten auf LB-Agarplatten unter selektiven Bedingungen kultiviert. Die weitere Amplifikation erfolgte nach dem Abimpfen der einzelnen Klone in je 1,5 ml LB-Medium und anschließender Inkubation über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler. Die Bakterien wurden zentrifugiert [30 sec, 13000 rpm (Sigma 202MK)] und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde nach kurzem Abtropfen in 100 µl GTE-Puffer, welchem RNase in einer Konzentration von 2 mg/ml zugesetzt worden war, aufgenommen und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das im GTE-Puffer enthaltene EDTA komplexiert die bivalenten Metallkationen, welche die Cytoplasmamembranen der Bakterien stabilisieren. Die DNase-freie RNase baut vorhandene mRNA ab, welche die zu gewinnende Plasmid-DNA verunreinigt. Nach Zugabe von 200 µl NaOH-SDS und vorsichtigem Mischen erfolgte erneut eine Inkubation über fünf Minuten auf Eis, bei der die Zellen lysiert wurden. SDS ist ein anionisches Detergens, das Proteine und Proteinkomplexe solubilisiert. NaOH denaturiert sowohl Plasmid- als auch chromosomale DNA. Die Neutralisation erfolgte durch Hinzufügen von 150 µl Natriumacetat und anschließender fünfminütiger Inkubation auf Eis. Natriumacetat führt zu einer Rückbildung doppelsträngiger Plasmid-DNA, welche im Überstand verbleibt, während chromosomale DNA und bakterielle Proteine präzipitieren. Der Überstand wurde nach erneuter Zentrifugation der Ansätze [10 min, 13000 rpm, 4°C (Sigma 202MK)] in ein neues Gefäß überführt, nach Zugabe von 800 µl Ethanol (95%) zwei

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nochmals zentrifugiert [15 min, 13000 rpm, 4°C (Sigma 202MK)]. Durch das Ethanol wird die verbliebene DNA gefällt, niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze bleiben in Lösung. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit jeweils 300 µl Ethanol 70% gewaschen [je 20 min, 13000 rpm, 4°C (Sigma 202MK)]. Zum Abschluss wurde das Pellet getrocknet und in 40 µl steriles Aqua bidest. aufgenommen. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach 24-stündiger Aufbewahrung bei 4°C.

### 3.1.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(Maniatis und Fritsch, 1989)

Restriktionsendonukleasen (REs) sind Enzyme, die hochspezifisch Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und diese an der für das entsprechende Enzym charakteristischen Erkennungssequenz spalten. Die Nomenklatur bezieht sich auf die prokaryotischen Organismen, aus denen die Enzyme isoliert wurden. Normalerweise schützen Restriktionsendonukleasen das Bakterium vor einer Infektion durch Bakteriophagen. Sie bauen Phagen-DNA ab, bevor sie sich replizieren und die Synthese neuer Phagenpartikel in Gang setzen kann. Die eigene DNA ist geschützt, da sie zusätzliche Methylgruppen trägt, welche die Wirkung des abbauenden Enzyms blockieren.

Der Restriktions-Verdau erfolgte mit den Enzymen *SacI* und *SacII*. Hierzu wurde im analytischen Ansatz 0,5 µg DNA mit 2 µl Restriktionspuffer von 2-5 U Enzym pro µg DNA geschnitten. Alle Ansätze wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

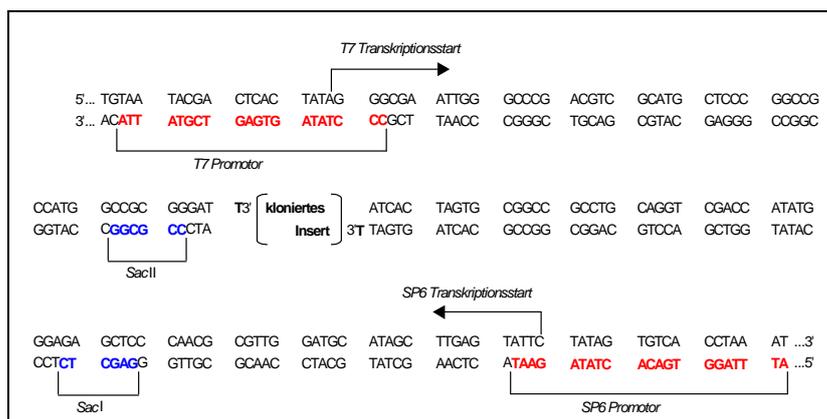


Abbildung 6: Ausschnitt aus pGEM®-T

Die Schnittstellen der REs, die Promotorbereiche sowie der Transkriptionsstart der Primer SP6 und T7 sind hervorgehoben.<sup>5</sup>

<sup>5</sup> in Anlehnung an pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Technical Manual, Promega

Die Schnittstellen dieser Enzyme liegen bei Position 94 (Sacl) und Position 46 (SaclI) des zirkulären pGEM®-5Zf(+)-Vektors, durch dessen Linearisierung bei Base 51 der Vektor pGEM®-T entstanden ist (Abb. 6).

Die Restriktionsstellen sind in den Transkripten des *env*-Leserahmens nicht vorhanden. Somit eignen sich diese beiden Restriktionsenzyme ideal zur Separierung des Vektors vom Insert.

#### **3.1.4 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

(Saiki et al., 1988)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction) ermöglicht die gezielte *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen bis zu einer maximalen Größe von 12 kb. Die Vervielfältigung doppelsträngiger DNA erfolgt dabei exponentiell. Ein einzelner PCR-Zyklus besteht jeweils aus drei Reaktionsschritten. Die zu Beginn der Reaktion eingesetzte DNA wird zunächst durch Erhitzung auf 95°C denaturiert. Durch die Zufuhr thermischer Energie erfolgt eine Auftrennung der Doppelstränge in Einzelstränge. Nach einer folgenden Abkühlung der Temperatur auf 50-60°C (je nach Basenzusammensetzung und Größe der verwendeten Primer) können sich während des sogenannten Annealings die einzelsträngigen Oligonukleotidprimer spezifisch an die komplementären Abschnitte der Template-DNA anlagern. Dadurch wird eine Basenpaarung möglich und es entsteht ein kurzer Doppelstrangabschnitt. Primer sind zu einem Teil des gesuchten DNA-Abschnittes komplementär und werden spezifisch erstellt, um die zu suchende DNA zu flankieren. Es werden jeweils zwei spezifische Primer benötigt, die das zu amplifizierende Fragment eingrenzen und zu je einem der Matrizenstränge komplementär sind. Der entstandene Doppelstrangabschnitt dient der Taq-Polymerase als Startpunkt. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, die aus dem thermophilen Mikroorganismus *Thermus aquaticus* isoliert wurde und die eine enorme Thermostabilität zeigt. Die Taq-Polymerase verlängert während der Elongation die Primer in Gegenwart von Desoxyribonukleotiden komplementär in 5`-3`-Richtung zur Matrize, so dass jeweils neue Doppelstränge entstehen. Die Neusynthese erfolgt bei einer für die verwendete Polymerase optimalen Temperatur. Nach dem Elongationsschritt beginnt ein neuer Zyklus, der sich wieder aus den drei Arbeitsschritten Denaturierung, Annealing und Elongation zusammensetzt. Die Thermostabilität der Polymerase ist der Grund dafür, dass nicht nach jedem Denaturierungsschritt DNA-Polymerase neu hinzugefügt werden muss. Somit können zur exponentiellen Amplifikation durchschnittlich 30 Zyklen direkt hintereinander ablaufen. Die Spezifität der PCR liegt in der Reaktion der

Primer mit einem definierten Abschnitt der nachzuweisenden und zu vervielfältigenden DNA begründet.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden ausschließlich RT-PCRs durchgeführt (Reverse Transcription-PCR; Kapitel 3.2.3). Pro Ansatz und PCR-Durchlauf wurden 20 µl Volumen eingesetzt, bestehend aus 2 µl 10x Puffer, 0,3 µl dNTP-Mix [10 µl dATP, 10 µl dTTP, 10 µl dGTP, 120 µl dCTP, 60 µl Aqua bidest. (steril)], 0,3 µl Primer A (GesENVFor; Konzentration der Ausgangslösung 25 mM), 0,3 µl Primer B (GesENVRev; Konzentration der Ausgangslösung 25 mM), 0,1 µl Taq-Polymerase (Konzentration der Ausgangslösung 5 U/µl), 0,2 µl cDNA (Konzentration der Ausgangslösung 0,1 µg/µl) und 15 µl Aqua bidest. (steril). Um falsch negative Ergebnisse bei der Amplifikation des Zielgens auszuschließen, wurde zusätzlich eine PCR mit Primern durchgeführt, die spezifisch für sogenannte Haushaltsgene sind. Dabei handelt es sich um Gene, die für Polypeptide oder RNA kodieren, deren Funktion für alle Zelltypen in einem multizellulären Organismus benötigt werden. Sie werden in der Regel konstitutiv exprimiert. Es wurden Primer genutzt, mit denen ein Genabschnitt der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert werden kann. Das Ergebnis der PCR wurde durch die DNA Agarose-Gelelektrophorese dokumentiert.

#### **3.1.5 DNA Agarose-Gelelektrophorese**

(Maniatis und Fritsch, 1989)

Agarose ist ein pflanzliches Polysaccharid, welches im Gel netzähnliche Strukturen bildet. Durch diese werden DNA-Fragmente bei ihrer Wanderung während der Elektrophorese in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch den gleichzeitigen Einsatz eines Molekulargewichtsmarkers als Referenz kann die Größe von Einzelfragmenten geschätzt werden. Die Wahl der eingesetzten Agarosekonzentration optimiert die Auftrennung der Fragmente in Abhängigkeit von ihrem Gewicht. In dieser Arbeit enthalten alle gefertigten Gele eine Konzentration von 2%. Die entsprechende Menge an Agarose (Seakam® LE Agar) wurde mit 1x TAE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst. Nach einer Abkühlung auf 55°C wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid hinzugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die planaren aromatischen Kationen von Ethidiumbromid schieben sich zwischen die gestapelten Basen, wobei ihre Fluoreszenz im Vergleich zum freien Farbstoff intensiviert wird. Das ermöglicht den visuellen Nachweis der Banden unter UV-Licht. Zur Visualisierung der Laufstrecke der DNA-Fragmente im Gel wurden die DNA-Ansätze mit 20% (v/v) Blaumarker-Stammlösung versetzt (50% Glycerin (v/v); 50 mM EDTA; 0,25% Bromphenolblau

(v/v)). Bei einer maximalen Spannung von 110 Volt erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente, danach wurden die sichtbaren Banden unter kurzwelligem UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) photographisch dokumentiert.

### **3.1.6 DNA-Sequenzierung**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden bei der Firma GATC in Konstanz in Auftrag gegeben. Einzig die Sequenzierung der Mammarkarzinom-Klone (Tabelle 2) und der aus nativem Tumormaterial gewonnenen Klone wurden im Institut für Immunologie und Genetik des Klinikums Kaiserslautern durchgeführt.

### **3.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch photometrische Messung. Der Vorgang beruht auf der Absorption von UV-Licht durch eine sich im Strahlengang befindliche Substanz proportional zu deren Konzentration. Die Messung der Nukleinsäurekonzentration erfolgt bei deren Absorptionsmaximum von 260 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann die Extinktion in die DNA-Konzentration umgerechnet werden. Zusätzlich zur Konzentration kann die Reinheit einer DNA-Lösung am Photometer bestimmt werden. Hierzu wird der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 nm und der optischen Dichte bei 280 nm berechnet. Der Quotient reiner DNA sollte zwischen 1.65 und 1.85 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen durch Proteine hin.

## **3.2 RNA-Techniken**

### **3.2.1 RNA-Isolierung**

#### *3.2.1.1 RNA-Elution aus eukaryotischen Zellen*

Zellen der Zelllinie Tera-1 wurden zur Isolierung von Gesamt-RNA am Vortag passagiert und am nächsten Tag abzentrifugiert [10 min, 1200 rpm, 4°C (Heraeus, Megafuge 1.0)]. Nach Zugabe von 10 – 20 ml PBS (steril) zu den erhaltenen Zellpellets, kurzem Aufschütteln und erneuter Zentrifugation [10 min, 1200 rpm, 4°C (Heraeus, Megafuge 1.0)] erfolgte die Zugabe von 1 ml Trizol® (Life Technologies, Gibco BRL). Trizol®-Reagenz ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, die eine Single-Step-Isolierung von RNA ermöglicht. Zur Dissoziation des Protein-Nuklein-Komplexes wurden die Zellen fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wonach dem Extraktionsansatz 0,2 ml Chloroform hinzugefügt wurde. Chloroform separiert die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase. Der Ansatz wurde 15 Sekunden gevortext, zwei Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert [15 min, 12000 rpm, 4°C (Sigma 202MK)]. Nach der Zentrifugation waren im Ansatz zwei Phasen zu erkennen, wobei die obere wässrige Phase die RNA enthielt, während sich DNA und Proteine in der unteren organischen Phase sammelten. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol zum Ausfällen der RNA über 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der nach anschließender Zentrifugation [15 min, 12000 rpm, 4°C (Sigma 202MK)] entstandene Überstand wurde verworfen. Die pelletierte RNA wurde durch Zugabe von 1 ml Ethanol 70% gewaschen [5 min, 7500 rpm, 4°C (Sigma 202MK)] und nach Verwerfen des Überstandes kurz getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 51 µl EDTA 0,001M pH 7 resuspendiert und ein DNase-Verdau durchgeführt (Kapitel 3.2.2).

#### *3.2.1.2 RNA-Elution aus Gewebe*

Zur Elution von RNA aus nativem Gewebe wurde eine kleine Menge des bei -70°C aufbewahrten Gewebes aus der Gesamtprobe isoliert, aufgetaut und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml Trizol® wurde das Gewebe homogenisiert (Ultra Turrax T8, IKA Labortechnik) und als Gemisch mit Trizol® fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte verhielten sich analog zur RNA-Elution aus Zellen (Kapitel 3.2.1.1).

#### **3.2.2 DNase-Verdau**

Vor der Durchführung einer RT-PCR wurde ein DNase-Verdau der RNA durchgeführt um sicherzustellen, dass es sich bei den PCR-Amplifikaten nur um DNA handelt, die von dem Enzym reverse Transkriptase umgeschrieben wurde (cDNA, Kapitel 3.2.4). Die Desoxyribonuklease zählt zu den Hydrolasen und spaltet vornehmlich Doppelstrang-DNA in Di- und Oligonukleotide.

Nach Zugabe von 6 µl DNasepuffer, 3 µl RNase freier DNase und 2 µl RNasin zu dem gelösten Pellet (Kapitel 3.2.1.1) erfolgte zunächst eine 20-minütige Inkubation bei 37°C im Wasserbad, an die sich eine 15-minütige Inkubation zur Inaktivierung der DNase bei 70°C im Wasserbad anschloss. Durch Zugabe der RNase freien DNase wurde die RNA von Verunreinigungen mit genomischer DNA gereinigt.

Nach Verdünnung der RNA um den Faktor 50 durch Zugabe von 0,1%-igem DEPC-Wasser wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Durch DEPC werden Histidinreste in Proteinen zu N-Carbethoxyhistidin modifiziert. Dies führt zur Hemmung von DNasen und RNasen. Die vollständige DNA-Eliminierung wurde durch eine PCR (ohne RT-Reaktion) überprüft.

### **3.2.3 RNA Agarose-Gelelektrophorese**

Die RNA Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Überprüfung von Qualität und Quantität isolierter RNA. Hierbei werden RNA-Moleküle analog zur DNA Agarose-Gelelektrophorese gemäß ihres Molekulargewichtes bei der Wanderung im elektrischen Feld voneinander getrennt. Die Wanderung zur Anode beruht dabei auf der negativen Ladung, die durch Phosphatgruppen im Rückgrat der Moleküle zustande kommt. Kleinere Moleküle wandern schneller durch die siebartig vernetzte Agarose als größere Moleküle. RNA-Moleküle neigen stark zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, die das Wanderverhalten während der Elektrophorese zusätzlich zur Molekülgröße beeinflussen können. Die Auftrennung von Ribonukleinsäuren erfolgt daher in denaturierenden Gelen. Als denaturierendes Agens wird den Gelen Formaldehyd zugesetzt. Formaldehyd zerstört intramolekuläre Basenpaarungen. Zur Anfärbung der Nukleinsäuren dient auch hier Ethidiumbromid, welches mit den Nukleinsäuren interkaliert und diese im ultravioletten Licht sichtbar macht.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1%-igen Formaldehyd-Gelen. Dazu wurden 0,5 g Agarose mit 31 ml H<sub>2</sub>O und 10 ml 5x MSE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf 60°C wurden 9 ml 37%iges Formaldehyd hinzugegeben. Zur Kontrolle der RNA wurden 1 µg RNA mit 9 µl RNA-Ladepuffer [0,75 ml Formamid; 0,15 ml 5x MSE; 0,24 ml Formaldehyd (37%); 0,2 ml Glycerol (50%); 0,025% Bromphenolblau, 4 µg Ethidiumbromid] vermischt, über zehn Minuten bei 65°C inkubiert und schließlich zur Elektrophorese auf das 1%-ige Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Kammer mit 1x MSE-Puffer bei 60 V. Die anschließende Bewertung fand unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm statt. Bei intakter RNA sind die 18S rRNA und die 28S rRNA als Banden zu erkennen.

### **3.2.4 Synthese von cDNA, RT-PCR**

Bei der RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) dient cDNA als Template. Diese zur RNA komplementäre DNA (complementary DNA) wird durch das Enzym reverse Transkriptase (RT) synthetisiert. Dabei handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die DNA von einer RNA-Matrize synthetisiert. Als Startpunkt für die reverse Transkription dient ein Hexanukleotid (Randomprimer). In dieser Arbeit wurde die Transkription mit der reversen Transkriptase Superscript II (Invitrogen) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 5 µl RNA, 1 µl Hexanukleotide, 1 µl dNTP und 9 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gemischt und über fünf Minuten bei 65°C inkubiert. Die Ansätze wurden auf Eis verbracht und jedem Ansatz wurden 4 µl First Strandpuffer und 2 µl 0,1 M DTT hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation für zwei Minuten wurden alle Ansätze außer dem Kontrollansatz mit 1 µl Superscript Reverse Transcriptase II versetzt. Es folgte

eine 50-minütige Inkubation bei 42°C. Abschließend wurde die reverse Transkriptase durch Erwärmung auf 70°C über fünfzehn Minuten inaktiviert.

Die anschließende PCR wurde wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben im Peltier Thermal Cycler PTC 200 der Firma MJ Research durchgeführt.

### **3.3 Zellkulturtechniken**

#### **3.3.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien**

Suspensionskulturen von *E.coli* pMOS wurden in LB-Medium kultiviert. Zur selektiven Amplifikation transformierter Bakterien wurde das Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) versetzt. Aufgrund plasmidgebundener Resistenzgene erfolgte so eine reine Vermehrung der transformierten ampicillinresistenten Mikroorganismen. Die Bakterienvermehrung erfolgte in Übernachtskultur bei 37°C auf einem Schüttler.

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden Bakteriensuspensionen mit 20% DMSO (v/v) versetzt und bei -70°C gelagert.

#### **3.3.2 Kultivierung und Lagerung immortalisierter Säugerzelllinien**

Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank. Die Zellen wurden durch Vermischen mit frischem Medium subkultiviert. Das Lösen adhärenter Zellen vom Boden der Kulturgefäße erfolgte mit Trypsin/EDTA.

#### **3.3.3 Transformation von Bakterien**

(Kushner, 1978; Lederberg und Cohen, 1974)

Unter dem Begriff „Transformation“ versteht man die Einführung eines oder mehrerer exogener DNA-Moleküle in eine bakterielle Zelle und ihre anschließende Expression. Genaue Einzelheiten des Prozesses sind dabei noch relativ unbekannt. Er beinhaltet vermutlich eine reversible energieabhängige Bindung doppelsträngiger DNA an Rezeptoren auf der bakteriellen Zelloberfläche, gefolgt von der irreversiblen Aufnahme in die Zelle. Die meisten Bakterien nehmen DNA unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang auf. Daher unterzieht man sie einer physikalischen und chemischen Behandlung, die ihr Potential zur Aufnahme exogener DNA verstärkt. Bakterien mit erhöhter Fähigkeit zur DNA-Aufnahme durch Transformation werden als „kompetent“ bezeichnet.

Die Bakterien *E.coli* pMOS wurden dazu mit der CaCl<sub>2</sub>-Methode vorbehandelt. Die Wirkweise des Salzes ist nicht genau bekannt, die CaCl<sub>2</sub>-Behandlung verbessert jedoch die Bindung der DNA an die Zellwand und ermöglicht so eine leichtere Aufnahme der DNA in die Zelle. 30 ml SOB-Medium [20 g/l Trypton; 5 g/l Yeast-

Extrakt; 0,6 g/l NaCl; 0,5 g/l KCl; 10 ml einer 2 M Mg<sup>2+</sup>-Stammlösung (203,3 g/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 246,5 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O)] wurden mit dem Bakterienstamm inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. 8 ml der Übernachtskultur wurden mit 200 ml SOB-Medium verdünnt und bis zu einer optischen Dichte von 0,3 bei einer Wellenlänge von 550 nm weiter kultiviert. Nach Aliquotierung in vier Teile und 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Suspensionen zentrifugiert [5 min, 500 rpm, 4°C (Heraeus Megafuge)] und die Überstände verworfen. Die Resuspension der pelletierten Bakterien erfolgte in 16 ml Transformationspuffer 1 [0,1 M RbCl; 0,05 M MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O; 0,03 M CH<sub>3</sub>COOK pH 7,5; 0,01 M CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 15% Glycerol (v/v)], danach wurden sie erneut für eine Dauer von fünfzehn Minuten auf Eis inkubiert und unter den genannten Konditionen abzentrifugiert. Die Pellets werden in je 4 ml Transformationspuffer 2 [0,5 M MOPS pH 6,8; 0,01 M RbCl; 0,075 M CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 15% Glycerol (v/v)] aufgenommen, zu 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -70°C.

Zur Transformation wurden 50 µl der kompetenten *E.coli* pMOS über eine Zeitspanne von 30 Minuten bis zu einer Stunde auf Eis aufgetaut und nach dem Auftauen dem Ligationsansatz hinzugefügt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis, bei der sich die negativ geladene DNA spontan an die Zellwand der Bakterienzelle anlagert. Durch eine anschließende zweiminütige Hitzebehandlung bei 42°C wurden die Bakterienzellwände kurzfristig permeabilisiert, wodurch die Aufnahme der Plasmid-DNA möglich wurde. Nach kurzzeitiger Regeneration auf Eis erfolgte die Ausplattierung auf die zur selektiven Anzucht mit Ampicillin vorbehandelten Agarplatten und eine anschließende Inkubation über Nacht bei 37°C.

