

Expression und biologische Funktion von humanen endogenen Retroviren (HERVs), insbesondere von **HERV-K**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Kristina Büscher

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Krüger
2. Prof. Dr. Kurth
3. PD Dr. Brune

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2006

Abstract

Daten des humanen Genomprojektes zeigen, dass ca. 8% des gesamten humanen Genoms aus retroviralen Sequenzen besteht. Der überwiegende Teil dieser Proviren ist aufgrund verschiedener Mutationen defekt. Im Gegensatz zu allen anderen HERV Proviren scheinen einige HERV-K Proviren intakt zu sein und besitzen offene Leserahmen für alle viralen Proteine. Die Familie des humanen endogenen Retrovirus K HML2 umfasst ca. 30 eng verwandte Proviren. Zusätzlich zu den Strukturproteinen Gag und Env und der Reversen Transkriptase, exprimiert HERV-K zwei regulatorische Proteine, Rec und Np9. Beide sind im Nukleus lokalisiert und tumorogene Eigenschaften bzw. eine Expression in Assoziation mit Tumorgewebe wurde nachgewiesen.

Neben Zelllinien, wie die Teratokarzinomzelllinie GH und einigen Brustkrebszelllinien, für die die Expression von HERV-K mRNA und die Produktion von Viruspartikeln bekannt ist, konnte die Expression von HERV-K Proteinen und Partikeln für Melanomzellen gezeigt werden.

Vollängen mRNA von HERV-K war in allen untersuchten humanen Proben nachweisbar. Gespleißtes *env* und *rec* war in 39% der Gewebe und in 38% der Melanomzelllinien exprimiert. Zusätzlich werden HERV-H, -R und -W exprimiert. Von den auf spezifische Antikörper gegen HERV-K Proteine untersuchten Seren der Melanompatienten waren 16% positiv für das transmembrane Hüllprotein, jedoch reagierte kein Serum mit Rec oder Np9.

Da im Zuge der Entstehung von Tumoren immer auch eine Dedifferenzierung der entarteten Zellen diskutiert wird, wurde die Expression von HERVs in undifferenzierten, embryonalen Stammzellen bestimmt. In den untersuchten embryonalen Stammzellen lässt sich Vollängen mRNA, sowie gespleißte *env*, *rec* und *np9* mRNA nachweisen. Während der Differenzierung zu neuronalen Vorläuferzellen sinkt die Expression jedoch wieder auf ein mit normalen Zellen vergleichbares Niveau.

Obwohl gespleißte RNA und virale Proteine von HERV-K vor allem in Tumoren und Tumorzelllinien exprimiert werden, ist deren Funktion während der Tumorentstehung noch immer ungeklärt. Auch die Bedeutung der HERV-K Expression in humanen Stammzellen ist noch unklar, insbesondere in Hinblick auf eine mögliche Tumorigenität.

Schlagerworte: endogenes Retrovirus, HERV-K, malignes Melanom, Embryonale Stammzellen, Rec, Np9

Abstract

In contrast to all other human endogenous retroviruses, proviruses of the human endogenous retrovirus family HERV-K have maintained open reading frames for all viral proteins. Although most proviruses are defective, structural proteins Gag and Env, the reverse transcriptase and two regulatory proteins, Rec and Np9, have been described. Rec resembles the Rev protein of HIV and tumourigenic potential was confirmed. Np9 as well is located in the nucleus and expression in association with tumour tissues was observed. Additionally to cell lines known to produce HERV-K virus particles, such as the teratocarcinoma cell line GH and breast cancer cell lines, recently melanoma cells were described to express HERV-K proteins and particles.

In order to study the expression of HERV-K, -H, -R and -W, in melanoma cell lines and biopsies primer sets were used. Antisera specific for HERV-K proteins were used for immunohistochemistry and sera from melanoma patients were investigated for HERV-K specific antibodies.

Full length mRNAs of all HERVs were found in all human cells. Spliced *env* and *rec* of HERV-K were detected in 39% of the melanoma biopsies and in 38% of the melanoma cell lines. Expression of HERV-K in situ was shown by immunohistochemistry. In addition, 16% of the patients sera tested showed antibodies against the HERV-K transmembrane envelope protein, but no antibodies against Np9 or Rec could be detected.

A certain dedifferentiation of cells as a consequence of tumour development is discussed. Therefore the expression of HERV-K in undifferentiated embryonic stem cells was investigated. The investigated stem cells showed expression of HERV-K full length, *env*, *rec* and *np9* mRNA. Although the expression decreased with differentiation to neuronal precursor cells.