Anhand eines Blue/White-Screenings (Kapitel 3.3.4) konnten die transformierten Bakterien erkannt und zur Plasmid-DNA-Isolierung mittels alkalischer Lyse (Kapitel 3.1.2) verwendet werden.

#### **3.3.4 Blue/White-Screening**

Das Blue/White-Screening ist eine Technik bei der Klonierung im prokaryotischen Vektor pGEM-T®. Sie dient dazu, diejenigen Klone, die von einem Insert-tragenden Vektor transformiert wurden, von denjenigen Klonen zu unterscheiden, die nur den Vektor enthalten. Die Screening-Methode beruht auf einer enzymatischen Reaktion. Die Agarplatten, auf denen die Kultivierung der transformierten Bakterien erfolgte, wurden mindestens 0,5 Stunden vor dem Ausplattieren der Bakterien mit zwei Substanzen bestrichen:

- 20 µl IPTG-Stammlösung (100 mM in Wasser)
- 35 µl X-Gal-Stammlösung (50 mg/ml in DMF)

Das Substrat X-Gal wird in Anwesenheit des Induktors IPTG (Isopropylthiogalactosid) durch das Enzym  $\beta$ -Galactosidase zu einem blauen Produkt umgewandelt. Das  $\beta$ -Galactosidasegen (*lacZ*) des Vektors pGEM-T® wird jedoch nur in Transformanten abgelesen, die kein Insert enthalten, da das Insert innerhalb des *lacZ*-Gens eingebaut wird. Diese Insertion verhindert ein erfolgreiches Ablesen des Gens. Daher färben sich Kolonien ohne Insert-tragenden Vektor blau, denn sie produzieren  $\beta$ -Galactosidase. Erfolgreich mit Insert transformierte Bakterien erscheinen weiß, da keine enzymatische Umwandlung stattfinden kann. Das Blue/White-Screening kann nur mit Bakterienstämmen durchgeführt werden, denen die  $\beta$ -Galactosidase fehlt, zum Beispiel mit dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm *E.coli* pMOS. Am Verhältnis von blauen und weißen Kolonien kann die Effizienz der Ligation abgelesen werden.

#### 3.4 BLAST

(Altschul et al., 1997)

Da ein nicht unerheblicher Teil dieser Dissertation aus Sequenzabgleichen und Sequenzanalysen besteht, soll an dieser Stelle ein wichtiges Softwarewerkzeug der Bioinformatik in groben Zügen erläutert werden. Die Abkürzung BLAST steht für Basic Local Alignment Search Tool und stellt ein Set von Programmen zur Suche von Sequenzübereinstimmungen im Abgleich mit Datenbanken dar. Dabei kommen heuristische Methoden zum Strang-Vergleich zur Anwendung. Heuristische Methoden sind Annäherungen an eine genaue Berechnung, bei denen eine reduzierte Sensitivität aufgrund der wesentlich gesteigerten Effizienz in Kauf genommen wird. Somit können auch große Datenbanken in angemessener Zeit nach ähnlichen Sequenzen durchsucht werden. Ein Algorithmus sucht dabei nach kurzen Wörtern, welche in beiden Sequenzen vorkommen und erweitert diese in beide Richtungen, um den längsten gemeinsamen Sequenzabschnitt zu finden. Ein sogenannter „word-hit“ liegt vor wenn das „word“ exakt oder in ähnlicher Form erkannt wird. Nach einer schnellen Indexsuche, bei der ähnliche Abschnitte identifiziert werden, erfolgt mittels Substitutionsmatrix (Standardmatrix: BLOSUM62) eine sensitive Berechnung von lokalen Alignments.

In dieser Dissertation wurde BlastN (Nukleotide) verwendet. Mit Hilfe von BlastN kann anhand einer vorgegebenen DNA-Sequenz eine DNA-Datenbank durchsucht werden.

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value
<a href="#">gi 22002106 gb AC084198.31 </a>	Homo sapiens 3 BAC RP11-454H13 ...	<u>377</u>	e-102
<a href="#">gi 9836486 dbj AB047240.1 </a>	Human endogenous retrovirus HERV...	<u>377</u>	e-102
<a href="#">gi 757869 emb X82271.1 HERVCORF</a>	Human endogenous retrovirus...	<u>371</u>	e-100
<a href="#">gi 311401 emb X72790.1 HERVKA</a>	Human endogenous retrovirus m...	<u>371</u>	e-100
<a href="#">gi 34596126 gb AY371045.1 </a>	Homo sapiens isolate cORF19 endo...	<u>371</u>	e-100
<a href="#">gi 34596122 gb AY371043.1 </a>	Homo sapiens isolate cORF17 endo...	<u>371</u>	e-100
<a href="#">gi 34596120 gb AY371042.1 </a>	Homo sapiens isolate cORF16 endo...	<u>371</u>	e-100
<a href="#">gi 34596118 gb AY371041.1 </a>	Homo sapiens isolate cORF14 endo...	<u>371</u>	e-100
<a href="#">gi 34596116 gb AY371040.1 </a>	Homo sapiens isolate cORF12 endo...	<u>371</u>	e-100

Abbildung 7: Auszug aus BlastN von Klon 2503/00S-3

BlastN liefert als Ergebnis nach einem Sequenzabgleich zwei wichtige Werte (Abb. 7): Score (Summe aller Bewertungen für die Paare an Nukleinsäuren des Alignments) und E-Value (Erwartungswert). Die Suchmaschine vergleicht dazu die Ausgangssequenz mit einer DNA-Sequenz aus der Datenbank. Findet BlastN Nukleotide, die übereinstimmen, dann erhöht sich der Score. Folgen nach der homologen Sequenz aber Nukleotide, die sich unterscheiden, dann wird an diesen Stellen ein „gap“ (Lücke) eingebaut. Ausgehend vom „word-hit“ wird ein lokales optimales Alignment verlängert, bis der Score durch sogenannte „mismatches“ (match = Übereinstimmung) abfällt. Der Score gibt somit die Qualität der Übereinstimmung zwischen Sequenzen an. Er ist aber abhängig von der Sequenzlänge und ist somit nicht normiert. Daher bewertet BLAST mit dem zweiten Wert, E-Value, die Signifikanz eines Alignments. Der Erwartungswert E-Value berechnet sich aus dem Score und aus der Länge der Sequenz ( $E = mn/2^S$ ; m: Länge der Suchsequenz, n: Summe der Länge aller Vergleichssequenzen, S: Bit Score). Der E-Wert sollte so klein wie möglich sein, da somit die Wahrscheinlichkeit um so geringer ist, dass genau dieses Alignment mit genau diesem Bit Score durch Zufall entstanden ist. Je kleiner der E-Wert, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Sequenzen übereinstimmen beziehungsweise miteinander verwandt sind.

## 4 Ergebnisse

Das humane endogene Retrovirus HERV-K steht im Verdacht, mit der Genese von Neoplasien assoziiert zu sein. Die Expression von RNA-Transkripten und Proteinen insbesondere aus dem *env*-Gen von HERV-K Proviren sowohl des Typs 1 als auch des Typs 2 konnte in transformierten Zelllinien und in verschiedenen bis dato untersuchten Tumorarten nachgewiesen werden (Kapitel 1.8). Insbesondere die Bildung zweier Spleißvarianten aus *env*, nämlich *rec* und *np9*, ist dabei von wissenschaftlichem Interesse. Ihnen wird eine potentielle Rolle bei der Entstehung neoplastischer Veränderungen zugesprochen (Boese et al., 2000; Armbruester et al., 2002; 2004). Das Produkt *np9* (Kapitel 1.8.3) konnte ebenso wie *rec* (Kapitel 1.8.2) bisher auf mRNA-Ebene in den unterschiedlichsten transformierten Zelllinien und in drei Tumorarten (Seminom, Mammakarzinom, leukämisch aberrierte Lymphozyten) nachgewiesen werden (Armbruester et al., 2002). Ausschlaggebend für das Interesse an weiteren Expressionsstudien der beiden Proteine ist jedoch die Tatsache, dass sowohl *rec* als auch *np9* in allen bisher durchgeführten Arbeiten nicht in gesundem Gewebe detektiert wurden (Armbruester et al., 2002). Ihre Expression ist - nach heutigen Untersuchungsergebnissen - stringent mit neoplastischen Veränderungen assoziiert. Des Weiteren konnte belegt werden, dass Patienten mit Keimzellneoplasien und Patienten mit Melanomen spezifische Antikörper gegen Produkte aus dem *env*-Gen bilden (Sauter et al., 1995; Buescher et al., 2005), wobei die Serum-Antikörpertiter nach erfolgreicher Therapie der Keimzelltumoren auch wieder absinken (Sauter et al., 1995; 1996). Diese Forschungsergebnisse untermauern den propagierten Zusammenhang zwischen der spezifischen Expression retroviraler Sequenzen und der Tumorgenese.

Bezüglich des Spleißproduktes *rec* erfolgte durch Mayer et al. (2004) eine Analyse des menschlichen Genoms auf potentiell zur Produktion von Rec auf mRNA- und Proteinebene fähige Proviren. Diese Arbeit sollte zu einem besseren Verständnis der Biologie des HERV-K(HML-2) Rec-Proteins führen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das menschliche Genom analog zur Analyse von Mayer et al. (2004) auf potentiell zur Produktion von Np9 auf mRNA- und auf Proteinebene fähige Proviren untersucht. Diese Analyse wurde in Kooperation mit Herrn PD Dr. rer. nat. Jens Mayer, Institut für Humangenetik der Universitätskliniken des Saarlandes, durchgeführt.

Weiterhin wurden die *np9*-Expressionsanalysen auf RNA-Ebene auf unterschiedliche Tumorarten ausgeweitet. Dazu wurden zunächst bereits vorhandene RT-PCR-

Produkte kloniert, welche aus Biopsien verschiedener Tumorarten resultierten (Kapitel 2.10). Die Produkte wurden nach Elution der Gesamt-RNA aus dem Biopsiematerial durch eine RT-PCR mit den *env*-spezifischen Primern GesENVFor und GesENVRev (Kapitel 2.6) generiert. Die genannten Primer dienen der Amplifikation von Transkripten aus dem *env*-Leserahmen. Im Anschluss an Klonierung und Plasmidisolierung erfolgte zunächst ein Probeverdaу mittels Restriktionsendonukleasen (Kapitel 3.1.3). Nach photographischer Dokumentation wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Klone sequenziert und einer anschließenden Sequenzanalyse unterzogen. Die Interessenspunkte der Auswertung lagen dabei auf der Art des Transkripts und der Bestimmung des chromosomalen Locus der proviralen Sequenz.

Zusätzlich wurden sechzehn bereits vorliegende cDNA-Sequenzen von *env*-Spleißprodukten verschiedener Tumorarten (Nierenzellkarzinom, Melanom, Mammakarzinom, Seminom) in die Analysen integriert, was an entsprechender Stelle vermerkt ist. Sequenzen, die aufgrund mangelhafter Sequenziererresultate nicht verwertbar waren, wurden nicht berücksichtigt (Legende Tabelle 6).

Weiterhin standen drei native Gewebeproben zur Untersuchung auf Expression von HERV-K(HML-2)-*env*-Transkripten zur Verfügung. Von Patient A, einem Seminompatienten, lagen sowohl eine Biopsie einer Keimzelle Neoplasie als auch eine Probe gesunden Hodengewebes vor. Von Patient B existierte ausschließlich eine Probe gesunden Gewebes. Nach Kontrolle der Methodik an Zellen der Zelllinie Tera-1 wurden die drei Biopsien einer RNA-Elution mit anschließender RT-PCR unter Verwendung der Primer GesENVFor und GesENVRev (Kapitel 2.6) unterzogen. Auch hier wurden ausgewählte Klone zur Sequenzierung in Auftrag gegeben, wonach ein Alignment durchgeführt wurde. Damit sollten einerseits die bisherigen Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe bestätigt und andererseits die Tatsache untermauert werden, dass *np9* auch im direkten Vergleich nativen Gewebes ein- und desselben Patienten (Patient A) nur in neoplastisch entarteten Bereichen exprimiert wird.

## 4.1 Identifikation Np9-kodierungskompetenter HERV-K-(HML-2)-Loci

### 4.1.1 Strukturelle Voraussetzungen zur Np9-Expression

Die humane endogene Retrovirus-Familie HERV-K(HML-2) produziert ein als Np9 bezeichnetes Protein, dessen Transkript sein erstes verkürztes Exon mit den ersten 44 Basen von *env* und *rec* teilt. Dabei ergibt die Translation eine Übereinstimmung des ersten Exons von *np9* mit den ersten 15 der 87 Aminosäuren, die das erste Exon von *rec* darstellen. Zur Translation des zweiten Exons wird ein von *rec* und *env* differierendes drittes Leseraster eingesetzt. Sequenzanalysen des HERV-K-Gens ergaben eine 100%-ige Homologie zu der von Barbulescu veröffentlichten Sequenz des *env*-Gens von HERV-K101 (Barbulescu et al., 1999). Bedeutenderweise stammen alle *np9*-Gene von HERV-K Typ 1-Sequenzen ab, welche aufgrund der Typ 1-spezifischen 292 bp-Deletion innerhalb von *env* nicht dazu in der Lage sind, intaktes Rec zu exprimieren (Loewer et al., 1993). Die Expression von Np9 durch Typ 1-Proviren ist nur möglich aufgrund der Präsenz einer alternativen Spleißdonorstelle innerhalb des *env*-Gens (Abb. 8), die durch einen Nukleotidaustausch an den Positionen nt 6495 und nt 6496 des Provirus HERV-K101 von A und G (in Typ 2-Proviren) zu T und A (in Typ 1-Proviren) entstanden ist (Armbruester et al., 2002). Ein weiteres Spleißdonorsignal befindet sich stromabwärts des 5'LTR. Spleißakzeptorstellen sind stromaufwärts des *env*-Gens und stromaufwärts des 3'LTR lokalisiert (Loewer et al., 1995). Vor dem Spleißvorgang muss die provirale Vollängen-RNA durch die TATA-Box des 5'LTR initiiert und durch ein Poly-A-Signal innerhalb des 3'LTR terminiert werden. Die aus dem Vorgang resultierende *np9* mRNA benötigt weiterhin einen offenen Leserahmen zur Translation des Np9-Proteins. Bisher wurden insgesamt sechs HERV-K Typ 1-Sequenzen charakterisiert (HERV-K101, HERV-K102, HERV-K103, HERV-K107, HERV-K110 und HERV-K(II)), welche den intakten offenen Leserahmen für Np9 und die relevante Spleißdonorstelle enthalten (Barbulescu et al., 1999).

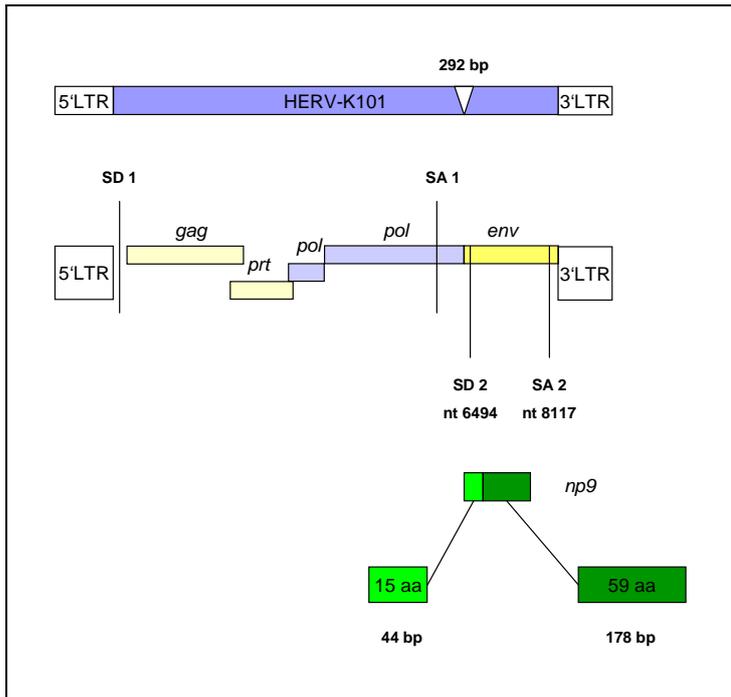


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines HERV-K(HML-2) Typ 1-Provirus.

Die zur Expression von Np9 erforderlichen Spleißdonor (SD)- und Spleißakzeptorstellen (SA) und die Typ 1-spezifische 292 bp-Deletion sind gekennzeichnet. Die von env- und rec unterschiedlichen Leseraster des np9-Gens sind hell- bzw. dunkelgrün dargestellt.

#### 4.1.2 Die Analyse des menschlichen Genoms

Unter Anwendung des Human Genome Browsers (Stand November 2004) wurde die Sequenz des menschlichen Genoms auf HERV-K(HML-2) Proviren hin analysiert, welche die genannten Kriterien zur Expression von Np9 erfüllen. Unter den Proviren, deren Strukturen weitestgehend intakt schienen, befanden sich 17 Proviren mit der für Provirus Typ 1 charakteristischen 292 bp-Deletion, welche somit kompetente Typ 1-Genome zum Spleißen von Np9 darstellten (Tabelle 3). Die proviralen Sequenzen wurden nun detailliert auf folgende Kriterien untersucht:

- Deletionen bzw. Insertionen innerhalb der proviralen Sequenz
- Präsenz der Spleißdonorstellen
- Präsenz der Spleißakzeptorstellen
- Präsenz von 5'- und 3'LTR
- Präsenz des Poly-A-Signals
- Präsenz des Np9 „open reading frame“

Die Angabe von Nukleotidpositionen in der folgenden Tabelle erfolgt im Vergleich zur Sequenz von HERV-K(HML-2.HOM) (GenBank accession no. AF074086). Zur Vereinfachung werden die detektierten Loci im folgenden Text nach den in Tabelle 3 und Tabelle 4 von 1-17 durchnummerierten Proviren (PV) benannt.

Die Proviren 4 und 5 besitzen keine 5`LTR-Region; zusätzlich fehlt ihnen – wie auch Provirus 16 – Spleißdonorstelle 1. Differenzen im Bereich der Basensequenz von Spleißdonorstelle 1 – im Vergleich zu HERV-K(HML-2.HOM) - existieren bei den Proviren 1, 6, 7 und 11. Provirus 4 weist zusätzlich eine Alteration der *np9*-charakteristischen Spleißdonorstelle 2 auf. Diese Alteration (AGATGGTAACA→AGATGGAAACA) ist auch in den Sequenzen der Proviren 6, 10, 11 und 15 zu finden. Abweichungen im Bereich von Spleißdonorstelle 2 zeigen auch die Proviren 7 (AGATGGTAACA→AGATGGAAACC) und 16 (AGATGGTAACA→AGGTAGAAACA). Provirus 5 besitzt – ebenso wie die Proviren 3, 6, 10 und 11 - keinen Np9 „open reading frame“. Verglichen mit der Sequenz von HERV-K(HML-2.HOM) zeigen drei Proviren (6, 11, 15) Alterationen der Basenfolge von Spleißakzeptorstelle 2, wobei es sich bei Provirus 6 um eine Insertion von zwei Basen handelt. Eine Sequenzvariation von Spleißakzeptorstelle 1 ist nur bei Provirus 5 zu finden. Abweichungen beim Poly-Adenylationssignal sowie im Bereich des 3`LTR weist Provirus 17 auf; die Poly-A-Region fehlt, und von der Sequenz des 3`LTR existieren nur die Positionen 1 bis 257. Auch Insertionen und Deletionen wurden detektiert. Provirus 10 weist sowohl eine Insertion von ca. 250 bp ab Nukleotidposition 6000 auf, als auch eine 2300 bp umfassende Deletion von Position 3700 bis Position 6000. Eine weitere Insertion (750 bp) lässt Provirus 11 beginnend an Nukleotidposition 1100 erkennen. Die Deletionen innerhalb der einzelnen Proviren überwiegen (Proviren 1, 4, 5, 6, 10, 14, 15). Sie umfassen zum Teil große Bereiche der proviralen Sequenz. So beginnt die Basensequenz von Provirus 14 erst bei Position 6423 verglichen mit der Sequenz von HERV-K(HML-2.HOM), weshalb auch wichtige Expressionskriterien wie SD1 und 5`LTR fehlen. Auch Provirus 5 lässt eine Deletion von 6000 bp beginnend an Nukleotidposition 1 erkennen. Deletionen von nt 3700 bis nt 6000 wurden bei den Proviren 4, 6 und 15 gefunden, wobei Provirus 4 einen weiteren Deletionsbereich von nt 1 bis 2700 besitzt und Provirus 15 zusätzlich eine 90 bp-Deletion beginnend bei nt 7352 aufweist. Die Resultate der Analysen und Charakteristika der untersuchten proviralen Sequenzen werden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammenfassung der proviralen Sequenzcharakteristika

Provirus	Locus	Insertionen (ca.)	Deletionen (ca.)	5'LTR	SD1 (HOM=CCTTACGGTAAGC)	SA1 (HOM=CCACTAGACATTT)	np9 SD2 (AGATGGTAACA)
1	1_259		3500 - 6400	+	CCTTACAGTAAGC	+	+
2	1_504			+	+	+	+
3	1_555			+	+	+	+
4	1_727		1 - 2700; 3700 - 6000	-	-	+	AGATGGAACA
5	2_340		1 - 6000	-	-	CCACCAGACATTT	+
6	3_014		3700 - 6000	+	CCTTGC GGTAAGC	+	ACATGGAACA
7	3_294			+	CCTTGC GGTAAGC	+	AGATGGTAACC
8	3_354			+	+	+	+
9	3_610			+	+	+	+
10	4_742	250 bp bei nt 6000	3700 - 6000	+	+	+	AGATGGAACA
11	5_259	700 bp bei nt 1100		+	CCTTATGGTA AAC	+	AGATGGAACA
12	5_544			+	+	+	+
13	11_456			+	+	+	+
14	16_160		1 - 6400	-	-	+	+
15	19_238		3700 - 6000; 90 bp Deletion bei nt 7352	+	+	+	AGATGGAACA
16	21_019			+	-	+	AGGTAGTAACA
17	22_012			+	+	+	+

Provirus	Locus	SA2 (HOM=TTGTTAGTCTGCA)	3'LTR	Poly-A	np9 ORF	Expression
1	1_259	+	+	+	+	+(bzw. 22_012)
2	1_504	+	+	+	+	+
3	1_555	+	+	+	-	-
4	1_727	+	+	+	+ (-3 aa)	-
5	2_340	+	+	+	-	-
6	3_014	TTGTTCAAGTCTGCA (+2)	+	+	-	-
7	3_294	+	+	+	+	+
8	3_354	+	+	+	+	-
9	3_610	+	+	+	+	-
10	4_742	+	+	+	-	-
11	5_259	TTGTTAGTCTACA	+	+	-	-
12	5_544	+	+	+	+	+
13	11_456	+	+	+	+	-
14	16_160	+	+	+	+	-
15	19_238	TTGTTACTCTGCA	+	+	+	-
16	21_019	+	+	+	+	-
17	22_012	+	+(nur 1 -257)	-	+	+(bzw. 1_259)

Differenzen zur vermutlich funktionellen Sequenz existieren bezüglich bestimmter Sequenzkonditionen, die zur Np9-Expression bedeutsam sind. In Tabelle 3 sind die Lokalisationen der Spleißdonor-(SD)- und Spleißakzeptor-(SA)-stellen dargestellt. Die funktionellen Sequenzen der Spleißdonor-(SD)- und Spleißakzeptor-(SA)-stellen können der Kopfzeile entnommen werden. Sequenzunterschiede innerhalb der einzelnen proviralen Sequenzen sind **fett** dargestellt. Des Weiteren steht „+“ für vorhanden und „-“ für nicht vorhanden. Proviren, die auf mRNA-Ebene bereits exprimiert gefunden wurden, sind zusätzlich **gelb** markiert. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung).

#### **4.1.3 Die potentiell zur Np9-Produktion befähigten Proviren**

Die Proviren 3, 5, 6, 10 und 11 erscheinen aufgrund des geschlossenen Np9-Leserahmens nicht kompetent zur Produktion von Np9. Unter alleiniger Betrachtung der zur Transkription von *np9* erforderlichen „open reading frames“ wären 12 Proviren in der Lage, für Np9 zu kodieren (Tabelle 3). Verschiedene dieser Proviren weisen jedoch schwerwiegende strukturelle Fehler auf. Den Proviren 4 und 14 fehlt der 5`LTR. Zwei Proviren (1, 7) zeigen Mutationen der SD1 und vier Proviren Mutationen der *np9* SD2 (4, 7, 15, 16). Die Proviren 4, 14 und 16 besitzen keine SD1, und vier Proviren (1, 4, 14 und 15) weisen größere Deletionen innerhalb der Sequenz auf. In den folgenden Analysen wurde *np9*-Expression auf mRNA-Ebene durch fünf (beziehungsweise sechs) aktive Proviren festgestellt (Kapitel 4.2). Hierbei handelte es sich um die Proviren 1 (1\_259), 2 (1\_504), 7 (3\_294), 12 (5\_544), 16 (21\_019) und 17 (22\_012), wobei bezüglich der Proviren 1 und 17 aufgrund einer gleichen Anzahl an Nukleotiddifferenzen zwischen der jeweilig exprimierten und analysierten cDNA des Untersuchungsgutes und den beiden proviralen Sequenzen nicht exakt definiert werden konnte, welches der beiden Proviren letztendlich aktiv war. Die genannten Proviren wären somit auch zu einer Produktion des Np9-Proteins befähigt.

#### **4.1.4 Die prädiktiven Aminosäuresequenzen der HERV-K(HML-2)-Loci**

Ein multiples Alignment der Aminosäuresequenzen der durch die analysierten Typ 1-Proviren kodierten Np9-Proteine ist in Tabelle 4 dargestellt. Differenzen zeigen sich dabei unter anderem in den zuvor beschriebenen und auch in Tabelle 4 gekennzeichneten nukleären Lokalisationssignalen. Aminosäure 23 erfährt bei den proviralen Loci 3\_014, 16\_160 und 5\_259 in NLSI einen Austausch von P zu L. Die Sequenzen der Loci 4\_742 und 21\_019 weisen Aminosäureaustausche innerhalb von NLSII auf, während in NLSIII das transkriptionell aktive Provirus auf Locus 1\_504 eine Expression von G anstelle von R zeigt.



## 4.2 Analyse der RT-PCR-Produkte

Die RT-PCR-Produkte wurden zunächst wie in Kapitel 3.1.1 und Kapitel 3.3.3 beschrieben in den Vektor pGEM®-T kloniert. Die folgende Tabelle zeigt die generierten Klone mit ihren Bezeichnungen (Tabelle 5).

*Tabelle 5: Die generierten Klone*

Seminome		Nierenzellkarzinome	Glioblastome
412/01S-(1-20)	144/01S-(1-24)	IH1304/01-(1-3; 5-21)	TB153-(1-24)
3022/00s-(1-24)	279/01S-(1-24)	IH137/01-(1-6)	TB34-(1-23)
2371/00Srt-(1-24)	330/01S-(1-24)	IH817/01-(1-24)	TB110-(1-9, 12-23)
2196/00S-(1-24)	66/01S-(1-18)	IH1378/01-(1-24)	TB105-(1-10)
2503/00S-(1-12)	112/00S-(1-24)	IH1062/01-(1-24)	TB26-(1-24)
2503/00S-(1-16)	118/01S-(1-10)		TB152-(1-4)
2846/00Srt-(1-11)	2330/00IIS-(1-10)		
905/00Srt-(1-12)	406/00IS-(1-5)	Mammakarzinome	anaplast. Astrozytome
2874/00S-(1-5)	1391/00Srt-(1-5)	7605/01-(1-10)	TB74-(1-23)
2164/00S-(1-19)	1391/00S-(1-2)	16637/01-(1-12)	TB71-(1-24)
717/00S-(1-16)	374/00S-(1-3)	6754/01-(1-12)	
2561/00S-(1-12)	2479/99S-(1-20)	5558/01-(1-6)	
406/00IIS-(1-21)	2653/00S-(1-17)		Germinom
2789/00reS-(1-24)	592/00Srt-(1-10)		TB59-(1-12)

*Die Benennung der Klone orientiert sich an dem klonierten RT-PCR-Produkt; dessen Bezeichnung wird nach einem Bindestrich die Anzahl der angefertigten Klone angehängt. 412/00S-(1-20) bedeutet somit: Von RT-PCR-Produkt 412/00S wurden 20 Klone angefertigt, welche die Bezeichnungen 412/00S-1 bis 412/00S-20 tragen. Insgesamt wurden 739 Klone aus 46 RT-PCR-Produkten generiert.*

Eine Probe der isolierten Plasmid-DNA jedes Klones wurde einem Restriktionsverdau (Kapitel 3.1.3) unterzogen. Das Ergebnis der Klonierung wurde nach dem Probeverdau mittels DNA Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.1.5) visualisiert und photographisch dokumentiert. Durch die Verwendung des 1kb+-Markers (Kapitel 2.3.1) konnte die Größe der einzelnen Banden abgelesen werden. Die Auswahl der letztendlich sequenzierten Klone (Tabelle 6) erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

Tabelle 6: Die sequenzierten Klone

RT-PCR-Produkt	sequenzierte Klone
412/01S	4, 5
2371/00Srt	12, 18
2503/00S	1, 2, 3, 4, 7, 11, 12
2164/00S	1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 17, 18, 19
717/00S	2, 11, 13, 14
2561/00S	1,2
406/00IIS	1, 2, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20
2789/00reS	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10
TB34	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13
TB59	1, 2, 4, 5, 6, 10, 12
TB71	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
TB26	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24
16637/01	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12

Insgesamt wurden 105 Klone zuzüglich der sechzehn bereits vorliegenden cDNA-Sequenzen (Kapitel 2.10) analysiert. Die Sequenzierung der folgend genannten Klone lieferte keine verwertbaren Ergebnisse: 2371/00Srt-(12, 18), 2561/00S-1, 2164/00S-(5, 8, 9), 406/00IIS-(10, 16, 17), 717/00S-(11, 13), 2789/00reS-(1, 5, 10), TB34-13, TB59-(1, 4), TB71-(7, 8, 9), TB26-(17, 23), 16637/01-9. Diese Klone werden in der Auswertung nicht weiter berücksichtigt.

Die Sequenzierung wurde mit den Primern SP6 (Kapitel 2.6) bzw. T7 (Kapitel 2.6) durchgeführt. Die nach der Sequenzierung übermittelte Sequenz beinhaltete neben der Basenfolge des Inserts auch Auszüge der Vektorsequenz sowie die Primersequenzen. Die Insertsequenz wurde detektiert und zunächst mit BlastN (Kapitel 3.4) via Internet am National Center for Biotechnology Information (NCBI) einem Abgleich mit verschiedenen Nukleotidbanken auf Übereinstimmung mit HERV-K Proviren unterzogen. Zu HERV-K Proviren korrespondierende Sequenzen wurden weiter analysiert. Die Basenfolgen der *env*-spezifischen Primer GesENVFor und GesENVRev (Kapitel 2.6) wurden in den Inserts detektiert, wonach ein chromosomales Alignment ohne die Primersequenzen erfolgte. Die multiplen Alignments der analysierten Sequenzen können im Anhang eingesehen werden. Die ermittelten Sequenzen wurden unter Berücksichtigung der Anzahl an Nukleotiddifferenzen zwischen cDNA und proviraler Sequenz einem definierten chromosomalen Locus zugeordnet.

Die folgenden Kapitel stellen die Analysen zunächst für jede Tumorart einzeln dar, wobei einleitend die Charakteristika der verschiedenen Tumoren kurz erläutert werden.

### 4.2.1 Seminome

Seminome zählen zu den Keimzelleoplasien. Die Klassifizierung von Keimzelleoplasien erfolgt auf Grundlage der Dignität in benigne und maligne Tumoren. Die weitere Einteilung (WHO) orientiert sich an histologischen Befunden (Mostofi und Sobin, 1977). Seminome sind maligne, von germinativem Gewebe ausgehende Hodentumoren, die auch als Mischtumoren mit anderen Geweben auftreten können. Unter den Hodentumoren stellen sie die am häufigsten auftretenden Neoplasien dar. Betroffen sind insbesondere Patienten zwischen dem 30. und dem 50. Lebensjahr. Seminome neigen zur lymphogenen Metastasierung insbesondere in die paraortalen Lymphknoten („Pscyrembel Klinisches Wörterbuch“, 1998).

In dieser Tumorgruppe gelangten zunächst 31 generierte cDNAs aus insgesamt fünf RT-PCR-Produkten in die Sequenzanalyse, deren Ergebnisse Tabelle 7 wiedergibt.

Tabelle 7: Analyseresultate der Seminom-cDNA-Sequenzen

Klon	Transkript	Locus	Deletionen (bp)	Insertionen (bp)
412/01S-4	<i>np9</i>	21_019	3	1
412/01S-5	<i>np9</i>	21_019	3	0
2503/00S-1	<i>np9</i>	3_294	47	0
2503/00S-2	<i>np9</i>	3_294	0	0
2503/00S-3	<i>np9</i>	3_294	0	0
2503/00S-4	/	22_012	-	-
2503/00S-7	<i>np9</i>	3_294	0	0
2503/00S-11	<i>rec</i>	12_216	61	0
2503/00S-12	/	10_310	-	-
2164/00S-1	<i>rec</i>	HML-2.HOM	-	-
2164/00S-2	<i>np9</i>	3_294	-	-
2164/00S-4	<i>rec</i>	6_324 oder 19_352	-	-
2164/00S-3	-	-	-	-
2164/00S-10	<i>np9</i>	1_259 oder 3_294	-	-
2164/00S-12	<i>rec</i>	HML-2.HOM	-	-
2164/00S-17	<i>np9</i>	1_259 oder 22_012	-	-
2164/00S-18	<i>np9</i>	3_294	-	-
2164/00S-19	<i>rec</i>	HML-2.HOM	-	-
406/00IIS-1	/	Y_026	-	-
406/00IIS-2	/	8p12	-	-
406/00IIS-6	/	3_294	-	-
406/00IIS-7	/	8p12	-	-
406/00IIS-8	<i>np9</i>	3_294	-	-
406/00IIS-15	<i>np9</i>	3_294	-	-
406/00IIS-18	/	8p12	-	-
406/00IIS-19	<i>np9</i>	3_294	-	-
406/00IIS-20	/	8p12	-	-

#### 4 Ergebnisse

Klon	Transkript	Locus	Deletionen (bp)	Insertionen (bp)
2789/00reS-3	/	8p12	-	-
2789/00reS-4	<i>np9</i>	3_294	2	-
2789/00reS-7	/	8p12	-	-
118-1/1A1	<i>np9</i>	5_544	-	-
118-1/1B1	<i>np9</i>	1_259 oder 22_012	-	-
118-1/2C1	<i>np9</i>	1_259 oder 22_012	-	-
118-1/2D1	<i>np9</i>	5_544	-	-
2371-A/1	<i>np9</i>	1_259 oder 22_012	-	-
2371-A/2	<i>np9</i>	5_544	-	-

In der ersten Spalte der Tabelle werden die analysierten Klone aufgeführt. Die zweite Spalte nennt das exprimierte Transkript, aus der folgenden Spalte wird der zugehörige Locus ersichtlich. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung). Den Spalten 4 und 5 kann die Anzahl (in bp) an Deletionen bzw. Insertionen innerhalb der entsprechenden Sequenz entnommen werden. „/“: Die cDNA-Sequenz zeigt keine Homologie zu *np9* oder *rec*. „-“: Es sind keine Deletionen bzw. Insertionen vorhanden.

Elf der übermittelten Sequenzen sind nicht homolog zu Spleißprodukten aus dem *env*-Leserahmen von HERV-K(HML-2)-Proviren („/“). Vierzehn Sequenzen entsprechen dem *np9*-Spleißprodukt aus dem *env*-Leserahmen von Typ 1-Providiren, sechs Sequenzen korrelieren mit dem Spleißprodukt *rec* aus dem *env*-Leserahmen der Proviren Typ 2.

Die beiden *np9*-Sequenzen von Klon 412/01S, welche beide eine Deletion von 3 bp an den Positionen nt 41-nt 43 der *np9*-Sequenz aufweisen, können dem Locus 21\_019 zugeordnet werden. In der Sequenz von Klon 412/01-4 findet sich an Position nt 292 zusätzlich eine Insertion (A).

Die sieben *np9* cDNAs von RT-PCR-Produkt 2503/00S korrelieren mit einem HERV-K(HML-2)-Provirus, welches auf Chromosom 3 (Locus 3\_294) lokalisiert ist. Dabei ist die Sequenz von Klon 2503/00S-1 im Bereich der bp 102-146 sowie an den Positionen nt 289-nt 291 deletiert. Die einer HERV-K(HML-2)-Provirus des Typs 2 entsprechende Sequenz des Klones 2503/00S-11 mit einer Deletion von 3 bp an den Positionen nt 104-nt 106, von 57 bp im Sequenzbereich nt 209-nt 266 und an Position nt 489 der *rec*-Sequenz entspricht einem Provirus mit dem chromosomalen Locus 12\_216. Die ermittelten Sequenzen der Klone 4 und 12 zeigen keine Homologien zu den Spleißprodukten *np9* oder *rec*.

Die Auswertung der neun analysierten Klone von RT-PCR-Produkt 2164/00S zeigt ein differentes Bild. Die Sequenz von Klon 3 konnte aufgrund ihrer Kürze (24 bp) nicht in die Analyse einbezogen werden. Die Sequenzen der Klone 2 und 18 stammen von einem Typ 1-Provirus auf Locus 3\_294 und entsprechen einer *np9*-cDNA. Die cDNAs von Klon 10 und Klon 17 können nicht exakt einem proviralen Locus zugeordnet werden. Die Basenfolge von Klon 10 differiert in nur einer Nukleotidposition sowohl von

Locus 1\_259 als auch von Locus 22\_012. Ähnlich verhält es sich bzgl. der cDNA von Klon 17. Die geringste Anzahl an Nukleotidunterschieden zwischen generierter cDNA und analysierten proviralen Loci liegt hier in zwei Positionen verglichen mit den Loci 1\_259 und 22\_012 vor. Daher kann nicht eindeutig bestimmt werden, welcher der beiden Loci transkriptionell aktiv war. Auch beim *rec*-Transkript von Klon 4 kann der Locus des aktiven HERV-K(HML-2) Typ 2-Provirus nicht exakt definiert werden (6\_324 oder 19\_352), während die *rec*-Transkripte der Klone 1, 12 und 19 von dem durch Mayer et al. (1999) detektierten Typ 2-Provirus auf Chromosom 7 abstammen (HERV-K(HML-2.HOM)).

Neun der 21 generierten Klone von RT-PCR-Produkt 406/00IIS wurden sequenziert. Sechs ermittelte Sequenzen weisen keine Ähnlichkeit zu *np9*-oder *rec*-Transkripten auf. Die cDNAs der Klone 8, 15 und 19 sind homolog zu einem *np9*-transkribierenden HERV-K(HML-2)-Provirus auf Locus 3\_294.

Auch unter den vier analysierten Klonen von RT-PCR-Produkt 2789/00reS zeigen drei Sequenzen keine Homologie zu den gesuchten Spleißprodukten aus dem *env*-Leserahmen (Klone 2, 3 und 7). Die ermittelte cDNA-Sequenz von Klon 4 kann Locus 3\_294 zugeordnet werden. Sie zeigt eine Insertion sowohl an Position nt 147 (T) als auch an Position nt 292 (A) der *np9*-Sequenz.

Zusätzlich standen in der Gruppe der Seminome die cDNAs der aus den RT-PCR-Produkten 118 und 2371 generierten Klone zur Verfügung (Kapitel 2.10).

Die vier analysierten Klone von RT-PCR-Produkt 118 entsprechen jeweils der *np9*-Sequenz. Dabei können die cDNAs der Klone 118-1/1A1 und -1/2D1 mit einem transkriptionell aktiven HERV-K(HML-2)-Provirus auf Chromosom 5 (Locus 5\_544) assoziiert werden. Die cDNAs der Klone 118-1/1B1 und -1/2C1 differieren beide in jeweils einer Nukleotidposition von Locus 1\_259 und Locus 22\_012, weshalb eine exakte Bestimmung des transkriptionsaktiven Provirus in beiden Fällen nicht möglich ist. Analog verhält es sich bei Klon 2371-A/1, während Klon 2371-A/2 Locus 5\_544 zugeordnet werden kann.

#### **4.2.2 Germinom**

Der Begriff Germinom stellt eine übergreifende Bezeichnung für maligne Tumoren des Keimgewebes dar („Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch“, 1998). Zu diesen zählen neben dem bereits erläuterten Seminom auch die nichtseminomatösen Keimzelltumoren wie die embryonalen Karzinome oder Teratokarzinome, Chorionkarzinome und Mischtumoren mit Anteilen eines Seminoms (Mostofi und Sobin, 1977).

In dieser Tumorgruppe wurde ein RT-PCR-Produkt in die Analysen einbezogen, deren Ergebnisse die folgende Tabelle veranschaulicht.

*Tabelle 8: Analyseresultate der Germinom-cDNA-Sequenzen*

Klon	Transkript (cDNA)	Locus	Deletionen (bp)	Insertionen (bp)
TB59-2	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB59-5	<i>rec</i>	HML-2.HOM	-	1
TB59-6	<i>np9</i>	1_259 oder 22_012	-	-
TB59-10	<i>np9</i>	1_259 oder 22_012	-	-
TB59-12	<i>np9</i>	3_294	-	-

*In der ersten Spalte der Tabelle werden die analysierten Klone aufgeführt. Die zweite Spalte nennt das exprimierte Transkript, aus der folgenden Spalte wird der zugehörige Locus ersichtlich. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung). Den Spalten 4 und 5 kann die Anzahl (in bp) an Deletionen bzw. Insertionen innerhalb der entsprechenden Sequenz entnommen werden. „/“: Die cDNA-Sequenz zeigt keine Homologie zu *np9* oder *rec*. „-“: Es sind keine Deletionen bzw. Insertionen vorhanden.*

Das Spleißprodukt *rec* wurde einmal nachgewiesen (Klon 5). Die Sequenz, in der 3 bp nicht lesbar waren (nt 66 bis nt 68), wurde auf Chromosom 7 (HML-2.HOM) detektiert. Das zuletzt positionierte dieser nicht lesbaren bp stellt zugleich eine Insertion dar. Vier Sequenzen entsprechen *np9*-Transkripten. Die Klone 2 und 12 werden durch Provirus HERV-KII auf Locus 3\_294 exprimiert. Die Lokalisation der Klone 6 und 10 kann nicht eindeutig bestimmt werden. Die cDNA beider Klone weist jeweils zwei Nukleotiddifferenzen zu den Proviren auf Chromosom 1\_259 und 22\_012 auf, weshalb nicht exakt feststeht, welches der beiden Proviren letztendlich transkriptionsaktiv war.

#### **4.2.3 Mammakarzinome**

Mammakarzinome zählen zu den malignen Neoplasien der Brustdrüse. Die Altersverteilung betroffener Patientinnen liegt bei dieser bösartigen Tumorform in der Regel zwischen 45 und 70 Jahren, während benigne Veränderungen eher bei jüngeren Patientinnen auftreten. Mammakarzinome werden nach histologischen Kriterien klassifiziert in nichtinvasive und invasive Karzinome (WHO, 1981). Die Metastasierung erfolgt bereits in frühem Stadium lymphogen in die regionalen Lymphknoten („Pschyrembel Klinisches Wörterbuch“, 1998).

In dieser Tumorgruppe wurden elf cDNAs zugehörig zu RT-PCR-Produkt 16637/01 analysiert (Tabelle 9). Des Weiteren konnten den Auswertungen vier bereits vorliegende cDNA-Sequenzen von Klon 12348 hinzugefügt werden.

Tabelle 9: Analyseresultate der Mammakarzinom-cDNA-Sequenzen

Klon	Transkript (cDNA)	Locus	Deletionen (bp)	Insertionen (bp)
16637/01-1	/	8p12	-	-
16637-01-2	<i>np9</i>	3_294	-	-
16637/01-3	/	11_424	-	-
16637/01-4	/	Xp22.2	-	-
16637/01-5	/	Xp22.2	-	-
16637/01-6	/	11_424	-	-
16637/01-7	<i>np9</i>	3_294	-	-
16637/01-8	/	11_424	-	-
16637/01-10	/	8p12	-	-
16637/01-11	<i>np9</i>	3_294	-	-
16637/01-12	/	8p12	-	-
12348-A/2C5	<i>np9</i>	1_259 oder 22_012	3	-
12348-A/2D5	<i>np9</i>	3_294	-	-
12348-B/1F	<i>rec</i>	HML-2.HOM	231	-
12348-B/1E	<i>rec</i>	HML-2.HOM	267	-

In der ersten Spalte der Tabelle werden die analysierten Klone aufgeführt. Die zweite Spalte nennt das exprimierte Transkript, aus der folgenden Spalte wird der zugehörige Locus ersichtlich. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung). Den Spalten 4 und 5 kann die Anzahl (in bp) an Deletionen bzw. Insertionen innerhalb der entsprechenden Sequenz entnommen werden. „/“: Die cDNA-Sequenz zeigt keine Homologie zu *np9* oder *rec*. „-“: Es sind keine Deletionen bzw. Insertionen vorhanden.