Even though HERV-K mRNA and proteins were expressed in a high percentage of melanomas their function in tumour development is still unclear. As well as the meaning of the HERV-K expression in embryonic stem cells, particularly for a tumourigenic potential.

Keywords: endogenous retrovirus, HERV-K, malignant melanoma, embryonic stem cells, Rec, Np9

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 RETROELEMENTE	3
2.2 RETROVIREN	4
2.3 HUMANE ENDOGENE RETROVIREN (HERV)	7
2.3.1 Humanes Endogenes Retrovirus K (HERV-K)	8
2.3.2 Biologische Bedeutung von HERV-K	13
2.4 MALIGNES MELANOM	16
2.5 EMBRYONALE STAMMZELLEN	20
2.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
3. MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 CHEMIKALIEN	24
3.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	24
3.2.1 Melanomgewebe	24
3.2.2 Zellen und Medien	24
3.2.3 Kulturbedingungen für immortalisierte Zelllinien	26
3.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	27
3.2.5 Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl mit Trypanblau	27
3.2.6 Transfektion von Zellen	27
3.2.7 Infektion von Zellen mit HERV-K	28
3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	29
3.3.1 RNA-Aufreinigung	29
3.3.2 DNA-Aufreinigung	29
3.3.3 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	29
3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
3.3.5 one-step Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	30
3.3.6 Agarosegelelektrophorese von DNA	31
3.3.7 Reverse Transkriptase real-time PCR	31
3.4 PROTEINCHEMISCHE METHODEN	34
3.4.1 Protein-Aufreinigung	34
3.4.2 Quantifizierung von Proteinen	34
3.4.3 SDS-Page	35
3.4.4 Klonierung, Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	36
3.4.5 Test zur Aktivität von Reverser Transkriptase	40
3.5 IMMUNOLOGISCHE METHODEN	41
3.5.1 Herstellung von Immunsereen in der Ziege	41
3.5.2 Epitop-Kartierung mit einer Pepsot®-Membran	42
3.5.3 Westernblot mit Immunsereen	42
3.5.4 Immunfluoreszenz	43
3.5.5 Immunhistologie von Melanommetastasen	44

4. ERGEBNISSE	45
4.1 GENERIERUNG NEUER METHODEN ZUR ANALYSE DER HERV-K EXPRESSION	45
4.1.1 RT-PCR zum semiquantitativen Nachweis der HERV-K Expression	45
4.1.2 RT-PCR zum quantitativen Nachweis der HERV-K Expression	46
4.1.3 Charakterisierung neuer Antisera zur Analyse der HERV-K Expression	51
4.2 EXPRESSION VON HERV-K IN MELANOMEN	55
4.2.1 Expression von HERVs in Melanomgeweben und -zellen	57
4.2.2 Bestimmung exprimierter HERV-K Proviren	58
4.2.3 Semiquantitativer Nachweis der Expression von HERV-K	60
4.2.4 Real-time RT-PCR zur quantitativen Bestimmung der Expression von HERV-K	62
4.2.5 Expression von HERV-K Proteinen	66
4.2.6 HERV-K spezifische Antikörper in Seren von Melanompatienten	72
4.2.7 Infektionsversuche mit HERV-K Partikeln	74
4.3 EXPRESSION VON HERV-K IN HUMANEN EMBRYONALEN STAMMZELLEN	76
4.3.1 Expression von HERV-K in humanen embryonalen Stammzellen	76
4.3.2 Veränderung der HERV-K Expression während der Differenzierung	77
4.3.3 Expression von HERV-K Proteinen in embryonalen Stammzellen	78
5. DISKUSSION	79
5.1 HERVs: JUNK-DNA ODER TRÄGER EINER BIOLOGISCHEN FUNKTION?	79
5.2 ENTWICKLUNG NEUER METHODEN ZUR ANALYSE DER EXPRESSION VON HERV-K	81
5.3 EXPRESSION VON HERV-K IM MALIGNEN MELANOM	83
5.4 MÖGLICHE BIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON HERV-K	87
5.5 HERV-K EXPRESSION IN HUMANEN EMBRYONALEN STAMMZELLEN	90
5.6 AUSBLICK	92
LITERATURVERZEICHNIS	93
ANHANG	
DANKSAGUNG	
ERKLÄRUNG	

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Accnr.	<i>Accession number</i>
BCA	<i>bicinchonic acid</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
°C	Grad Celcius
C	Cytosin
CBP	Calmodulinbindeprotein
Cys	Cystein
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERV	endogenes Retrovirus
FBS	fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigungskonstante 9,8 m/s ²
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HML	<i>human endogenous MMTV-like</i>
HTDV	<i>human teratocarcinoma-derived virus</i>
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LTR	<i>long terminal repeat</i>
µl	Mikroliter

min.	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
NES	Kernexportsequenz
NLS	Kernlokalisationssequenz
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphat-buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PLZF	promyelozytisches Leukämie Zinkfinger
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transport RNA</i>
U	<i>units</i>