Acht Sequenzen weisen keine Homologie zu den beiden gesuchten Spleißprodukten des *env*-Leserahmens von HERV-K(HML-2) auf („/“, Tabelle 9). Die Klone 16637/01-2, -7 und -11 werden Locus 3\_294 zugeordnet und stellen *np9*-Sequenzen dar. Die cDNA-Sequenzen von 12348-A/2C5 und -A/2D5 entsprechen ebenfalls *np9*. Dabei stammt die -2/D5-Sequenz ebenfalls von Chromosom 3\_294 ab, während die -2/C5-Sequenz in jeweils einer Nukleotidposition sowohl von Chromosom 1\_259 als auch von Chromosom 22\_012 differiert. Zusätzlich weist sie eine 3 bp umfassende Deletion an den Positionen nt 41 bis nt 43 auf.

Die cDNA-Sequenzen der Klone -B/1F und -B/1E stellen *rec*-Transkripte von Chromosom 7 (HML-2.HOM) dar. Beide Klone weisen jedoch eine schlechte Sequenzqualität auf. Die Nukleotidpositionen nt 466 und nt 468 der cDNA von Klon 12348-B/1E sind nicht lesbar. Weiterhin ist diese Sequenz von Position nt 1-nt 267 deletiert, während die Sequenz von Klon 12348-B/1F bereits an Position nt 268 stoppt.

#### 4.2.4 Glioblastome

Glioblastome zählen zu den intrakraniellen Tumoren. Intrakranielle Tumoren werden nach WHO-Kriterien eingeteilt in primäre (von Neuroepithel, Ektoderm oder Mesoderm ausgehende) Hirntumoren, intrakranielle Metastasen extrakranieller Primärtumoren

und in intrakranielle tumorähnliche Raumforderungen (Zuelch, 1979). Glioblastome (maligne Gliome) werden als maligne neuroektodermale Tumoren in die Klasse der primären Hirntumoren eingegliedert. Ihre Histogenese kann aufgrund einer starken Entdifferenzierung oft nicht mehr bestimmt werden. Sie sind häufig von Beginn an stark anaplastisch oder sie entstehen durch sekundäre Anaplasie aus Astrozytomen, Oligodendrogliomen oder Ependymomen. Die Altersverteilung betroffener Patienten liegt zwischen 45 und 65 Jahren. Aufgrund des raschen Tumorwachstums und der hohen Malignität dieser Tumorart ist die Prognose als schlecht einzustufen („Pschyrembel Klinisches Wörterbuch“, 1998).

In dieser Tumorgruppe wurden sechs RT-PCR-Produkte kloniert (Tabelle 5). Klone aus zwei RT-PCR-Produkten wurden letztendlich sequenziert. Eine Zusammenfassung über das Ergebnis der Sequenzanalysen gibt Tabelle 10.

*Tabelle 10: Analyseresultate der Glioblastom-cDNA-Sequenzen*

Klon	Transkript (cDNA)	Locus	Deletionen (bp)	Insertionen (bp)
TB34-1	<i>rec</i>	19_407	12	-
TB34-2	/	8p12	-	-
TB34-3	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB34-4	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB34-5	/	8p12	-	-
TB34-6	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB34-7	/	8p12	-	-
TB34-8	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB34-9	/	8p12	-	-
TB34-11	<i>rec</i>	12_216	3	3
TB34-12	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB26-12	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB26-13	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB26-14	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB26-15	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB26-16	<i>np9</i>	3_294	1 (P)	-
TB26-18	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB26-19	/	8p12	-	-
TB26-20	/	8q21.13	-	-
TB26-21	<i>np9</i>	3_294	2 (P)	-
TB26-24	<i>np9</i>	3_294	-	-

*In der ersten Spalte der Tabelle werden die analysierten Klone aufgeführt. Die zweite Spalte nennt das exprimierte Transkript, aus der folgenden Spalte wird der zugehörige Locus ersichtlich. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung). Den Spalten 4 und 5 kann die Anzahl (in bp) an Deletionen bzw. Insertionen innerhalb der entsprechenden Sequenz entnommen werden. „/“: Die cDNA-Sequenz zeigt keine Homologie zu *np9* oder *rec*. „-“: Es sind keine Deletionen bzw. Insertionen vorhanden. „(P)“: Die Deletion/Insertion liegt im Bereich der Primersequenz.*

Die cDNA-Sequenzen der Klone TB34-3, -4, -6, -8 und -12 entsprechen in ihrer Gesamtheit *np9*-Transkripten. Das exprimierende Provirus ist auf Chromosom 3\_294 lokalisiert. Bei den cDNAs der Klone 1 und 11 handelt es sich um *rec*-Transkripte. Die Sequenz von Klon TB34-1, deren genomischer Ursprung auf Chromosom 19\_407 detektiert werden konnte, weist eine Deletion von einem bp an Position nt 85, drei bp an den Positionen nt 104-nt 106, drei bp an den Positionen nt 380-nt 382, vier bp im Sequenzbereich von nt 387-nt 391 und einem bp an Position nt 474 der *rec*-Vergleichssequenz von HERV-K(HML-2.HOM) auf. Die auf Locus 12\_216 lokalisierte Sequenz von Klon TB34-11 wiederum differiert von den vorliegenden *rec*-Vergleichssequenzen in einer Deletion von drei bp analog zur Sequenz von TB34-1 an den Positionen nt 104 bis nt 107 sowie einer Insertion von drei bp (AAA) an den Positionen nt 190-nt 192. Vier vorliegende cDNA-Sequenzen (TB34-2, -5, -7 und -9) können auf Locus 8p12 lokalisiert werden, eine Sequenz auf Locus 8q21.13. Sie entsprechen nicht den gesuchten Spleißprodukten („“).

Die Analyse der cDNA-Sequenzen der Klone von RT-PCR-Produkt TB26 zeigt ein sehr homogenes Bild. Acht der untersuchten cDNA-Sequenzen entspringen als *env*-Spleißprodukt *np9* Locus 3\_294. Dabei weisen die Klone TB26-16 und TB26-21 jeweils eine bzw. zwei Deletionen im Bereich der Primersequenz auf. Zwei Transkripte (TB26-19, TB26-20) korrelieren nicht mit den gesuchten *env*-Spleißprodukten („“).

#### **4.2.5 Anaplastische Astrozytome**

Astrozytome sind von den Astrozyten abstammende Gliome und somit ebenfalls von der Neuroglia ausgehende, vor allem im Gehirn lokalisierte Tumoren. Sie zählen wie die Glioblastome zu den primären Hirntumoren mit neuroepithelialeem Ursprungsgewebe (Zuelch, 1979) und werden graduell unterteilt (Grad I bis IV), wobei die benignen Neoplasien zu den Graden I und II zählen, während die malignen Astrozytome den Graden III und IV zugeordnet werden („Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch“, 1998).

Tabelle 11: Analyseresultate der Astrozytom-cDNA-Sequenzen

Klon	Transkript (cDNA)	Locus	Deletionen (bp)	Insertionen (bp)
TB71-1	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB71-2	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB71-3	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB71-4	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB71-5	/	mitochondrial	-	-
TB71-6	<i>np9</i>	3_294	6 (P)	-
TB71-10	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB71-11	<i>np9</i>	3_294	-	-
TB71-12	<i>np9</i>	3_294	-	-

In der ersten Spalte der Tabelle werden die analysierten Klone aufgeführt. Die zweite Spalte nennt das exprimierte Transkript, aus der folgenden Spalte wird der zugehörige Locus ersichtlich. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung). Den Spalten 4 und 5 kann die Anzahl (in bp) an Deletionen bzw. Insertionen innerhalb der entsprechenden Sequenz entnommen werden. „/“: Die cDNA-Sequenz zeigt keine Homologie zu *np9* oder *rec*. „-“: Es sind keine Deletionen bzw. Insertionen vorhanden. „(P)“: Die Deletion/Insertion liegt im Bereich der Primersequenz.

In dieser Tumorgruppe wurden zwei RT-PCR-Produkte kloniert (Tabelle 11). Klone von Produkt TB71 wurden sequenziert. Auch hier zeigt die Analyse der generierten cDNA-Sequenzen ein homogenes Bild. Mit Ausnahme des Transkriptes TB71-5, welches nach BLAT-Analysen eine mitochondriale Lokalisation aufweist und somit nicht homolog zu *np9* oder *rec* ist („/“), entstammen die übrigen Transkripte als *np9*-Sequenzen in ihrer Gesamtheit exakt Locus 3\_294. Nur die cDNA-Sequenz von Klon TB71-11 weist eine Nukleotiddifferenz an Position nt 164 (A → T) bezogen auf den genannten Locus auf.

#### 4.2.6 Melanome

Melanome sind von Melanozyten ausgehende Tumoren der Epidermis, in selteneren Fällen auch der Schleimhäute. Maligne Melanome werden klassifiziert in fünf Gruppen (oberflächlich spreitendes Melanom, Lentigo-maligna-Melanom, noduläres Melanom, akral-lentigöses Melanom und Sonderformen), welche sich in Auftreten und Progredienz voneinander unterscheiden. Melanome metastasieren sowohl lymphogen als auch hämatogen. Ihre Stadieneinteilung erfolgt anhand klinischer (Metastasierung) und histologischer (Tumordicke) Kriterien („Pschyrembel Klinisches Wörterbuch“, 1998).

Die cDNAs dieser Tumorgruppe wurden in dieser Arbeit nicht selbst generiert, sondern in sequenzierter Form von Herrn Prof. Dr. Hermann Herbst, Vivantes, Berlin zur

Verfügung gestellt (Kapitel 2.10). Analysen der vier Transkripte zeigen zweimal *np9*- und zweimal *rec*-Expression (Tabelle 12).

*Tabelle 12: Analyseresultate der Melanom-cDNA-Sequenzen*

Klon	Transkript (cDNA)	Locus	Deletionen (bp)	Insertionen (bp)
2-A/1	<i>np9</i>	1_504	-	-
2-A/2	<i>np9</i>	3_294	-	-
2-C/1	<i>rec</i>	HML-2.HOM	9	-
2-C/2	<i>rec</i>	HML-2.HOM	-	-

In der ersten Spalte der Tabelle werden die analysierten Klone aufgeführt. Die zweite Spalte nennt das exprimierte Transkript, aus der folgenden Spalte wird der zugehörige Locus ersichtlich. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung). Den Spalten 4 und 5 kann die Anzahl (in bp) an Deletionen bzw. Insertionen innerhalb der entsprechenden Sequenz entnommen werden. „/“: Die cDNA-Sequenz zeigt keine Homologie zu *np9* oder *rec*. „-“: Es sind keine Deletionen bzw. Insertionen vorhanden.

Klon 2-A/1 differiert hierbei von Locus 1\_504 in nur einem Nukleotid an Position nt 89 der *np9*-Sequenz und kann somit mit diesem Locus assoziiert werden. Die Sequenz von Klon 2-A/2 stimmt exakt mit der *np9*-Sequenz von Locus 3\_294 überein. Die cDNAs der Klone 2-C/1 und 2-C/2 wiederum sind homolog zur *rec*-Sequenz von Locus HML-2.HOM. Dabei ist die Sequenz von Klon 2-C/1 deletiert an den Positionen nt 269-nt 276 und nt 370. Die Nukleotidposition 496 ist nicht lesbar. Die cDNA von Klon 2-C/2 zeigt eine Insertion (C) an Position nt 128 der *rec*-Vergleichssequenzen. Auch hier ist Position nt 496 nicht lesbar.

#### **4.2.7 Nierenzellkarzinome**

Das Nierenzellkarzinom zählt zu den epithelialen Nierentumoren, die nach WHO-Klassifikation von 1998 histologisch in benigne und maligne Neoplasien unterteilt werden (Mostofi et al., 1998). Diese maligne Neoplasie tritt mit einem Häufigkeitsmaximum zwischen dem 45. und dem 75. Lebensjahr vor allem bei Männern auf. Der Tumor ist meistens im Nierenpol lokalisiert und bricht im späteren Erkrankungsstadium ins Nierenbecken und in größere Gefäße (V. cava, V. renalis) ein, wodurch es zu einer hämatogenen Metastasierung kommt. Die Prognose für die betroffenen Patienten ist abhängig vom Tumorstadium („Pschyrembel Klinisches Wörterbuch“, 1998).

Auch hier wurde auf bereits vorliegende Sequenzen zurückgegriffen (Kapitel 2.10). Vier der fünf cDNAs erscheinen homolog zu *rec*-Sequenzen, deren genomischer Ursprung auf Locus 12\_216 zu finden ist (Tabelle 13). Diese vier Sequenzen weisen die für Locus 12\_216 spezifische 3 bp-Deletion an den Positionen nt 103-nt 105 der *rec*-

Sequenz auf und sind somit eindeutig zuzuordnen. Jeweils eine Deletion befindet sich auch an Position nt 1 der cDNAs der Klone 1496-B/1C3 und -B/1D3. Die Sequenz von Klon 1496-B/2F3 stoppt an Position nt 368 der *rec*-Sequenz. Die Nukleotidposition nt 496 von Klon 1496-B/2E3 ist nicht lesbar. Die cDNA von Klon 1496-A/1 stimmt exakt mit Locus 3\_294 überein.

*Tabelle 13: Analyseresultate der Nierenzellkarzinom-cDNA-Sequenzen*

Klon	Transkript (cDNA)	Locus	Deletionen (bp)	Insertionen (bp)
1496-A/1	<i>np9</i>	3_294	-	-
1496-B/1C3	<i>rec</i>	12_216	4	-
1496-B/1D3	<i>rec</i>	12_216	4	-
1496-B/2E3	<i>rec</i>	12_216	3	-
1496-B/2F3	<i>rec</i>	12_216	132	-

*In der ersten Spalte der Tabelle werden die analysierten Klone aufgeführt. Die zweite Spalte nennt das exprimierte Transkript, aus der folgenden Spalte wird der zugehörige Locus ersichtlich. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung). Den Spalten 4 und 5 kann die Anzahl (in bp) an Deletionen bzw. Insertionen innerhalb der entsprechenden Sequenz entnommen werden. „/“: Die cDNA-Sequenz zeigt keine Homologie zu *np9* oder *rec*. „-“: Es sind keine Deletionen bzw. Insertionen vorhanden.*

### 4.3 Untersuchung des nativen Gewebes

Zusätzlich zu den für Klonierungen vorgesehenen RT-PCR-Produkten standen drei Biopsien aus nativen Geweben zur Verfügung. Von Patient A lag eine Probe gesundes Gewebe und eine Probe neoplastisch entartetes Gewebe aus einem Keimzelltumor vor. Bei der Neoplasie handelte es sich um ein Seminom. Von Patient B existierte ausschließlich eine Biopsie aus gesundem Hodengewebe. Die Gewebeproben wurden ebenfalls auf transkriptionelle Aktivität von HERV-K Proviren untersucht. Auch hier lag das Hauptaugenmerk auf der propagierten Expression des *np9*-Gens im neoplastisch entarteten Gewebe.

#### 4.3.1 RNA-Elution und RNA Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle wurde zunächst eine RNA-Elution an Zellen der Zelllinie Tera-1 nach den in Kapitel 3.2.1.1 geschilderten Arbeitsschritten durchgeführt. Das Ergebnis wurde nach RNA Agarose-Gelelektrophorese photographisch dokumentiert (Abb. 9). Nach Verifizierung der Methodik erfolgte nacheinander die Isolierung der Gesamt-RNA aus den einzelnen Proben mit Trizol® nach der in Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen Vorgehensweise. Dabei wurden die Proben strikt voneinander getrennt. Um potentielle Kreuzkontaminationen zu vermeiden, erfolgten die RNA-Elution und alle darauf folgenden Arbeitsschritte inklusive der RT-PCR bei jeder Biopsie separat. Danach

wurde mit der Bearbeitung der nächsten Gewebeprobe begonnen. Es wurden keine Biopsien zeitlich parallel untersucht.

Die gewonnene Gesamt-RNA wurde zur Qualitätsüberprüfung in einem Formaldehyd-Agarosegel (Kapitel 3.2.3) aufgetrennt. Die folgende Abbildung zeigt die RNA Agarose-Gelelektrophoresen der Tera-1-Zellen sowie der drei zur Analyse stehenden Gewebeproben, aus welchen die Gesamt-RNA eluiert wurde.

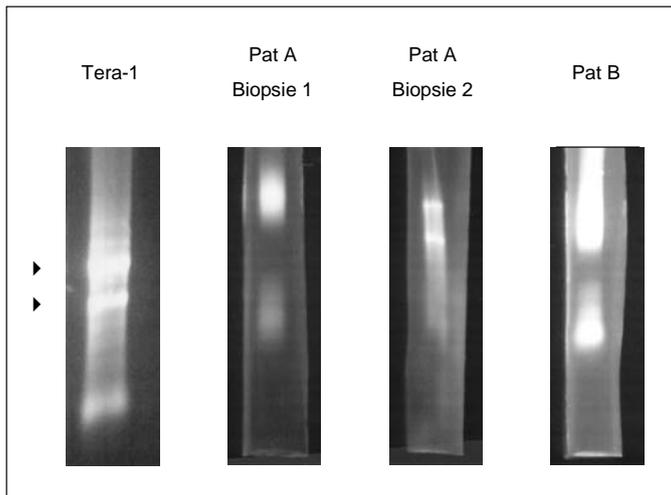


Abbildung 9: RNA-Agarose-Gelelektrophoresen

1%-iges Formaldehyd-Agarosegel mit Gesamt-RNA von Tera-1-Zellen (Tera-1), sowie RNA der aus gesundem Hodengewebe entnommenen Biopsie von Patient A (Pat A Biopsie 1), der aus Seminomgewebe entnommenen Biopsie von Patient A (Pat A Biopsie 2) und der aus gesundem Hodengewebe entnommenen Biopsie von Patient B (Pat B). Die ribosomalen RNA-Banden sind beispielhaft durch Pfeile (►) gekennzeichnet.

Die markierten Banden der 18S und 28S rRNA deuten auf eine intakte RNA hin. Demzufolge konnten die RNA-Isolate in die RT-PCR eingesetzt werden.

### 4.3.2 RT-PCR

Zur Durchführung der RT-PCR wurde die Gesamt-RNA jeder Probe einem DNase-Verdau unterzogen (Kapitel 3.2.3) und mit unspezifischen Hexameren revers transkribiert. Mit der generierten cDNA wurde im Anschluss eine PCR durchgeführt (Kapitel 3.1.4). Die Amplifikation von Transkripten aus dem *env*-Leserahmen erfolgte mit den *env*-spezifischen Primern GesENVFor und GesENVRev (Kapitel 2.6). Von jedem Gesamt-RNA-Ansatz wurden als Negativkontrollen eine aliquote nicht umgeschriebene, mit DNase verdaute RNA sowie eine Wasserkontrolle in die PCR eingesetzt. Um falsch negative Ergebnisse bei der Amplifikation des Zielgens auszuschließen, wurde zusätzlich mit der cDNA jeder Probe eine PCR mit Primern durchgeführt, die spezifisch für Haushaltsgene sind. Dazu wurden die Primer GAPDH-M und GAPDH-N eingesetzt (Kapitel 2.6). Die GAPDH-Kontrolle dient gleichzeitig

---

dazu, die Qualität der RNA und der RT-reaktiven cDNA zu überprüfen. Auch hier wurden die geschilderten Negativkontrollen durchgeführt. Die folgenden Abbildungen dokumentieren die Ergebnisse.

#### 4.3.2.1 Zelllinie Tera-1

Die DNA Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 10) erbrachte in allen Negativkontrollen keine Signale. Dies weist sowohl auf eine DNA-freie RNA (Kontrollen 1- und 2-) als auch auf kontaminationsfreie Arbeit (Wasserkontrollen 1w, 2w) hin. Die mit den GAPDH-Primern amplifizierte cDNA lieferte erwartungsgemäß ein Produkt. In dem mit den *env*-spezifischen Primern umgeschriebenen Ansatz waren zwei Signale zu erkennen, welche somit nachweisbar von einer revers transkribierten DNA stammten. Anhand ihrer Größe konnten sie den Produkten *np9* (Signal bei ca. 250 bp) und *rec* (Signal bei ca. 450 bp) zugeordnet werden.

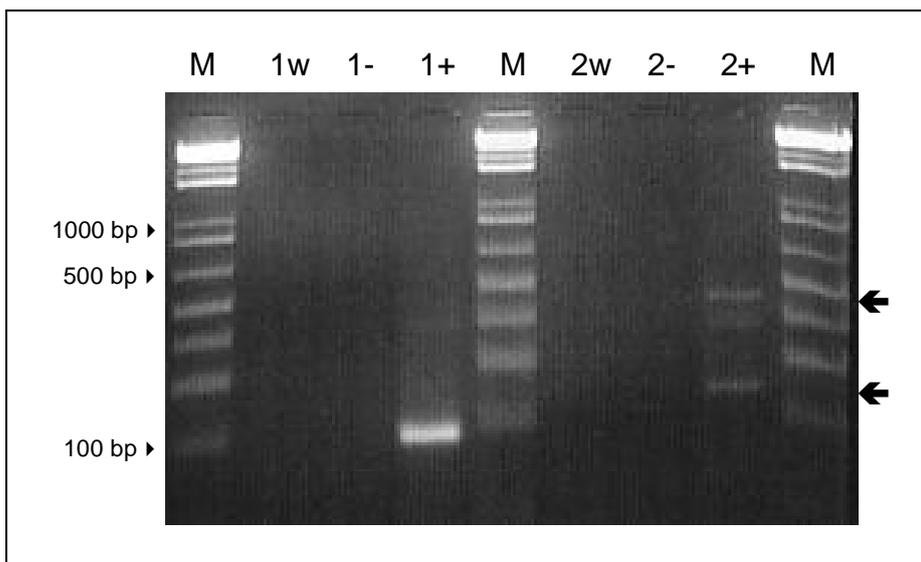


Abbildung 10: Expressionsnachweis der beiden *env*-Transkripte *np9* und *rec* in Zellen der Zelllinie Tera-1. Die Auftrennung erfolgte in einem 3%-igen Agarosegel. Die Spuren 1w, 1- und 1+ stellen die GAPDH-Ansätze dar, die Spuren 2w, 2- und 2+ die Ansätze der mit den *env*-spezifischen Primern *GesENVFor* und *GesENVRev* amplifizierten cDNA. Die Wasserkontrollen (1w, 2w) sind beide negativ, ebenso die beiden Ansätze ohne RT-Reaktion (1-, 2-). Die GAPDH-Kontrolle zeigt ein deutliches Signal (1+). Die Lokalisationen der RT-PCR-Produkte in Spur 2+ (cDNA + *GesENVFor* + *GesENVRev*) bei einer ungefähren Größe von 250 bp (*np9*) und 450 bp (*rec*) sind durch zwei Pfeile (↔) markiert. Die Größe der Banden wird anhand des DNA-Molekulargewichtsmarkers (M) ersichtlich.

#### 4.3.2.2 Patient A; gesundes Hodengewebe

Auch hier verliefen die vier Negativkontrollen negativ (Abb. 11). Die mit den GAPDH-Primern amplifizierte cDNA ließ erneut die erwartete Bande bei ca. 200 bp erkennen (1+). Die mit den spezifischen Primern GesENVFor und GesENVRev amplifizierte cDNA zeigte kein Signal. Es hat keine Amplifikation stattgefunden. In der Ausgangsprobe konnte somit kein *env*-Produkt nachgewiesen werden. Ein falsch negatives Ergebnis kann aufgrund der positiven GAPDH-Kontrolle ausgeschlossen werden.

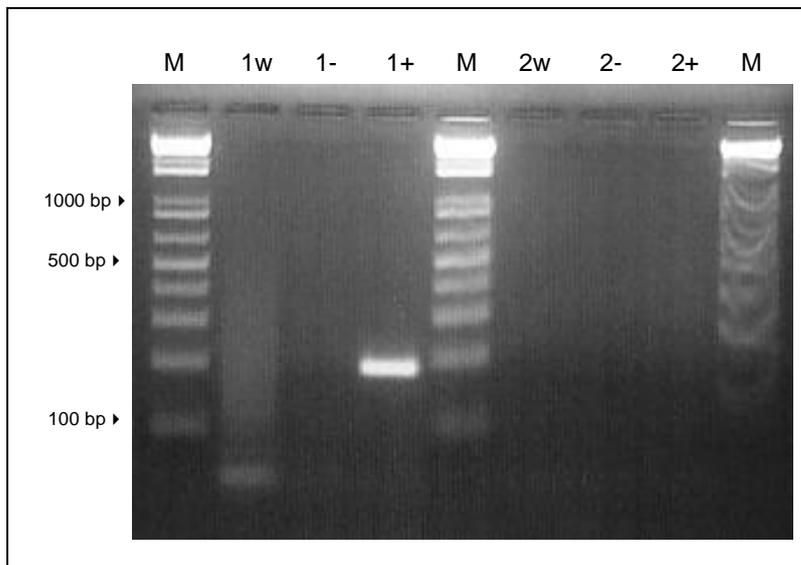


Abbildung 11: RT-PCR der aus gesundem Hodengewebe (Patient A) eluierten Gesamt-RNA.

Die Auftrennung erfolgte in einem 3%-igen Agarosegel. Die Spuren 1w, 1- und 1+ stellen die GAPDH-Ansätze dar, die Spuren 2w, 2- und 2+ die Ansätze der mit den *env*-spezifischen Primern GesENVFor und GesENVRev amplifizierten cDNA. Die mit M gekennzeichneten Spuren beinhalten den DNA-Molekulargewichtsmarker. Die Negativkontrollen (1w, 1-, 2w, 2-) zeigen keine Signale. Die GAPDH-Kontrolle zeigt eine deutliche Bande (1+). Ebenfalls kein Signal zeigt die mit *env*-spezifischen Primern amplifizierte cDNA. Somit sind keine *env*-Produkte in der Ausgangsprobe vorhanden.

#### 4.3.2.3 Patient A; Seminombiopsie

Die Negativkontrollen verliefen negativ. In der GAPDH-Kontrolle erschien bei 200 bp eine Bande (1+). Die mit den spezifischen *env*-Primern amplifizierte cDNA zeigte zwei deutliche Signale: Eine Bande bei ca. 250 bp sowie eine Bande bei ca. 450 bp. In der nicht umgeschriebenen Kontrolle erschien kein Signal; daher stammten die beiden Banden in Spur 2+ von einer revers transkribierten RNA ab. Diese RT-PCR wurde nochmals mit gleichem Ergebnis durchgeführt.

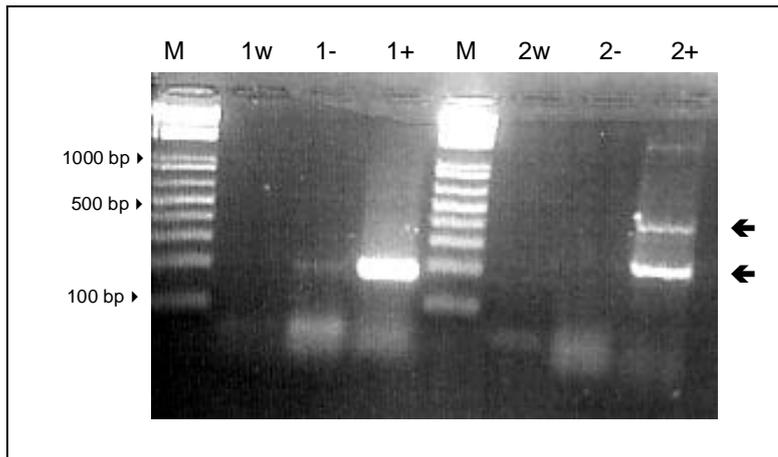


Abbildung 12: Expressionsnachweis der beiden *env*-Transkripte *np9* und *rec* in Seminomgewebe.

Die Auftrennung erfolgte in einem 3%-igen Agarosegel. Die Spuren 1w, 1- und 1+ stellen die GAPDH-Ansätze dar, die Spuren 2w, 2- und 2+ die Ansätze der mit den *env*-spezifischen Primern *GesENVFor* und *GesENVRev* amplifizierten cDNA. Die mit M gekennzeichneten Spuren beinhalten den DNA-Molekulargewichtsmarker. Die Wasserkontrollen (1w, 2w) sind beide negativ, ebenso die beiden Ansätze ohne RT-Reaktion (1-, 2-). Die GAPDH-Kontrolle zeigt ein deutliches Signal (1+). Die Lokalisationen der RT-PCR-Produkte in Spur 2+ (cDNA + *GesENVFor* + *GesENVRev*) bei einer ungefähren Größe von 250 bp (*np9*) und 450 bp (*rec*) sind durch zwei Pfeile (↔) markiert.

### 4.3.2.4 Patient B; gesundes Hodengewebe

Hier zeigten sich in der DNA Agarose-Gelelektrophorese in den Spuren 1+ und 2+ ebenfalls deutliche Signale (Abb. 13). Da die Kontrollspur mit der nicht umgeschriebenen RNA (1-) keine Bande aufwies, stammten die Signale eindeutig von cDNA. Eine Anwesenheit von DNA-Resten in der Ausgangsprobe war ausgeschlossen. Die *env*-spezifischen Primer konnten in der gebildeten cDNA an basenkomplementäre Sequenzen binden. Somit waren unabdingbar Teile des *env*-Gens präsent. Diese RT-PCR wurde zweimalig mit gleichem Ergebnis wiederholt.

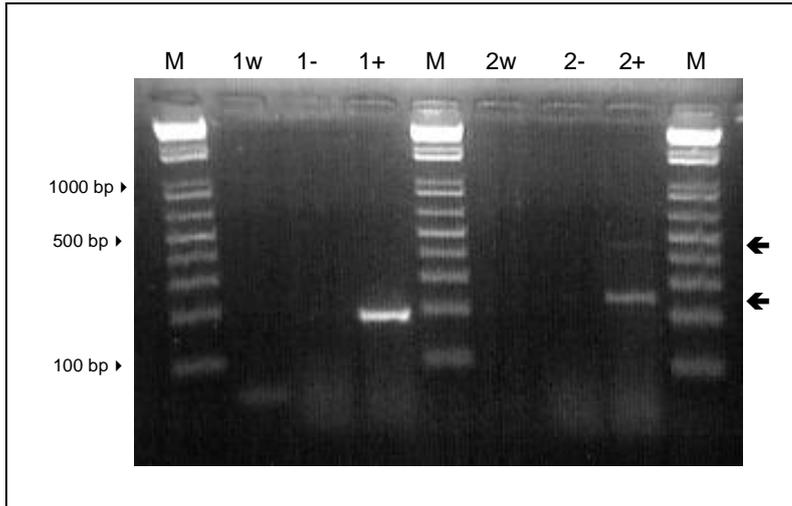


Abbildung 13: RT-PCR der aus gesundem Hodengewebe (Patient B) eluierten Gesamt-RNA.

Die Auftrennung erfolgte in einem 3%-igen Agarosegel. Die Spuren 1w, 1- und 1+ stellen die GAPDH-Ansätze dar, die Spuren 2w, 2- und 2+ die Ansätze der mit den env-spezifischen Primern GesENVFor und GesENVRev amplifizierten cDNA. Die mit M gekennzeichneten Spuren beinhalten den DNA-Molekulargewichtsmarker. Die Wasserkontrollen (1w, 2w) sind beide negativ, ebenso die beiden Ansätze ohne RT-Reaktion (1-, 2-). Die GAPDH-Kontrolle zeigt ein deutliches Signal (Spur 1+). Die Lokalisationen der RT-PCR-Produkte in Spur 2+ (cDNA + GesENVFor + GesENVRev) bei einer ungefähren Größe von 250 bp (np9) und 450 bp (rec) sind durch zwei Pfeile (←) markiert.

#### 4.3.3 Klonierung in pGEM®-T

Das aus Seminomgewebe (Patient A) generierte RT-PCR-Produkt wurde analog zu den vorherigen RT-PCR-Produkten unter Verwendung des Vektors pGEM®-T kloniert. Nach Isolierung der Plasmide durch alkalische Lyse wurden drei der 24 generierten Klone sequenziert.

#### 4.3.4 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse der Klone HT14, HT17 und HT20 erbrachte folgendes Ergebnis:

Tabelle 14: Analyseresultate der Seminom-cDNA-Sequenzen

Klon	Transkript (cDNA)	Locus	Deletionen (bp)	Insertionen (bp)
HT-14	rec	6_324	-	-
HT-17	np9	5_544	-	36
HT-20	np9	21_019	3	-

In der ersten Spalte der Tabelle werden die analysierten Klone aufgeführt. Die zweite Spalte nennt das exprimierte Transkript, aus der folgenden Spalte wird der zugehörige Locus ersichtlich. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung). Den Spalten 4 und 5 kann die Anzahl (in bp) an Deletionen bzw. Insertionen innerhalb der entsprechenden Sequenz entnommen werden. „/“: Die cDNA-Sequenz zeigt keine Homologie zu np9 oder rec. „-“: Es sind keine Deletionen bzw. Insertionen vorhanden.

Die Sequenz von Klon 14 stammt als *rec*-Sequenz von einem Provirus Typ 2 auf Chromosom 6 (Locus 6\_324) ab. Die übrigen Sequenzen weisen im Alignment Übereinstimmungen mit Typ 1-Proviren auf. Die *np9*-Sequenz von Klon HT-17 mit einer Insertion von 37 bp zwischen nt 44 und nt 81 korreliert mit Locus 5\_544. Die *np9*-Sequenz von Klon HT-20 zeigt eine Deletion im Bereich nt 42 bis nt 44 und kann mit Locus 21\_019 assoziiert werden.

#### 4.4 Zusammenfassende Darstellung der Sequenzanalysen

Die folgende Tabelle zielt darauf ab, einen Überblick über die in den einzelnen Tumorarten letztendlich detektierten genomischen Lokalisationen der transkriptionell aktiven Proviren zu vermitteln und somit die detektierten Varianten von *np9* zu zeigen. Zur Vollständigkeit werden auch die ermittelten *rec*-Loci aufgeführt.

Tabelle 15: Zusammenfassende Darstellung der transkriptionell aktiven Loci

	Locus	Seminom	Germinom	Mamma- karzinom	Astrozytom	Glioblastom	Melanom	Nierenzell- karzinom
<i>np9</i>	1_259	-	-	-	-	-	-	-
	1_504	-	-	-	-	-	1	-
	3_294	10	2	4	8	13	1	1
	5_544	4	-	-	-	-	-	-
	21_019	3	-	-	-	-	-	-
	1_259/3_294	1	-	-	-	-	-	-
	1_259/22_012	4	2	1	-	-	-	-
<i>rec</i>	6_324	1	-	-	-	-	-	-
	HML-2.HOM	3	1	2	-	-	2	-
	12_216	1	-	-	-	1	-	4
	19_352	-	-	-	-	-	-	-
	19_407	-	-	-	-	1	-	-
	6_324/19_352	1	-	-	-	-	-	-
Summe Klone	40	5	15	9	21	4	5	
Summe <i>np9</i>	22	4	5	8	13	2	1	
Summe <i>rec</i>	6	1	2	-	2	2	4	

Der Zeile „Summe Klone“ kann die Anzahl der pro Tumorart analysierten Klone respektive cDNA-Sequenzen entnommen werden. Die beiden Folgezeilen dokumentieren in absoluten Zahlen die pro Tumorart nachgewiesenen *np9*- bzw. *rec*-Transkripte. Differenzen zur Gesamtsumme ergeben sich durch Transkripte ohne Homologie zu *np9* oder *rec*. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung).

Die Analysen zeigen, dass in Tumoren unterschiedlicher Arten insgesamt mindestens fünf bzw. sechs genomisch different lokalisierte *np9*-exprimierende Proviren existent sind (1\_259, 1\_504, 3\_294, 5\_544, 21\_019, 22\_012). Unklar ist dabei, welcher der beiden Loci 1\_259 und 22\_012 exprimiert wird, da sich dies aus den durchgeführten

cDNA-Alignments aufgrund gleicher Anzahl an Nukleotiddifferenzen zu den verglichenen Proviren (Kapitel 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3) nicht exakt schlussfolgern lässt. Alle analysierten Tumortypen zeigen *np9*-Expression. In sechs der sieben untersuchten Tumorarten wurden sowohl *rec* als auch *np9* exprimiert.

Die Untersuchung der Klone mehrerer RT-PCR-Produkte veranschaulicht, dass nicht nur in der jeweiligen Tumorentität, sondern auch im einzelnen Tumor unterschiedliche Proviren transkriptionell aktiv sind. Anhand von RT-PCR-Produkt 2164/00S (Seminom) lässt sich transkriptionelle Aktivität sowohl der auf Chromosom 3, als auch der auf Chromosom 1 bzw. 22 lokalisierten Proviren nachweisen. Die Loci 5\_544 und 1\_259 bzw. 22\_012 sind jeweils in den Seminom-RT-PCR-Produkten 118 und 2371 aktiv, und über die aus dem nativen Seminommaterial generierten Klone (HT) wird die in diesem Tumor vorhandene Aktivität der Loci 5\_544 und 21\_019 sichtbar. Ebenso verhält es sich bzgl. des Germinoms. Hier konnte das *env*-Spleißprodukt ausgehend von den Loci 3\_294 sowie 1\_259 bzw. 22\_012 nachgewiesen werden. Die Klone des RT-PCR-Produktes 12348 (Mammakarzinom) verdeutlichen die parallele Aktivität der Loci 3\_294 und 1\_259 bzw. 22\_012. In dem untersuchten Melanom waren die Loci 5\_504 und 3\_294 transkriptionell aktiv. Anhand der Klone des RT-PCR-Produktes des analysierten Nierenzellkarzinoms konnte die Transkription sowohl von *rec* als auch von *np9* und somit die Aktivität sowohl von Typ 1- als auch von Typ 2-Proviren nachgewiesen werden. Transkriptionell aktiv bzgl. *np9* war hier jedoch allein das Provirus mit der genomischen Lokalisation 3\_294. Ausschließlich in den untersuchten Hirntumoren (Glioblastom, anaplastisches Astrozytom) konnte sowohl in den untersuchten RT-PCR-Produkten der einzelnen Tumoren als auch in den beiden Tumorentitäten nur die Aktivität eines einzelnen Provirus (Locus 3\_294) detektiert werden.

## 5 Diskussion

Nach der initialen Integration der humanen endogenen Retroviren in die Keimzellbahn führten vielfältigste Mutationen zum Verlust des Kodierungspotentials der ursprünglichen Gene. Die sogenannte HERV-K(HML-2)-Familie jedoch konserviert ihre „open reading frames“ vom Anbeginn ihrer Präsenz im Primatengenom seit ungefähr 35 Millionen Jahren. Das Mutationsereignis, welches zur Ausbildung von Typ 1- und Typ 2-Proviren führte, fand unmittelbar nach der evolutionären Trennung der Hominoiden von den Affen statt, wobei das Genom letzterer Spezies keine Typ 1- Proviren aufweist (Mayer et al., 1998).

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte bereits ein transformationsförderndes Potential für *rec*, eine Spleißvariante aus dem *env*-Leserahmen der angesprochenen HERV-K Typ 2- Proviren, nachgewiesen werden (Kapitel 1.8.2). Das Rec-Protein des humanen endogenen Retrovirus K, welches präferenziell in Keimzelltumoren exprimiert wird, assoziiert mit dem promyelozytischen Zink-Finger-Protein PLZF (Boese et al., 2000). Dieses wurde ursprünglich im Kontext mit der Genese von Leukämien identifiziert, dann aber auch anhand von Untersuchungen am Mausmodell mit Abnormalitäten im Prozess der Spermatogenese in Verbindung gebracht (Hawe et al., 1996; Barna et al., 2000). Insbesondere die Arbeiten von Galli et al. (2005) dokumentieren die propagierte Assoziation zwischen der Genese testikulärer Neoplasien und der Expression des *rec*-Gens.

Bei *np9* handelt es sich um eine weitere Spleißvariante aus dem *env*-Leserahmen, welcher ein transformationsförderndes Potential zugesprochen wird. *np9* stammt im Gegensatz zu *rec* von Proviren des Typs 1 ab. Die von Armbruster et al. (2002, 2004) begonnene Analyse des *np9*-Gens und des Np9-Proteins lässt über die Interaktion mit LNX und die daraus folgende Einbindung in den LNX/Numb/Notch-Signalweg auf eine Assoziation des Spleißproduktes insbesondere mit der Genese von testikulären Tumoren, aber auch von Mammakarzinomen und Leukämien schließen (Kapitel 1.7.3). Als weitere Interaktionspartner des Proteins konnten zwischenzeitlich der Rec-Interaktionspartner PLZF sowie die im Hefe-II-Hybrid-System identifizierte humane Serin-Protease HumHtrA2 identifiziert werden (persönliche Mitteilung Vivienne Armbruster, unveröffentlichte Daten; Brand, 2005), welche ebenfalls eng mit der Spermatogenese bzw. der Zellzykluskontrolle korrelieren (Kapitel 1.8.2, 1.8.3). Die Interaktion mit PLZF wird dabei über zwei verschiedene zentrale und C-terminale Domänen von Np9 und Rec und über die C-terminalen Zinkfinger von PLZF vermittelt. Ein Hauptangriffspunkt von PLZF ist das Proto-Onkogen *c-myc*. Bei Koexpression von

Np9 und Rec mit PLZF wird die durch PLZF-bedingte transkriptionelle Repression des *c-myc*-Promotors aufgehoben, woraus eine Überexpression von *c-myc* sowie eine alterierte Expression *c-myc*-regulierter Gene resultieren (Denne et al., 2007). Das onkogene Potential der beiden HERV-K(HML-2)-Proteine könnte somit in der Derepression von *c-myc* durch Hemmung von PLZF bestehen. Unter Berücksichtigung dieser Interaktionen drängt sich die Vermutung auf, dass Np9 auch sowohl mit der Entwicklung testikulären Gewebes als auch mit der Entstehung von Keimzelltumoren assoziiert sein könnte. Konträr zu dieser Annahme steht die These, dass eventuell ein gezielter positiver Selektionsdruck zur Erhaltung der *np9*-Sequenz geführt hat. Dieser ließe sich durch einen von Np9 vermittelten evolutionären Vorteil erklären. *np9* wird ausschließlich durch *rec*- und *env*-defiziente Proviren des Typs 1 exprimiert, welche erst – wie bereits angesprochen - durch ein Mutationsereignis entstanden sind. Somit könnte es sich bei *np9* auch um ein neues zelluläres Gen innerhalb eines veränderten viralen Elements und nicht um ein ursprüngliches virales Genprodukt handeln (Armbruster, V., 2004). Beweise für eine mögliche Funktion von Np9 in der gesunden Zelle konnten bislang jedoch noch nicht erbracht werden.

Da sich die Untersuchungen von Armbruster et al. (2002) bei der Entdeckung von *np9* auf mRNA-Ebene neben transformierten Zelllinien auf drei unterschiedliche Tumorgewebe (Mammakarzinome, Seminome, leukämisch aberrierte Lymphozyten) beschränkten, ist es zur weiteren Charakterisierung des Gens bezüglich seiner biologischen Funktion unerlässlich, seine Expression auch in anderen neoplastisch entarteten Geweben zu überprüfen. Von besonderem Interesse ist hierbei neben dem alleinigen *np9*-Nachweis im Tumorgewebe die Frage nach den transkriptionsaktiven Proviren bzw. deren chromosomalen Lokalisationen. Armbruster et al. (2002) identifizierten bisher drei *np9*-Transkripte, welchen Proviren auf zwei unterschiedlichen Loci zugeordnet werden konnten (Kapitel 1.8.3).

Bisher ist nicht bekannt, ob neben den bereits detektierten Proviren weitere HERV-K(HML-2)-Proviren bzw. -Loci existieren, welche ebenfalls die strukturellen Konditionen zur Produktion von Np9 erfüllen. Die Beantwortung dieser Frage soll zur weiteren Charakterisierung des *np9*-Gens beitragen.