1. Zusammenfassung

Neuere Daten des Humanen Genomprojektes zeigen, dass ca. 8% des gesamten humanen Genoms aus retroviralen Sequenzen bestehen. Der überwiegende Teil dieser Proviren ist allerdings aufgrund von Ansammlungen verschiedener Mutationen defekt. Die Familie des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K) umfasst ca. 30 eng verwandte Proviren. Einige HERV-K Proviren scheinen intakt zu sein und besitzen offene Leserahmen für alle viralen Proteine, während andere HERV-K Proviren verschiedenste Mutationen und Deletionen aufweisen, dies unterscheidet sie grundlegend von allen anderen HERV-Providen. Zusätzlich zu den Strukturproteinen Gag und Env und der Reversen Transkriptase, kodiert HERV-K zwei regulatorische Proteine, Rec und Np9. Rec ist funktional dem Rev/Rex-Protein von HIV/HTLV ähnlich und eine Assoziation mit Tumorbildung wurde in Versuchen mit Nacktmäusen und mit transgenen Mäusen nachgewiesen. Während Rec von HERV-K Prototyp Proviren kodiert ist, wird Np9 von deletierten HERV-K Proviren kodiert. Np9 ist ebenfalls im Nukleus lokalisiert und eine Expression in Assoziation mit Tumorgewebe wurde nachgewiesen.

Das maligne Melanom zeichnet sich durch eine besonders hohe Letalität und ein hohes Metastasierungspotential aus. Da gezeigt werden konnte, dass die Melanomzelllinie SK-MEL-28 nicht-deletierte Vollängen-mRNA und gespleißtes *env*, *rec* und *np9* von HERV-K erhöht exprimiert, wurden verschiedene Melanommetastasen und -zelllinien auf HERV Expression untersucht. Mit Primern gegen die endogenen Retroviren HERV-H, -R und -W wurde die Expression dieser Proviren untersucht und es konnte gezeigt werden, dass sie in der Mehrzahl der Melanomproben exprimiert sind. Die Expression von HERV-K wurde detaillierter in Hinblick auf gespleißte mRNA und zusätzlich in der real-time PCR untersucht. So konnte die Expression von Vollängen- und gespleißter mRNA (*env*, *rec* und *np9*) sowie die Expression der in *rec* deletierten oder nicht-deletierten Provirus-Typen unterschieden werden. Zusätzlich wurden HERV-K spezifische Antiseren gewonnen und in der Immunfluoreszenz und Immunhistochemie verwendet. Deletierte und nicht-deletierte Vollängen-mRNA war in allen untersuchten humanen Proben nachweisbar. Gespleißtes *env* und *rec* war in 39% der Geweben und in 38% der Melanomzelllinien exprimiert. Von den auf spezifische Antikörper gegen HERV-K Proteine untersuchten Seren von Melanompatienten reagierten 16% positiv für das transmembrane Hüllprotein, jedoch reagierte kein Serum mit Np9 oder Rec.

Da im Zuge der Entstehung von Tumoren immer auch eine Dedifferenzierung der entarteten Zellen diskutiert wird, ist es für die Forschung von großem Interesse, die Expression von HERVs in undifferenzierten Zellen, wie embryonalen Stammzellen, zu

untersuchen. Zumal eine der wenigen Zelllinien, die eine erhöhte Expression von HERV-K aufweisen, die Teratokarzinomzelllinie (Keimzellkarzinom) GH ist und zudem bei *in vivo* Versuchen mit murinen Stammzellen eine Teratombildung festgestellt wurde. In den untersuchten embryonalen Stammzellen lässt sich Vollängen-mRNA sowie gespleißte *env*-, *rec*- und *np9*-mRNA nachweisen. Zusätzlich werden HERV-H, -R und -W in den Zellen exprimiert. Während der Differenzierung zu neuronalen Vorläuferzellen sinkt die Expression jedoch wieder auf ein mit normalen Zellen vergleichbares Niveau.

Obwohl gespleißte RNA und virale Proteine von HERV-K vor allem in Tumoren und Tumorzelllinien exprimiert werden, ist deren Funktion während der Tumorentstehung noch immer ungeklärt. Auch die Bedeutung der HERV-K Expression in humanen Stammzellen ist noch unklar, insbesondere in Hinblick auf eine mögliche Tumorigenität.