## 5.1 Identifizierung Np9-kodierungskompetenter HERV-K(HML-2)-Loci und multiples Alignment der prädiktiven Aminosäuresequenzen

Barbulescu et al. (1999) und Sugimoto et al. (2001) charakterisierten bisher insgesamt sieben HERV-K-Sequenzen (HERV-K101, HERV-K102, HERV-K103, HERV-K107/HERV-K10, HERV-K105, HERV-K106 und HERV-K(II)), welche dem proviralen Typ 1 entsprechen und somit aufgrund der 292 bp-Deletion eine Grundvoraussetzung zur Np9-Produktion erfüllen. Die in dieser Arbeit in Kooperation mit Herrn PD Dr. rer. nat. Jens Mayer, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum des Saarlandes durchgeführte Analyse des menschlichen Genoms unter Anwendung des Human Genome Browsers zeigt, dass insgesamt siebzehn provirale HERV-K(HML-2)-Loci existieren, welche die Typ 1-spezifische Deletion von 292 bp am Übergang von *pol* zu *env* aufweisen (Kapitel 4.1). Aufgrund dieser Deletion sind diese Proviren nicht mehr dazu in der Lage, für Rec zu kodieren. Sie schafft jedoch die essentielle Vorraussetzung zur Produktion von Np9. Zwölf der detektierten Proviren verfügen über die zweite essentielle Kondition zur Np9-Produktion. Sie besitzen den zur Transkription erforderlichen intakten offenen Leserahmen und erfüllen somit die beiden unabdingbaren Grundvoraussetzungen zur *np9*-Expression. Zwei dieser Loci wiederum (1\_727 und 16\_160) können vermutlich aufgrund des Fehlens der 5`LTR-Sequenz sowie der SD1 keine RNA-Transkripte produzieren. Locus 16\_160 weist zusätzlich - ebenso wie die proviralen Sequenzen der Loci 1\_259, 1\_727 und 19\_238 - größere Deletionen in seiner Sequenz auf. In dieser Arbeit wurde die Expression von fünf bzw. sechs Proviren auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Kapitel 4.2, 4.3). Hierbei handelt es sich um die Proviren der chromosomalen Lokalisationen 1\_259, 1\_504, 3\_294, 5\_544, 21\_019 sowie 22\_012. Aufgrund der gleichen Anzahl an Nukleotiddifferenzen zwischen der cDNA der analysierten Klone und den proviralen Loci 1\_259 und 22\_012 konnte nicht exakt definiert werden, welcher dieser beiden Loci letztendlich transkriptionell aktiv war. Es wurde bisher noch keine Expression der Loci 3\_354, 3\_610 und 11\_456 nachgewiesen, obwohl diese alle strukturellen Voraussetzungen zur Produktion von Np9 mRNA erfüllen. Auch Armbruester et al. (2002), die unter anderem mit der Zelllinie Tera-1 arbeiteten, welche auf hohem Level HERV-K(HML-2)-Transkripte exprimiert, wiesen ausschließlich Np9 mRNA-Produktion durch die Proviren HERV-K101 (Chromosom 22q11) und HERV-KII (Chromosom 3q13) nach.

Die Analyse der proviralen Sequenzen der Proviren HERV-K101, HERV-K(II), HERV-K (Chr. 22q11), HERV-K102, HERV-K103 sowie HERV-K10 durch Armbruester et al. (2002) dokumentierte hierzu erstmals die neue Typ 1-spezifische Spleißdonorstelle.

Unterschiede innerhalb der Np9-kodierenden Sequenzen der einzelnen Loci führen in einigen Fällen auch zu Unterschieden auf Aminosäureebene. Die den *np9* „open reading frame“ besitzenden Proviren der Loci 1\_504, 16\_160 und 21\_019 weisen resultierend Alterationen in den nukleären Lokalisationssignalen auf (Tabelle 4), wodurch die Funktionsfähigkeit des putativen Np9-Proteins in Frage gestellt werden kann. Es wurde nicht überprüft, ob die alterierten Signale dazu in der Lage sind, Np9 in den Nukleus bzw. in subnukleäre Kompartimente zu dirigieren.

## 5.2 Analyse der RT-PCR-Produkte

Im praktischen Teil dieser Dissertation wurden unter anderem RT-PCR-Produkte verschiedener Tumorarten kloniert, woran sich Sequenzierungen unterschiedlicher Anzahlen zufällig ausgewählter Klone aus fünf Tumorarten anschlossen. Mittels BLAST- und BLAT-Recherchen wurden die Sequenzen zunächst auf ihre Homologie zu HERV-K Proviren im Allgemeinen und schließlich zu dem gesuchten Spleißprodukt *np9* untersucht. Da das zur Generierung der RT-PCR-Produkte verwendete Primerpaar GesENVFor und GesENVRev den gesamten *env*-Leserahmen umfasst, konnte bei den Sequenzierungen und den nachfolgenden Analysen neben *np9* auch das von Typ 2- Proviren stammende Spleißprodukt *rec* detektiert werden. Bestimmte Sequenzunterschiede innerhalb von mRNA-Sequenzen stellen eindeutige Zuordnungsmerkmale zu definierten proviralen Loci dar, während eine geringe Anzahl an Nukleotiddifferenzen an anderen Positionen durch fehlerhafte Amplifizierung bei der RT-PCR bzw. durch Fehler bei der Sequenzierung oder auch durch einzelne Nukleotidpolymorphismen erklärt werden können. Diese Umstände wurden bei der Analyse der aus den Klonen der RT-PCR-Produkte resultierenden Sequenzen genutzt, um Zuordnungen der Spleißprodukte zu definierten proviralen Loci treffen zu können. Anhand multipler Alignments wurden die *np9*- und die *rec*-Sequenzen detailliert auf ihre Zugehörigkeit zu den bekannten proviralen Loci und somit genomisch different lokalisierten Proviren analysiert.

Bisherigen Publikationen zufolge wird *np9* auf mRNA-Ebene durch zwei HERV-K(HML-2)-Proviren exprimiert. Armbruster et al. (2002) konnten bei der Entdeckung des *np9*-Gens die Proviren HERV-K101 (Chr. 22q11) (Barbulescu et al., 1999) und das auf Chromosom 3q13 lokalisierte Provirus HERV-KII (Sugimoto et al., 2001) als *np9*-exprimierend detektieren. Die spezifische Expression der beiden *np9*-Varianten in Tumorgewebe ließ vermuten, dass dem Np9-Protein im Prozess der Tumorgenese eine Funktion zugeschrieben werden kann. Da sich die Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt auf drei Tumorarten beschränkten, wurde das Untersuchungsgut in dieser

Arbeit auf weitere Tumorentitäten ausgedehnt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Expression von *np9* auf mRNA-Ebene nicht auf die bisher beschriebenen Tumorarten Seminom, Mammakarzinom und leukämische Blutzellen beschränkt. In der vorliegenden Untersuchung wurde *np9* auf mRNA-Ebene zuzüglich den Tumorentitäten Seminom und Mammakarzinom auch in einem Germinom, zwei Glioblastomen, einem anaplastischen Astrozytom, einem Nierenzellkarzinom sowie einem Melanom und somit schlußfolgernd in allen untersuchten Tumoren dieser Studie nachgewiesen. Der Nachweis von *np9* in dem untersuchten Melanom korreliert mit kürzlich publizierten Daten von Buescher et al. (2006), welche *np9* auf mRNA-Ebene ebenfalls in Melanomen nachweisen konnten. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *np9* nicht auf die beiden bisher in diesem Zusammenhang publizierten HERV-K(HML-2)-Proviren beschränkt ist. In dieser Arbeit wurden anhand von Sequenzanalysen und multiplen Alignments von *np9*-Transkripten fünf bzw. sechs aktive genomisch different lokalisierte Proviren identifiziert. Es handelt sich um die Proviren mit den chromosomalen Lokalisationen 1\_259 (1p31.1), 1\_504 (1q22), 3\_294 (3q12.3; entsprechend HERV-KII), 5\_544 (5q33.3), 21\_019 (21q21.1), 22\_012 (22q11.21), wobei - wie bereits in Kapitel 4.4 und 5.1 geschildert wurde - unklar ist, welcher der beiden Loci 1\_259 und 22\_012 in den vorliegenden Untersuchungen tatsächlich transkriptionell aktiv war. Dabei wurde in dieser Analyse das von Armbruester et al. (2002) ebenfalls genannte *np9*-exprimierende Provirus HERV-KII anhand von Datenbankanalysen (Kapitel 2.12) eindeutig auf Chromosom 3q12.3 lokalisiert, während die Darstellung von Armbruester et al. (2002) unter Berücksichtigung von Sugimoto et al. (2001) auf den Locus 3q13 Bezug nimmt. Insofern ergibt sich eine Diskrepanz zwischen dieser Arbeit und den bisherigen Studien bezüglich der exakten Lokalisation dieses Provirus.

Ferner konnte gezeigt werden, dass mehrere *np9*-exprimierende Typ 1-Proviren unterschiedlicher chromosomaler Lokalisation sowohl in einer Tumorentität als auch in einem Tumor *per se* aktiv sein können (Kapitel 4.2, 4.4). Dies war bisher nicht bekannt. Die Transkripte *rec* und *np9* wurden ebenfalls sowohl in jeder Tumorentität (mit Ausnahme des anaplastischen Astrozytoms, bei welchem im Probenumfang dieser Studie ausschließlich *np9*-Transkripte nachgewiesen wurden), als auch in vielen Einzeltumoren bzw. anhand deren RT-PCR-Produkten nachgewiesen. Dies bedeutet, dass Typ 1- und Typ 2-Proviren innerhalb eines Tumors gleichzeitig transkriptionell aktiv sein können. In den Tumorarten Seminom, Germinom, Mammakarzinom, anaplastisches Astrozytom und Melanom wurden jeweils Transkripte differenter aktiver proviraler Loci detektiert. Dies konnte anhand der cDNA-Sequenzanalysen der Klone

einzelner RT-PCR-Produkte auch innerhalb der einzelnen Tumoren bestätigt werden. Da diese Arbeit aufgrund der geringen Probenzahl und des variablen Stichprobenumfangs pro Tumorart nicht nach statistischen Gesichtspunkten ausgewertet wurde, können die Fragen, ob bestimmte provirale Loci ausschließlich in bestimmten und nicht auch in anderen Tumorarten exprimiert werden oder ob eine präferenzielle Expression bestimmter Loci in bestimmten Tumorentitäten erfolgt, nicht fundiert beantwortet werden. Es fällt jedoch auf, dass in beiden Hirntumorarten neben den *rec*-exprimierenden Typ 2-Proviren als *np9*-exprimierendes Provirus einzig HERV-KII (Locus 3\_294) erscheint. Auch in der Summe aller Tumorarten überwiegt Expression von *np9* durch dieses Provirus. *np9*-Transkription durch HERV-KII erfolgte in allen Tumorentitäten und 39 (bzw. 40) von insgesamt 55 analysierten *np9*-Sequenzen können mit diesem Locus assoziiert werden, was einem Prozentsatz von 70,91 bzw. 72,72% entspricht. Expressionsanalysen von Sugimoto et al. (2001) lieferten bereits erste Hinweise auf eine Verbindung von HERV-K-*env*-Transkripten zur Tumorgenese. In dieser Studie konnten *env*-Transkripte von HERV-K101 (Locus 22q11) spezifisch in der auch in dieser Arbeit verwendeten Keimzelltumorzelllinie Tera-1 (Kapitel 2.5.1) nachgewiesen werden. Dabei stammten 75% der sequenzierten *env*-Transkripte von Locus 22q11 ab, während nur 4% der Transkripte durch HERV-KII exprimiert wurden. Weiterhin wurden *env*-Transkripte des 22q11-Locus nur in den untersuchten transformierten Zellen detektiert, während HERV-KII-*env*-Transkripte auch in gesunden Geweben (Plazenta, Lunge, Testis, PBLs) gefunden wurden. Da in der genannten Arbeit nur mit transformierten Zellen einer Zelllinie gearbeitet wurde, gab die Studie keinen Aufschluß darüber, ob der 22q11-Locus spezifisch in Keimzelltumoren oder auch in anderen transformierten Zellen aktiv ist. In dieser Arbeit wird dem Provirus HERV-KII (Locus 3q12.3) zumindest im Hinblick auf die Transkription des speziellen *env*-Spleißproduktes *np9* eine größere Bedeutung beigemessen. Während das *np9*-Transkript ausgehend von Locus 22q11 (entsprechend Locus 22\_012) in keiner der untersuchten Proben sicher nachgewiesen werden konnte (Kapitel 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3), wurde das *np9*-Transkript von HERV-KII in jeder Tumorart und fast allen Proben nachgewiesen. Warum gerade dieser Locus in tumorösen Geweben scheinbar stark in das Transkriptionsgeschehen involviert ist, kann bisher nicht beantwortet werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Ebenso interessant wäre es, die den Tumorgeweben entsprechenden gesunden Gewebe auf *np9*-Transkription hin zu analysieren, besonders unter dem Gesichtspunkt, dass Sugimoto gerade HERV-KII-*env*-Transkripte auch zu erhöhten Prozentsätzen (Lunge 31%, PBLs 25%) in nicht entarteten Geweben nachweisen konnte. Dies könnte weitere

Hinweise auf die Regulation des Locus 3\_294 erbringen. Wären in den gesunden Geweben keine *np9*-Transkripte nachweisbar oder würde *np9* bloß auf niedrigem Level exprimiert (Kapitel 5.3), so könnte dies die propagierte Assoziation des Locus bzw. des Transkriptes mit dem Prozess der Tumorgenese erhärten.

### 5.3 Analyse der nativen Gewebeproben

Die Untersuchung des nativen Testisgewebes auf *np9*-Expression sollte dazu dienen, die bisher publizierten Ergebnisse der Arbeitsgruppe zu festigen und in dieser Arbeit nochmals darzustellen. Hierzu standen erstmals gesundes und neoplastisch entartetes Hodengewebe eines Patienten (Patient A) im direkten Vergleich zur Verfügung (Kapitel 4.3). Die Analyse dieser beiden Gewebeproben auf *np9*-Expression lief mit den bisherigen Untersuchungsergebnissen von Armbruster et al. (2002) konform. *np9*-mRNA konnte wohl im Seminomgewebe, nicht aber im gesunden Hodengewebe nachgewiesen werden. Die dritte Gewebeprobe stammte von einem zweiten Patienten (Patient B). Hierbei handelte es sich ebenfalls um nicht entartetes Hodengewebe. Die Aufarbeitung des Gewebes erfolgte - wie auch bei den beiden zuvor angesprochenen Gewebeproben - nach der in Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen Methodik, wodurch eine potentielle Kontamination weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. Zur Amplifikation von Transkripten aus dem *env*-Leserahmen wurden analog zu Armbruster et al. (2002) die in Kapitel 2.6 gelisteten Primer GesENVFor und GesENVRev verwendet. In der nach der RT-PCR zur Visualisierung des Resultates durchgeführten DNA Agarose-Gelelektrophorese erschienen Banden sowohl bei einer ungefähren Größe von 450 bp (*rec*) als auch 250 bp (*np9*). Dies würde zunächst dafür sprechen, dass *np9* und *rec* - im Widerspruch zu vorherigen Aussagen - auch in gesundem Gewebe exprimiert werden. In der Folge könnten bisher publizierte Thesen, in denen den Proteinen eine Rolle als Tumormarker bzw. in der aktiven Karzinogenese zugesprochen wird, in Frage gestellt werden.

Die Gewebeproben wurden bei der Aufarbeitung zunächst mittels Ultra Turrax T8, IKA Labortechnik homogenisiert. Das gesunde Hodengewebe von Patient B wurde zuletzt nach der Aufarbeitung des Seminomgewebes von Patient A bearbeitet. Somit könnte es bei der Homogenisierung des gesunden Hodengewebes von Patient B durch eine unzureichende Reinigung des Gerätes zu einer Kontamination gekommen sein. Dadurch wäre die gesunde Gewebeprobe durch Zellen mit nachweislich *np9*- sowie *rec*-exprimierenden HERV-K(HML-2)-Proviren belastet worden. Dieser Punkt stellt ein Defizit im Arbeitsablauf dar und ist nachträglich nicht mehr zu überprüfen. Gegen eine Kontamination während des weiteren Bearbeitungsvorgangs spricht, dass die Proben

während des Aufarbeitungsprozesses strikt voneinander getrennt wurden. Um potentielle Kreuzkontaminationen zu vermeiden, erfolgten RNA-Elution und alle darauf folgenden Arbeitsschritte bei jeder Biopsie zeitlich voneinander getrennt. Erst nach vollständiger Bearbeitung des Materials wurde mit der Aufarbeitung der nächsten Gewebeprobe begonnen. Somit wurden keine Proben zeitlich parallel untersucht. Die RT-Resultate wurden mittels GAPDH-Kontrollen und Wasserkontrollen zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse bzw. Kontaminationen während der Bearbeitung der Proben verifiziert.

Des Weiteren liegen über das gesunde Hodengewebe keine exakten anamnestischen Angaben vor. Es ist nicht bekannt, ob dieses Gewebe von einem Patienten ohne jegliche neoplastische Veränderungen der Testis stammt, oder ob es sich um einen Patienten handelt, bei dem ein Teil des Hodengewebes oder auch ein Hoden neoplastisch entartet war, vergleichbar mit Patient A. In diesem Fall könnten sich im Rahmen einer Metastasierung bereits Tumorzellen über das regionäre Lymphsystem ausgebreitet haben. Eine nachträgliche pathohistologische Untersuchung könnte Aufschluss erbringen, ob das zur Untersuchung stehende Gewebe bereits in den Vorgang der Karzinogenese involviert war.

Armbruster et al. (2002) führten ihre *np9*-Expressionsstudie sowohl an neoplastisch entarteten Zellen und Geweben als auch an normalen Zellen und Geweben durch. In der Studie wurde *np9* in keinem der gesunden Gewebe in detektierbaren Mengen exprimiert. Zu den analysierten nicht entarteten Geweben in dieser Untersuchungsreihe zählten Biopsien aus Darm, Magen und Plazenta sowie Lymphozyten und Fibroblasten. Gesundes Hodengewebe wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit untersucht. Insofern widerspricht die detektierte *np9*-Expression nicht den bis dato getätigten Aussagen. *np9* wurde bisher hauptsächlich mit der Genese von Keimzelltumoren assoziiert (Armbruster et al., 2002). Weitere Untersuchungen bezüglich der *Np9*-Kooperationspartner führten zu einer Bestätigung dieser Assoziation. Die Expression von *np9* wird hochspezifisch reguliert, wobei die Interaktionspartner des *Np9*-Proteins (Notch, PLZF) entweder Einfluss auf dessen Stabilität ausüben oder wichtige Funktionen im Prozess der Spermatogenese einnehmen bzw. an der Entstehung testikulärer Tumore beteiligt sind (Armbruster, 2004; Armbruster et al., 2004). Da die *Np9*-Expression bisher insbesondere mit differenziertem transformiertem Testisgewebe assoziiert wurde, erscheint die Beteiligung von *Np9* sowohl an der Spermatogenese als auch an der Manifestation von Keimzellneoplasien wahrscheinlich. Einer These zufolge ist nicht auszuschließen, dass *Np9* bereits während der Anlage der Keimzellen im frühen Embryonalstadium in

gesunden Urkeimzellen oder undifferenzierten Spermatogonien exprimiert wird und dort eine bisher nicht bekannte Funktion übernommen hat. Dies würde die Konservierung der *np9*-Sequenz und damit eventuell auch die Konservierung aller HERV-K Typ 1-Proviren im menschlichen Genom erklären. Die spezifische *np9*-Expression durch Typ 1-Proviren in Zusammenhang mit der konservierten *np9*-spezifischen Spleißdonorstelle könnte somit ein Hinweis dafür sein, dass *np9* neben der propagierten Beteiligung an der Karzinogenese auch einen für die Zelle positiven Effekt ausüben könnte. Dabei führt möglicherweise erst eine Deregulation von *Np9* in einem späteren Entwicklungsstadium in Kooperation mit einem anderen Differenzierungsstatus zu der beobachteten Korrelation zwischen *Np9*-Expression und einem pathogenen Phänotyp (Armbruster, 2004). Bisher existieren noch keine Untersuchungsergebnisse bezüglich einer potentiellen Funktion von *np9* in gesunden Zellen. Hierfür wäre es zunächst auch von Bedeutung, weitere *np9*-Expressionsstudien an einem größeren Panel gesunden Testisgewebes durchzuführen und die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zu bestätigen.

Zuletzt muss bedacht werden, dass die bisherigen Analysen auf *np9*-Expression an gesundem Gewebe im Jahr 2002 erfolgten (Armbruster et al., 2002). Im Rahmen der technischen Weiterentwicklung hat auch die Methode der RT-PCR weiter an Sensitivität hinzugewonnen, sodass auch sehr geringe Mengen an Transkripten detektiert und vervielfältigt werden können. Angenommen, *np9* oder auch *rec* würden in gesundem Testisgewebe auf einem niedrigen Level exprimiert, so könnten die verbesserten RT-PCR-Bedingungen nun deren Detektion ermöglichen. Dies würde wiederum die These erhärten, dass *np9* auf niedrigem Niveau konstitutiv exprimiert wird und einen positiven Effekt auf die Zelle ausüben oder auch Funktionen im Rahmen der Genregulierung einnehmen könnte. Eventuell verursacht erst die maligne Entartung der Zelle eine übermäßige und somit stets meßbare Expression der Spleißprodukte. Insofern wäre der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis von *np9* im gesunden Hodengewebe ein wichtiger Hinweis für die weitere Erforschung dieses Gens hinsichtlich seiner Regulierung und seiner Funktionen in der Zelle.

## 6 Zusammenfassung

Die Einflussnahme endogener retroviraler Elemente auf biologische Funktionsmechanismen des menschlichen Organismus scheint unumstritten. Während die Relevanz dieser Elemente für bestimmte zelluläre Regulationsmechanismen und auch für den Vorgang der Plazentation bereits detailliert nachgewiesen werden konnte, wird die propagierte Assoziation endogener Retroviren mit der Tumorgenese derzeit noch intensiv erforscht. Bei diesen Studien nehmen insbesondere die Mitglieder der Familie HERV-K(HML-2), welche prinzipiell dazu in der Lage wären, für intakte Partikel zu kodieren, eine Schlüsselposition ein. Während für das akzessorische Protein Rec, welches von einer doppelt gespleißten *env* mRNA von HERV-K(HML-2) Typ 2-Proviren translatiert wird, bereits ein transformationsförderndes Potential beschrieben wurde, wird derzeit intensiv die Beteiligung des Np9-Proteins, welches dem *env*-Leserahmen von HERV-K(HML-2)-Proviren des Typs 1 entspringt, an der Genese von Neoplasien untersucht. Np9 wurde im Vorfeld dieser Arbeit auf mRNA-Ebene in Seminomen, Mammakarzinomen und leukämischen Lymphozyten nachgewiesen, nicht jedoch in gesunden Zellen und Geweben (Fibroblasten, Lymphozyten, Magen, Darm, Plazenta). Die Interaktion des Proteins sowohl mit dem Numb/Notch-Signalweg als auch mit Promyelocytic Leukemia Zinc Finger-Protein (PLZF) festigt die propagierte Assoziation mit der Tumorgenese.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden unter Anwendung des Human Genome Browsers erstmals siebzehn HERV-K(HML-2)-Proviren des Typs 1 im menschlichen Genom lokalisiert, welche aufgrund der charakteristischen Deletion von 292 bp im Grenzbereich der Gene *pol* und *env* kompetente Proviren zum Spleißen von *np9* darstellen. Zwölf der detektierten Proviren verfügen über einen intakten offenen Leserahmen für Np9 und erfüllen somit die beiden unabdingbaren Grundvoraussetzungen zur Np9-Expression.

*np9*-Expression wurde schließlich in fünf weiteren Tumorentitäten zuzüglich der bereits genannten Tumorarten Seminom und Mammakarzinom nachgewiesen, wobei im Einzeltumor meist mehrere provirale Loci aktiviert waren. Dabei handelte es sich einerseits um parallele Aktivität genomisch different lokalisierter HERV-K(HML-2) Typ 1-Proviren, andererseits aber auch um gleichzeitige Expression von *env*-Transkripten sowohl durch Typ 1- als auch durch Typ 2-Proviren. Die analysierten Neoplasien umfassten zwei Hirntumorarten (Glioblastom, anaplastisches Astrozytom), zwei Tumorentitäten des Urogenitaltraktes (Germinom, Nierenzellkarzinom) sowie einen Hauttumor (Melanom). Die beiden bisher detektierten *np9*-exprimierenden Proviren

HERV-K101(22q11) und HERV-KII(3q13) konnten durch Sequenzanalysen um vier *np9*-exprimierende provirale Loci im menschlichen Genom erweitert werden. Somit wird *np9* insgesamt nachweislich von proviralen Elementen der Loci 1\_259 (1p31.1), 1\_504 (1q22), 3\_294 (3q12.3; entsprechend HERV-KII), 5\_544 (5q33.3), 21\_019 (21q21.1), 22\_012 (22q11.21) exprimiert. Dabei wurde eine hohe Transkriptionsaktivität von Locus 3\_294 beobachtet, insbesondere bezüglich der *np9*-Transkription in den Hirntumoren. Differierend zu bisher getroffenen Aussagen wurde das Transkript jedoch auch in gesundem Hodengewebe gefunden. Im Rahmen dieser Dissertation konnte letztlich erstmals die Expression unterschiedlicher *np9*-Transkripte sowohl in einer Tumorentität als auch in einem Einzeltumor aufgrund gleichzeitiger Transkriptionsaktivität unterschiedlicher HERV-K(HML-2)-Proviren nachgewiesen werden.

## 7 Summary

The influence of endogenous retroviral elements on the biological function of the human organism is without controversy. The relevance of those elements is shown in a large variety of cellular mechanisms as well as for the process of placentation. However, the proposed relation between endogenous retroviruses and the genesis of tumors is currently subject of intense research. Members of the family HERV-K(HML-2) are potentially capable for coding intact particles and are important for these studies. For the accessory protein Rec, which is translated from a doubly spliced *env* mRNA of HERV-K(HML-2) type 2 proviruses, a potential for neoplastic transformation has been described. The involvement of the Np9 protein in the genesis of neoplasias is still being investigated. Recently Np9 mRNA was detected in seminomas, mammary carcinomas and lymphocytes of leukemic patients but not in untransformed cells and tissues (fibroblasts, lymphocytes, stomach, gut, placenta). The interaction of this protein with both the numb/notch-pathway and the promyelocytic leukemia zinc finger-protein (PLZF) strengthens the assumption of the association with the genesis of tumors.

In this dissertation, seventeen HERV-K(HML-2) proviruses of type 1 have been localised within the human genome which are able to generate Np9 due to the characteristic deletion of 292 base pairs in the *pol/env* boundary. Twelve of the detected proviruses have an intact open reading frame which is the basic requirement for the expression of Np9. The analysis was done using the Human Genome Browser.

In addition to seminomas and mammary carcinomas, *np9*-expression was shown for five further tumors. In most cases, multiple locations of the provirus were found in a single tumor. On the one hand, an activity of different HERV-K(HML-2) type 1 proviruses was detected. On the other hand, *env*-transcripts were expressed both by type 1 and 2 proviruses. Following neoplasias were analysed: two brain tumors (glioblastoma, anaplastic astrocytoma), two urogenital tumors (germinoma, kidney cell carcinoma) and one dermal tumor (melanoma). Besides the two known *np9*-expressing proviruses HERV-K101(22q11) and HERV-KII(3q13) further four *np9*-expressing proviral locations within the human genome could be identified. Thus *np9* can be expressed by proviral elements on the following locations: 1\_259 (1p31.1), 1\_504 (1q22), 3\_294 (3q12.3; HERV-KII), 5\_544 (5q33.3), 21\_019 (21q21.1), 22\_012 (22q11.21). A high transcription activity of the location 3\_294 was found, especially for the *np9*-transcription of brain tumor. Differing from former statements the transcript could also be found in normal testicular tissue. In this dissertation the expression of different *np9*-transcripts in a tumor entity and in a single tumor was detected due to a

simultaneous transcription activity of different HERV-K(HML-2) proviruses for the first time.

## 8 Literaturverzeichnis

- Advisory Group on the Ethics of Xenotransplantation for the Department of Health (1997). Animal tissue into humans. Her Majesty's Stationery Office, Norwich, England
- Altschul, S.F, Madden, T.L., Schaeffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402
- Anderson, A., Svensson, A., Rolny, C., Andersson, G., Larsson, E. (1998). Expression of human endogenous retrovirus ERV3 (HERV-R) mRNA in normal and neoplastic tissues. *Int J Oncol*;12:309-13
- Andersson, M.L., Lindeskog, M., Medstrand, P., Westley, B., May, F., Blomberg, J. (1999). Diversity of human endogenous retrovirus class II-like sequences. *J Virol* 80(Pt1), 255-60
- Antony, J.M., van Marle, G., Opii, W., Butterfield, A., Mallet, F., Yong, V.W., Wallace, J.L., Deacon, R.M., Warren, K., Power, C. (2004). Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nature neuroscience* 10: 1088-1095
- Armbruester, V. (2004). Np9, Charakterisierung eines tumorspezifischen Proteins des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K(HML-2)) und Studien zu dessen Regulation in Kooperation mit der E3-Ubiquitin-Ligase LNX (Ligand of Numb protein X). *Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität des Saarlandes*
- Armbruester, V., Sauter, M., Krautkraemer, E., Meese, E., Kleinmann, A., Roemer, K., Best, B., Mueller-Lantsch, N. (2002). A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res* (6), 1800-7
- Armbruester, V., Sauter, M., Roemer, K., Best, B., Hahn, S., Nty, A., Schmied, A., Philipp, S., Mueller, A., Mueller-Lantsch, N. (2004). Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with LNX (ligand of Numb protein X). *J Virol*, p.10310-10319
- Badenhoop, K., Donner, H., Neumann, J., Herwig, J., Kurth, R., Usadel, K.H., Toenjes, R. (2005). IDDM Patients Neither Show Humoral Reactivities Against Retroviral Envelope Protein Nor Do They Differ in Retroviral mRNA Expression From Healthy Relatives or Normal Individuals. *Diabetes*, 48, 215-218

- Barbulescu, M., Turner, G., Seaman, M. I., Deinard, A.S., Kenneth, K.K., Lenz J. (1999). Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr. Biol.*, 9: 861-868
- Barna, M., Hawe, N., Niswander, L., Pandolfi, P.P. (2000). PLZF regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat Genet* 25, 166-172
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouziox, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871
- Bera, T.K., Tsukamoto, T., Panda, D.K., Huang, T., Guzman, R.C., Hwang, S.I., Nandi, S. (1998). Defective retrovirus insertion activates c-Ha-ras proto-oncogene in an MNU-induced rat mammary carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*; 248:835-40
- Best, S., Le Tissier, P., Towers, G., Stoye, J.P. (1996). Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature* 382:826-829
- Bieche, I., Laurent, A., Duret, L., Giovangrandi, Y., Frendo, J.L., Olivi, M., Fausser, J.L., Evain-Brion, D., Vidaud, M. (2003). Placenta-specific INSL4 expression is mediated by a human endogenous retrovirus element. *Biol Reprod* 68:1422-1429
- Birnboim, H.C., Doily, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7(6): 1513-1523
- Blanco, P., Shlumukova, M., Sargent, C.A., Jobling, M.A., Affara, N., Hurles, M.E. (2000). Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. *J Med Genet* 37:752-758
- Blond J.L., Beseme, F., Duret L., Bouton O., Bedin F., Perron H., Mandrand B., Mallet F. (1999). Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol*, 73:1175-1185
- Blond J.L., Lavillete D., Cheynet V., Bouton O., Oriol G., Chapel-Fernandes S., Mandrand B., Mallet F., Cosset F.L. (2000). An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol*, 74:3321-3329

- Boese, A., Galli, U., Geyer, M., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N. (2001). The Rev/Rex homolog HERV-K cORF multimerizes via C-terminal domain. *FEBS Letter* 493(2-3):117-21
- Boese, A., Sauter, M., Galli, U., Best, B., Herbst, H., Mayer, J., Kremmer, E., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N. (2000). Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Oncogene* 19 (38), 4328-36
- Boese, A., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N. (2000). A rev-like NES mediates cytoplasmatic localization of HERV-K cORF. *FEBS Letter* 468 (1):65-67
- Boller, K., Janssen, O., Schuldes, H., Toenjes, R.R., Kurth, R. (1997). Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J Virol* 71:4581-4588
- Boller, K., Koenig, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Loewer, R., Loewer, J., Kurth, R. (1993). Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology*; 196:349-53
- Boneva, R.S., Folks, T.M., Chapman, L.E. (2001). Infectious Disease Issues in Xenotransplantation. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 1-14
- Brand, I. (2005). Charakterisierung der Interaktion zwischen dem tumorassoziierten Protein Np9 des humanen endogenen Retrovirus HERV-K(HML-2) und der humanen Serin-Protease (HumHtrA2). *Veterinärmedizinische Dissertation*, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Buaas, F.W., Kirsh, A.L., Sharma, M., McLean, D.J., Morris, J.C., Griswold, M.D., de Rooij, D.G., Braun, R.E. (2004). PLZF is required in adult male germ cells for stem cell self renewal. *Nat Genet* 36(6), 647-52
- Buescher, K., Hahn, S., Hofmann, M., Trefzer, U., Ozel, M., Sterry, W., Loewer, J., Loewer, R., Kurth, R., Denner, J. (2006). Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. *Melanoma Res* 16(3):223-34
- Buescher, K., Trefzer, U., Hofmann, M., Sterry, W., Kurth, R., Denner, J. (2005). Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res* 65:(10):4172-4180
- Callahan, R., Raafat, A. (2001). Notch signaling in mammary gland tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6:23-36
-

- Chen, N.L., Bai, L., Deng, T., Zhang, C., Kong, Q.Y., Chen, H. (2004). Expression of hepatitis B virus antigen and helicobacter pylori infection in gastric mucosa of patients with chronic liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 3(2):223-5
- Coffin J. (1985). Endogenous retroviruses. In: Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., et al., eds. *Molecular biology of tumor viruses*, 2nd ed. Cold Spring Harbour, USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 357-404
- Collingwood, T.N., Urnov, F.D., Wolffe, A.P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodelling in the control of transcription. *J. Mol. Endocrin.* 23, 255-275
- Conrad, B., Weissmahr, R.N., Boni, J., Arcari, R., Schupbach, J., Match, B. (1997). A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* (2):303-13
- Costas, J. (2001). Evolutionary dynamics of the human endogenous retrovirus family HERV-K inferred from full-length proviral genomes. *J Mol Evol* 53(3), 237-43
- Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., Pandolci, P.P. (2004). Essential role of PLZF in maintainance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 36(6), 653-9
- Cox, A., Zhong, R. (2005). Current advances in xenotransplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 4(4):490-4
- de Martini, J.C., Carlson J.O., Leroux C., Spencer T., Palmarini M. (2003). Endogenous retroviruses related to jaagsiekte sheep retrovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 275: 117-137
- Denne, M., Sauter, M., Armbruester, V., Licht, J.D., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N. (2007). Physical and funktional intertraction of Human Endogenous Retrovirus Proteins Np9 and Rec with the Promyelozytic Leukemia Zinc Finger Protein. *J Virol*, zur Publikation angenommen
- Dho, S.E., Jacob, S., Wolting, C.D., French, M.B., Rohrschneider, L.R., Mc Glade, C.J. (1998). The mammalian numb phosphotyrosine-binding domain. Characterization of binding specificity and identification of a novel PDZ-domain containing numb binding protein, LNX. *J Biol Chem* 273(15), 9179-87
- Dugaiczyk, A., Boyer, H.W., Goodman, H.M. (1975). Ligation of Eco RI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* 25; 96(1):171-84

- Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (eds.) (2005). Textbook of Veterinary Internal Medicine, Volume 1, Sixth Edition; Elsevier Saunders
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (eds.) (2005). Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on the Taxonomie of Viruses; Elsevier, Academic Press
- Fogh, J., Trempe, G. (1975). New human tumor cell lines. In: Human Tumor Cells in Vitro. (J. Fogh, Ed.) p.115-119. Plenum Press, New York
- Frank, O., Giehl, M., Zheng, C., Hehlmann, R., Leib-Moesch, C., Seifarth, W. (2005). Human Endogenous Retrovirus Expression Profiles in Samples from Brains of Patients with Schizophrenia and Bipolar Disorders. *J Virol*, p. 10890-10901
- Frendo, J.L., Olivier, D., Cheynet, V., Blond, J.L., Bouton, O., Vidaud, M., Rabreau, M., Evain-Brion, D., Mallet, F. (2003). Direct involvement of HERV-W Env glykoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 23:3566-3574
- Galli, U., Sauter, M., Lecher, B., Maurer, S., Herbst, H., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N. (2005). Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. *Oncogene* 24(19):3223-8
- Garfinkel, D.J. (1992). Retroelements in microorganisms. p. 107-158. In J.A. Levy (ed.), *The Retroviridae*, vol. 1. Plenum Press, New York.
- Goeddert, J.J., Sauter, M.E., Jacobson, L.P., Vessella, R.L., Hilgartner, M.W., Leitmann, S.F., Fraser, M.C., Mueller-Lantzsch, N.G. (1999). High pevalence of antibodies against HERV-K10 in patients with testicular cancer but not with AIDS. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:293-296
- Goff, S.P. (1996). Operating under a Gag order: a block against incoming virus by the Fv1 gene. *Cell* 86, 691-693.
- Hammerschmidt, W., Sugden, B. (2004). Epstein-Barr virus sustains lymphomas and Hodgkin`s disease. *Trends Mol Med*, 10(7):331-6
- Haraguchi, S., Good, R.A., James-Yarish, M., Cianciolo, G.J., Day, N.K. (1995). Differential modulation of Th-1- and Th-2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3611-3615

- Hawe, N., Soares, V., Niswander, L., Cattoretti, G., Pandolfi, P.P. (1996). Targeted disruption of the PLZF gene of acute promyelocytic leucemia results in phocomelia and altered spermatogenesis. *Blood* 88, 291a
- Hayashi, Y., Kageyama, K., Ishizaka, G., Xia, K., Kihara, Oshima, O. (2001). Requirement of Notch 1 and its ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. *J Androl.* 22:999-1011
- Heimdahl, K., Olson, H., Tretli, S., Fossa, S.D., Borresen, A.L., Bishop, D.T. (1997). A segregation of testicular cancer based on Norwegian and Swedish families. *Br. J. Cancer*, 75: 1084-1087
- Herbst, H., Kuehler-Obbarius, C., Lauke, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Harms, D., Loning, T. (1999). Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in gonadoblastomas and gonadoblastoma-derived germ cell tumours. *Virchows Arch* 434:11-15
- Herbst, H., Sauter, M., Kuehler-Obbarius, C., Loning, T., Mueller-Lantzsch, N. (1998). Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in germ cell and trophoblastic tumours. *APMIS* 106(1):216-20
- Herbst, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N. (1996). Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumours. *Am J Path* 149(5), 1727-35.
- Huang, L. H., Silberman, J., Rothschild, H., Cohen, J.C. (1989). Replication of baboon endogenous retrovirus in human cells. Kinetics of DNA synthesis and integration. *J. Biol. Chem.* 264:8811-8814
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*; 409:860-921
- Jurka, J. (2000). Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends Genet* 16(9), 418-420
- Kamp, C., Hirschmann, P., Voss, H., Huellen, K., Vogt, P.H. (2000). Two homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet* 9:2563-2572
- Kessler, M. (Hrsg.). Kleintieronkologie; Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze. Parey Buchverlag im Blackwell-Wissenschaftsverlag GmbH, 1. Auflage (1999).

- Kim, T.H., Jeon, Y.T., Yi, J.M., Kim, D.S., Huh, J.W., Hur, C.G., Kim, H.S. (2004). The distribution and expression of HERV families in the human genome. *Mol Cells* 318(1):87-93.
- Kirwan, J.M., Herold, J.J.O. (2002). Premalignant vulval disorders. *Current Obstetrics and Gynaecology* 12(2),90-92
- Kitamura, M., Maruyama, N., Shirasawa, T., Nagasawa, R., Watanabe, K., Tateno, M., Yoshiki, T. (1994). Expression of an endogenous retroviral gene product in human placenta. *Int J Cancer* 58:836-840
- Kleiman, A., Senyuta, N., Tryakin, A., Sauter, M., Karseladze, A., Tjulandin, S., Gurtsevich, V., Mueller-Lantsch, N. (2004). HERV-K(HML-2) Gag/Env antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumors. *Int. J. Cancer*: 110, 459-461
- Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (2007). *Fields Virology*, 5th ed., Lippincott Williams and Wilkins
- Kraeusslich, H.G., Welker, R. (1996). Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr. Top. Mikrobiol. Immunol.* 214, 25-63
- Kushner (1997). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with colid-derived plasmids. *Genet Eng.* ( N.S. Boyer B, Ed); Elsevier, Amsterdam
- Landry, J.R., Rouhi, A., Medstrand, P., Mager, D.L. (2002). The Opitz syndrome gene *Mid 1* is transcribed from a human endogenous retroviral promotor. *Mol Biol Evol* 19:1934-1942
- Larsson, E., Andersson, A.C., Nilsson, B.O. (1994). Expression of an endogenous retrovirus (ERV3 HERV-R) in human reproductive and embryonic tissues – evidence for a function for envelope gene products. *Ups J Med Sci* 99:113-120
- Lederberg, E.M., Cohen, S.N. (1974). Transformation of *Salmonella Typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 119(3), 1072-1074
- Leib-Moesch, C., Brack-Werner, R., Werner, T., Bachmann, M., Fatt, O., Erfle, V., Hehlmann, R. (1990). Endogenous retroviral elements in human DNA. *Cancer Res*; 50(suppl):5636-42
- Leroux, C., Girard, N., Cottin, V., Greenland, T., Mornex, J.-F., Archer, F. (2007). Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. *Vet Res* 38, 211-228

- Lipinsky, B., Fayet, O., Baird, L., Georgopoulos, C. (1989). Identification, characterization, and mapping of the E.coli HtrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol* 171:1574-1584
- Loewer, R., Boller, K., Hasenmayer, B., Korbmacher, C., Mueller-Lantzsch, N., Loewer, J., Kurth, R. (1993). Identification of human endogenous retrovirus with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (10), 4480-4
- Loewer, R., Loewer, J., Frank, H., Harzmann, R., Kurth, R. (1984). Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J Gen Virol* 65(Pt5). 887-98
- Loewer, R., Loewer, J., Kurth, R. (1996). The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:5177-84
- Loewer, R., Toenjes, R.R., Boller, K., Denner, J., Kaiser, B., Phelps, R.C., Loewer, J., Kurth, R., Badenhop, K., Donner, H., Usadel, K.H., Miethke, T., Lapatschek, M., Wagner, H. (1998). Development of insulin-dependent diabetes mellitus does not depend on specific expression of the human endogenous retrovirus HERV-K. *Cell*; 95:11-13
- Loewer, R., Toenjes, R., Korbmacher, C. Kurth, R., Loewer, J. (1995). Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J Virol* 69(1), 141-9
- Magin, C., Loewer, R., Loewer, J. (1999). cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the Human Endogenous Retrovirus Family HTDV/HERV-K. *Journal of Virology*, p.9496-9507, Vol. 73, No. 11
- Mangeny, M., de Parseval, N., Thomas, G., Heidmann, T. (2001). The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol* 82:2515-2518
- Maniatis, T.S.J., Fritsch, E.F. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2 ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Martin, M.A., Bryan, T., Rasheed, S., Khan, A.S. (1981). Identification and cloning of endogenous retroviral sequences present in human DNA. *Proc Nat Acad Sci USA*; 78:4892-6

- Martin, U., Kiessig, V., Busch, J., Haverich, A., von der Helm, Herden, T., Steinhoff, G. (1998). Expression of pig endogenous retrovirus by primary endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* 359:692-694
- Mayer, J., Ehlhardt, S., Seifert, M., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Mehraein, Y., Zang, K.-D., Meese, E. (2004). Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec coding capacity and transcriptional activity. *Virology* 322, 190-198
- Mayer, J., Meese, E., Mueller-Lantzsch, N. (1998). Human endogenous retrovirus K homologous sequences and their coding capacity in Old World Primates. *J Virol* 72(3), 1870-5
- Mayer, J., Sauter, M., Racz, A., Scherer, D., Mueller-Lantzsch, N., Meese, E. (1999). An almost intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nat Genet* 21(3), 257-8.
- McAllister, R.M., Nicolson, M.O., Herberling, R., Charman, H., Rice, N., Gilden, R.V. (1978). Infectivity of endogenous baboon type-c virus-related genes. p. 153-138. In P. Bentvelzen, J. Hilgers, and D. S. Yohn (ed.), *Advances in comparative leukemia research 1977. Proceedings of the VII-th International Symposium on Comparative Research on Leukemia and Related Diseases*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands
- Medstrand, P., Landry, J.R., Mager, D.L. (2001). Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelial B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. *J Biol Chem* 276:1896-1903
- Mi, S., Lee, X., Veldmann, G.M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J.C., McCoy, J.M. (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403:785-789
- Modrow, S., Falke, D., Truyen (2003). *Molekulare Virologie, Spektrum Lehrbuch, 2. Auflage*
- Molès, J.P., Tesniere, A., Gaillon, J.J. (2005). A new endogenous retroviral sequence is expressed in skin of patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* 153(1):83-9
- Mostofi, F.K., Sobin, L.H. (1977). Histological typing of testis tumours, *International Classification of tumours, No. 16 WHO, Genf*
- Mostofi, F.K., Davies, C.J., Sobin, L.H. (1998). Histological typing of kidney tumours, *International Classification of tumours, WHO, Geneva*
-

- Mueller-Lantzsch, N., Sauter, M., Weiskircher, A., Kramer, K., Best, B., Buck, M., Graesser, F. (1993). Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-k Da protein and a functional protease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9(4), 343-50.
- Nelson, P.N. (1995). Retroviruses in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*; 55:441-2
- Nelson, P.N., Carnegie, P. R., Martin, J., Davari Ejtehad, H., Hooley, P., Roden, D., Rowland-Jones, S., Warren, P. Astley, J., Murray, P. G. (2003). Demystified... Human endogenous retroviruses. *J Clin Pathol: Mol Pathol*: 56:11-18
- Nelson, P.N., Lever, A.M., Smith. S., Pitman, R., Murray, P., Perera, S.A., Westwood, O.M., Hay, F.C., Ejtehad, H.D., Booth, J.C. (1999). Molecular investigations implicate human endogenous retroviruses as mediators of anti-retroviral antibodies in autoimmune rheumatic disease. *Immunol Invest* 28(4):277-89
- Nie, J., McGill, M.A., Dermer, M., Dho, S.E., Wolting, C.D., McGlade, C.J. (2002). LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependant degradation. *EMBO J.* 21:93-102
- Nihrane, A., Fujita, K., Willey, R., Lyu, M.S., Silver, J. (1996). Murine leukemia virus envelope protein in transgenic-mouse serum blocks infection in vitro. *J Virol* 70:1882-1889
- Ono, M., Kawakami, M., Ushikubo, H. (1987). Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol* 61:2059-2062.
- Ono, M., Yasunaga, T., Miyata, T., Ushikubo, H. (1986). Nukleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* 60(2), 589-98
- Pantel, J., Machinis, K., Sobrier, M.L., Duquesnoy, P., Goossens, M., Amselem, S. (2000). Species-specific alternative splice-mimikry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. *J Biol Chem* 275:18664-18669
- Patience, C., Patton, G.S., Takeuchi, Y., Weiss, R.A., McClure, M.O., Rydberg, L., Breimer, M.E. (1998). No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 352:699-701
- Patience, C., Takeuchi, Y., Weiss, R.A. (1997). Infection of human cells by endogenous retroviruses of pigs. *Nat. Med.* 3:282-286

- Perl, A., Rosenblatt, J.D., Chen, I.S., DiVincenzo, J.P., Bever, R., Poiesz, B.J., Abraham, G.N. (1989). Detection and cloning of new HTLV-related endogenous sequences in man. *Nucleic Acids Res* 17: 6841-6854
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Sci USA*, 77(12): 7415-7419
- Prudhomme, S., Bonnaud, B., Mallet, F. (2005). Endogenous retroviruses and animal reproduction. *Cytogenet. Genome Res.* 110:353-364
- Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 258., neu bearbeitete Auflage, (1998) Berlin, de Gruyter
- Reus, K., Mayer, J., Sauter, M., Scherer, D., Mueller-Lantsch, N., Meese, E. (2001). Genomic organization of the human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) (ERV6) on chromosome 7. *Genomics* 15;72(3):314-20
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Ehrlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839), 487-491
- Sauter, M., Roemer, K., Best, B., Afting, M., Schommer, S., Seitz, G., Hartmann, M., Mueller-Lantsch, N. (1996). Specificity of antibodies directed against Env-protein of human endogenous retroviruses in patients with germ cell tumors. *Cancer Res* 56(19), 4362-5
- Sauter, M., Schommer, S., Kremmer, E., Remberger, K., Doelken, G., Lemm, I., Buck, M., Best, B., Neumann-Haefelin, D., Mueller-Lantsch, N. (1995). Human endogenous retrovirus K10: expression of gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J Virol*; 69:414-21
- Schulte, A.M., Lai, S., Kurtz, A., Czubyko, F., Riegel, A.T., Wellstein, A. (1996). Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:14759-64
- Sgaramella, V., Van de Sande, J.H., Khorana, H.G. (1970). Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 67(3):1468-75

- Sieburg, M., Tripp, A., Ma, J.W., Feuer, G. (2004). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax oncoproteins modulate cell cycle progression and apoptosis. *J. Virol.* 78(19):10399-409.
- Spencer, T.E., Mura, M., Gray, C.A., Griebel, P.J., Palmarini, M. (2003). Receptor usage and fetal expression of ovine endogenous betaretroviruses: implications for coevolution of endogenous and exogenous retroviruses. *J Virol* 77:749-753
- Sugimoto, J., Matsuura, N., Kinjo, Y., Takasu, N., Oda, T., Jinno, Y. (2001). Transcriptionally active HERV-K genes: Identification, isolation, and chromosomal mapping. *Genomics* 72(2), 137-44
- Sun, C., Skaletsky, H., Rozen, S., Gromoll, J., Nieschlag, E., Oates, R., Page, D.C. (2000). Deletion of azoospermie factor a (AZFa) of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Hum Mol Genet* 9:2291-2296
- Takeuchi, Y., Patience, C., Magre, S., Weiss, R.A., Benarjee, P.T., Le Tissier, P., Stoye, J.P. (1998). Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol* 72:9986-9991
- Talal, N., Flescher, E., Dang, H. (1992). Evidence for possible retroviral involvement in autoimmune diseases. *Ann Allergy* 69(3):221-224
- Temin H.M. (1974). On the origin of RNA tumor viruses. *Harvey Lect*; 69:173-197
- Ting, C.N., Rosenberg, M.P., Snow, C.M., Samuelson, L.C., Meisler, M.H. (1992). Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev* 6:1457-1465
- Toenjes, R.R., Limbach, C., Loewer, R., Kurth, R. (1997). Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glykoprotein in insect and mammalian cells. *J Virol* 71(4), 2747-56
- Toenjes, R.R., Loewer, R., Boller, K., Denner, J., Hasenmaier, B., Kirsch, H., Koenig, H., Korbmayer, C., Limbach, C., Lugert, R., Phelps, R.C., Scherer, J., Thelen, K., Loewer, J., Kurth, R. (1996). HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 14 Suppl 1, S. 261-7
- Tristem, M. (2000). Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping database. *J Virol*; 74:3715-30

- Turner, G., Barbulescu, M., Su, M., Jensen-Seaman, M.I., Kidd, K.K., Lenz, J. (2001). Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* 11(19), 1531-5
- Urnovitz, H., Murphy, W. (1996). Human endogenous retroviruses: Nature, occurrence and clinical implications in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 72-99
- van der Laan, L.J.W., Lockey, C., Griffeth, B.C., Frasier, F.S., Wilson, C.A., Onions, D.E., Hering, B.J., Long, Z., Otto, E., Torbett, B.E., Salomon, D.R. (2000). Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Letter, Nature* 407: 90-94
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L. (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277(1), 445-54
- Vogt, P., Friis, R.R. (1971). An avian leukosis virus related to RSV(O): properties and evidence for helper activity. *Virology* 43(1), 223-34
- Voisset, C., Bouton, O., Bedin, F., Duret, L., Mandrand, B., Mallet, F., Paranhos-Baccala, G. (2000). Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:731-740
- Wang-Johanning, F., Frost, A.R., Jian, B., Azerou, R., Lu, D.W., Chen, D.T., Johanning, G.L. (2003). Detecting the expression of human endogenous retrovirus E envelope transcripts in human prostate adenocarcinoma. *Cancer* 98:187-197
- Wang-Johanning, F., Frost, A.R., Jian, B., Epp, L., Lu, D.W., Johanning, G.L. (2003). Quantitation of HERV-K env Gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene* 22:1528-1535
- Waterson, A.P., Wilkinson, L. (1978). *History of Virology*. Cambridge (Cambridge University Press)
- Weijzen, S., Rizzo, P., Braid, M., Vaishnav, R., Jonkheer, S.M., Zlobin, A., Osborne, B.A., Gottipatti, S., Aster, J.C., Hahn, W.C., Rudolf, M., Siziopikou, K., Kast, M., Miele, L. (2002). Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med* 8:979-986
- WHO (1981). *Histological typing of breast tumors. International Histological Classification of Tumors*. World Health Organization, Geneva
- 
-

Wiesner, E., Ribbeck, R. (2000). Lexikon der Veterinärmedizin, 4. Auflage, Enke

Wilkinson, D.A., Mager, D.L., Leong, J.A.C. Endogenous human retroviruses. In: Levy, J. A., ed. The retroviridae, Vol. 3. New York: Plenum Press, 1994:465-535

Wilson, C.A., Wong, S., Muller, J., Davidson, C.E., Rose, T.E., Burd, P. (1998). Type C retrovirus released from primary peripher blood mononuclear cells infects human cells. J Virol 72: 3082-3087

Zuelch, K.J. (1979). Histological typing of tumours of the central nervous system. International classification of tumours No. 21 (1<sup>st</sup> ed). WHO, Genf

## 9 Anhang

### Anhang A: Multiples Alignment der Provirus Typ 1-Sequenzen und *np9* cDNAs

1_259	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
1_504	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
1_555	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
1_727	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2_340	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
3_014	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
3_294	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
3_354	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
3_610	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
4_742	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
5_259	GGGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
5_544	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
11_456	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
16_160	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
19_238	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
21_019	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
22_012	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
16637_01_11	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
16637_01_2	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
16637_01_7	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2164_00S_10	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2164_00S_17	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2164_00S_18	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2164_00S_2	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2503_00S_1	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2503_00S_2	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2503_00S_3	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2503_00S_7	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2789_00res_4	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
406_00IIS_15	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
406_00IIS_19	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
406_00SII_8	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
412_01S_5	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
412_01S_4	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
HT20	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
HT_17	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB26_12	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB26_13	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB26_14	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB26_15	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB26_16	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB26_18	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB26_21	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB26_24	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB34_12	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB34_3	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB34_4	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB34_6	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB34_8	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB59_10	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB59_12	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB59_2	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB59_6	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB71_1	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB71_10	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB71_11	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB71_12	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB71_2	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB71_3	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB71_4	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
TB71_6	ATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
12348-A/2C5	-----TCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
12348-A/2D5	-----AGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
118-1/2C1	-----AGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
118-1/1B1	-----AGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
118-1/A1	-----AGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
118-1/2D1	-----AGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2371-A/1	-----AGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2371-A/2	-----AGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
1496-A/1	-----AGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2-A/1	-----AGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
2-A/2	-----AGAAAAGGGCCTCCACGAGATG	-----
	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....	





1_259	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
1_504	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
1_555	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAAT	-----
1_727	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAAT	-----
2_340	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
3_014	ACTCCATTTCTCTGTAAGAAAAAT	-----
3_294	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAAT	-----
3_354	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
3_610	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
4_742	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAAT	-----
5_259	ACTCCATTTTCTGTAAGAAAAAT	-----
5_544	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
11_456	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAAT	-----
16_160	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
19_238	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAAT	-----
21_019	ACTCCATTTCTTATGTAAGAAAAAT	-----
22_012	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
16637_01_11	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
16637_01_2	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
16637_01_7	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
2164_00S_10	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
2164_00S_17	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
2164_00S_18	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
2164_00S_2	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
2503_00S_1	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
2503_00S_2	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
2503_00S_3	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
2503_00S_7	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
2789_00reS_4	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
406_00IIS_15	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
406_00IIS_19	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
406_00SII_8	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
412_01S_5	ACTCCATTTCTTATGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
412_01S_4	ACTCCATTTCTTATGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
HT20	ACTCCATTTCTTATGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
HT_17	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB26_12	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB26_13	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB26_14	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB26_15	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB26_16	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB26_18	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB26_21	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB26_24	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB34_12	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB34_3	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB34_4	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB34_6	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB34_8	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB59_10	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB59_12	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB59_2	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB59_6	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB71_1	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB71_10	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB71_11	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB71_12	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB71_2	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB71_3	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB71_4	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
TB71_6	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGT	-----
12348-A/2C5	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAAT	-----
12348-A/2D5	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAAT	-----
118-1/2C1	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
118-1/1B1	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
118-1/A1	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
118-1/2D1	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
2371-A/1	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
2371-A/2	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
1496-A/1	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAAT	-----
2-A/1	ACTCCATTTGTTATGTAAGAAAAAT	-----
2-A/2	ACTCCATTTGTTCTGTAAGAAAAAT	-----
	241.....250.....260.....270.....280.....290	

Abbildung 14: Multiples Alignment der Provirus Typ 1-Sequenzen und np9 cDNAs.

Dargestellt werden die diagnostischen Nukleotiddifferenzen innerhalb der Np9-kodierenden Sequenzen. Die hier abgebildete Region wird von den bei der RT-PCR verwendeten Primern umfasst (Kapitel 2.6). Die Abbildung zeigt alle identifizierten diagnostisch relevanten Positionen für die untersuchte Np9-Region. nt 1 ist definiert als Np9 Startcodon. Die Sequenz des Proteins ist blau hinterlegt. Die durch weiße Kästchen gekennzeichneten Sequenzdifferenzen sind essentiell für die Zuordnung der Np9 mRNA-Sequenzen zu den einzelnen proviralen Loci. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung).

Anhang B: Multiples Alignment der Provirus Typ 2-Sequenzen und rec cDNAs

3_385	ATGAAC	T	CATCA	GAGATGCAA	AAAAAGCA	ATCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA
4_052	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	GGAAAG	GCGCCTCCG	AGAGACA	GAGAAC	CCGCAATCGAA	CAATCAA	CGACTC	GCAGCG		
4_068	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	GGAAAG	GCGCCTCCG	AGAGACA	GAGAAC	CCGCAATCGAA	CAATCAA	CGACTC	GCAGCG		
5_147	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
5_535	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
6_098	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
6_178	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
6_324	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
HML2 Tandem	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
8_047	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
8_094	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
10_019	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
11_424	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
12_216	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
19_157	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
19_352	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
19_407	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
19_671	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
Y_026	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
TB59_5	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
2164_00S_12	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
2164_00S_1	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
2164_00S_19	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
2164_00S_4	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
HT_14	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
2503_00S_11	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
TB34_11	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
TB34_1	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
12348-B/1F	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
12348-B/1E	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
1496-B/1C3	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
1496-B/1D3	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
1496-B/2E3	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
1496-B/2F3	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
2-C/1	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
2-C/2	ATGAACCCAT	CAGAGATGCAA	AAAAAGCA	CCTCCG	GGAGACGGAGAC	CCCA	CAATCGAG	CACCGT	TCAGT	CACAAGA		
				1	10	20	30	40	50	60	70	

3_385	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	ACCGACTTGGG	CACAAC						
4_052	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
4_068	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
5_147	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
5_535	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
6_098	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
6_178	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
6_324	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
HML2 Tandem	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
8_047	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
8_074	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
8_094	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
10_019	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
11_424	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
12_216	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
19_157	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
19_352	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
19_407	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
19_671	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
Y_026	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
TB59_5	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
2164_00S_12	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
2164_00S_1	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
2164_00S_19	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
2164_00S_4	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
HT_14	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
2503_00S_11	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
TB34_11	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
TB34_1	TGAACAAAATGGT	GATATCAGAAGC	ACAGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAAC	TGGCGCCGCGGAC	TGGG						
12348-B/1	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
12348-B/1E	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
1496-B/1C3	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
1496-B/1D3	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
1496-B/2E3	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
1496-B/2F3	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
2-C/1	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
2-C/2	TGAACAAAATGGT	GACGTCAGAAGA	AGATGAAGTTGCCATCCACC	AAGAAGGCAGAGCC	CCCGACTTGGG	CACAAC						
				81	90	100	110	120	130	140	150	

3_385	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
4_052	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	AGCCTGG	AAAACACAAAGGTACACACAGTCCAGAGAAATATGCTGCT
4_068	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	AGCCTGG	AAAACACAAAGGTACACAAATCCAGAGAAATAAGCTGCTG
5_147	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TGCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
5_535	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	AGCCTGA	AAAACACAAAGGTACAAATAATCCAGAGAAATATGCTGCT
6_098	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TGCTAG	AGAACACAAAGGTACACAAACTCCAGAGAGTATGCTGCT
6_178	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	AGCCTAA	AGAACACAAAGGTAAAGTGAATCCAGAGAAATATGCTGCT
6_324	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
HML2_Tandem	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
8_047	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	AGCCTGG	AAAACACAAAGGTACACAAATCCAGAGAAATATGCTACT
8_074	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	AGCCTGG	AAAACACAAAGGTACACAAATCCAGAGAAATATGCTACT
8_094	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	AGCCTGG	AAAACACAAAGGTACACAAATCCAGAGAAATATGCTACT
10_019	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TGCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAATCCAGAGAGTATGCTGCT
11_424	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
12_216	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
19_157	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	AGCCTGG	AAAACACAAAGGTGACACAAATCCAGAGAAATATGCTGCT
19_352	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
19_407	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	GGCCTTG	AGAACACAAAGGTGACACAAATCCAGAGAGTATGCTGCT
19_671	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	AGCCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAATCCAGAGAAATGCTGCT
Y_026	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	AGCCTGA	AAAACATCAGGTTACATAAATCCAGAGAAATATGCTGCT
TB59_5	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
2164_00S_12	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
2164_00S_1	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
2164_00S_19	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
2164_00S_4	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
HT_14	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
2503_00S_11	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAG
TB34_11	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	AGCCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAATCCAGAGAAATGCTGCT
TB34_1	TAAAGAAGCTGACACAGTTAGCTGAAAAA	GGCCTTG	AGAACACAAAGGTGACACAAATCCAGAGAGTATGCTGCT
12348-B/1F	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
12348-B/1	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
1496-B/1C3	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
1496-B/1D3	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
1496-B/2E3	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
1496-B/2F3	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
2-C/1	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
2-C/2	TAAAGAAGCTGACGACAGTTAGCTACAAAA	TATCTAG	AGAACACAAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTGCT
161.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....			

3_385	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTACCCAA	CAGCTCCGAAAGAGACAGCGACCATCGAGAACAG
4_052	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
4_068	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
5_147	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
5_535	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
6_098	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
6_178	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
6_324	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
HML2_Tandem	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
8_047	TGCAGATTTAATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
8_074	TGCAGATTTAATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
8_094	TGCAGATTTAATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
10_019	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
11_424	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
12_216	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
19_157	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
19_352	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
19_407	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
19_671	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
Y_026	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
TB59_5	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
2164_00S_12	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
2164_00S_1	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
2164_00S_19	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
2164_00S_4	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
HT_14	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
2503_00S_11	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
TB34_11	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
TB34_1	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
12348-B/1F	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
12348-B/1E	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
1496-B/1C3	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
1496-B/1D3	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
1496-B/2E3	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
1496-B/2F3	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
2-C/1	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
2-C/2	TGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTGTCTGCAGC	TGTATCCAG	CAGCTCCCGAGAGACAGCGACCAGTGGAGAAGCG
241.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....			



3_385	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
4_052	CTTTGCC--TGAGAT-GTTGT
4_068	CTTTGCC--TTAGAT-ATTGT
5_147	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
5_535	CTTTGCC--TGAGAT-GTTGT
6_098	TTCTGCCTTGAGAT-GCTGT
6_178	TTTTGCCCTTGAGAT-GCTGT
6_324	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
HML2_Tandem	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
8_047	CTTTGCC--TGAGAT-GTTGT
8_074	CTTTGCC--TGAGAT-GTTGT
8_094	CTTTGCC--TGAGAT-GTTGT
10_019	TTCTGCCTTGAGAT-GCTGT
11_424	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
12_216	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
19_157	TTCTGCCTTGAGAT-GCTGT
19_352	TTCTGCC--GTTAT-GTACT
19_407	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
19_671	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
Y_026	CTTTGCC--TGAGAT-GTTGT
TB59_5	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
2164_00S_12	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
2164_00S_1	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
2164_00S_19	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
2164_00S_4	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
HT_14	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
2503_00S_11	TTCTGCCTTGAGATTCGTA-
TB34_11	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
TB34_1	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
12348-B/1F	-----
12348-B/1E	TTCTTCCTTGAGATTNAGTT
1496-B/1C3	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
1496-B/1D3	TTCTGCCTTGAGATTCGTG
1496-B/2E3	TTCTGCCTTGAGATTNIGTT
1496-B/2F3	-----
2-C/1	TTCTGCCTTGAGATTNIGTT
2-C/2	TTCTGCCTTGAGATTNIGTT
	481.....490.....

Abbildung 15: Multiples Alignment der Provirus Typ 2-Sequenzen und rec cDNAs.

Dargestellt werden die diagnostischen Nukleotiddifferenzen innerhalb der Rec-kodierenden Sequenzen. Die hier abgebildete Region wird von den bei der RT-PCR verwendeten Primern umfasst (Kapitel 2.6). Die Abbildung zeigt alle identifizierten diagnostisch relevanten Positionen für die analysierte Rec-Region. nt 1 ist definiert als Rec Startcodon. Die Sequenz des Proteins ist blau hinterlegt. Die durch weiße Kästchen gekennzeichneten Sequenzdifferenzen sind essentiell für die Zuordnung der Rec mRNA-Sequenzen zu den einzelnen proviralen Loci. Die Bezeichnung der Loci (Referenzbezeichnung X\_XXX) erfolgt nach Mayer und Medstrand (persönliche Mitteilung).

**Anhang C: Internationaler Einbuchstabencode für Aminosäuren**

<b>Abkürzung</b>		<b>Aminosäure</b>	<b>biochemisches Verhalten</b>
A	Ala	Alanin	neutral
B	Asx	Aspartat oder Asparagin	sauer hydrophil
C	Cys	Cystein	neutral
D	Asp	Aspartat	sauer hydrophil
E	Glu	Glutamat	sauer hydrophil
F	Phe	Phenylalanin	hydrophob
G	Gly	Glycin	neutral
H	His	Histidin	neutral
I	Ile	Isoleucin	hydrophob
K	Lys	Lysin	basisch hydrophil
L	Leu	Leucin	hydrophob
M	Met	Methionin	hydrophob
N	Asn	Asparagin	neutral
P	Pro	Prolin	hydrophob
Q	Gln	Glutamin	neutral
R	Arg	Arginin	basisch hydrophil
S	Ser	Serin	neutral
T	Thr	Threonin	neutral
V	Val	Valin	hydrophob
W	Trp	Tryptophan	neutral
X	-	beliebige AS	-
Y	Tyr	Tyrosin	neutral
Z	Glx	Glutamat oder Glutamin	sauer hydrophil / neutral

---

---

## Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5255-2



9 783835 195255 3