2. Einleitung

Retroelemente machen einen nicht unbedeutenden Teil unseres Genoms aus. Eine Klasse dieser Elemente sind die humanen endogenen Retroviren (HERVs). Sie bestehen aus Resten ehemalig exogener Retroviren, welchen eine Infektion von Zellen der Keimbahn gelang. Auch wenn der Großteil der integrierten HERV-Proviren im Laufe der Zeit durch Mutationen und Deletionen längst inaktiv ist, kann die Expression von Transkripten und Proteinen in verschiedensten gesunden und veränderten Geweben nachgewiesen werden. Dies wirft die bis heute nicht zufriedenstellend geklärte Frage nach einer biologischen Bedeutung von HERVs bei normalen Zellfunktionen oder der Entstehung verschiedenster Krankheiten auf.

2.1 Retroelemente

Seit Veröffentlichung der Daten des Humanen Genom Projekts im Jahre 2001, ist bekannt, dass ein Großteil der humanen DNA scheinbar keine kodierenden Eigenschaften aufweist, allein 45% des Genoms werden von transponierbaren, mobilen Elementen gebildet [Lander et al. 2001]. Diese lassen sich in vier Gruppen einteilen, von denen nur eine direkt als DNA übertragen wird, die DNA-Transposons. Retroelemente, hierzu gehören LINEs (*long interspersed elements*), SINEs (*short interspersed elements*) und LTR-Retroposons, vollziehen ihre Replikation über ein RNA-Zwischenprodukt. Die einzelnen Schritte umfassen: Transkription der integrierten DNA durch zelluläre RNA-Polymerasen, reverse Transkription der mRNA durch eine RNA abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) und anschließende (Re-) Integration der synthetisierten DNA in das Genom mittels einer Integrase. Bedingt durch diesen Integrationsmechanismus wird jedes Retroelement durch kurze Sequenzwiederholungen (*direct repeats*) begrenzt. Man unterscheidet Elemente ohne LTR, aber mit eigenem Promotor (Retrogene) und ohne eigenen Promotor (Pseudogene). Retroelemente ohne LTR, aber mit eigener Reverser Transkriptase bezeichnet man als Retroposons [Vogt 1997a]. Diese non-LTR Elemente umfassen den größten Anteil der transponierbaren Elemente und mit 33,9%, einen nicht unbeträchtlichen Teil des humanen Genoms [Lander et al. 2001].

Retroelemente mit LTR und *Envelope*-Gen werden als Retroviren bezeichnet [Wilkinson et al. 1994, Löwer et al. 1996]. Ungefähr 8% der humanen DNA bestehen aus Retroviren und Retrovirus ähnlichen Elementen [Lander et al. 2001]. Die meisten dieser Retroelemente sind fest im Genom verankert und die Wahrscheinlichkeit von Transpositionen ist gering [Medstrand et al. 2002]. Dennoch wurde geschätzt, dass bei einem von hundert

Neugeborenen eine *de novo* Insertion solcher Retroelemente auftritt [Deiniger und Batzer 2002].

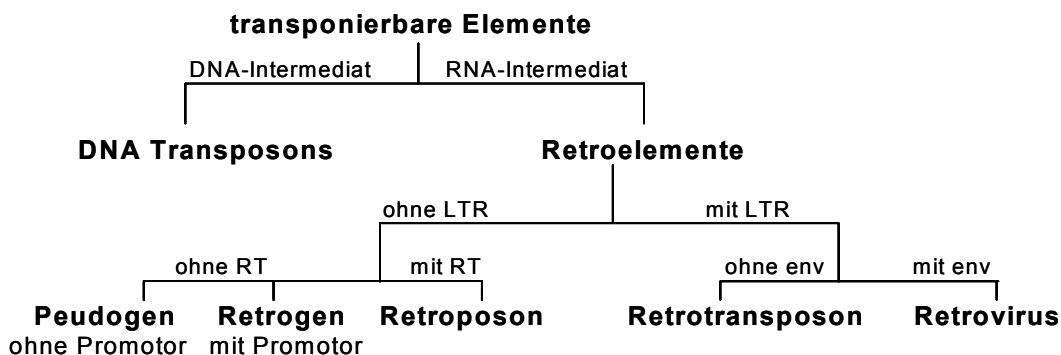


Abb. 2.1: Klassifizierung der Retroelemente.

Elemente, die über ein RNA-Zwischenprodukt übertragen werden, werden als Retroelemente bezeichnet und in Elemente mit und ohne LTR unterteilt. Retroelemente ohne RT werden als Pseudogene (ohne eigenen Promotor) oder als Retrogene (mit eigenem Promotor) bezeichnet, Retroposons besitzen kein LTR aber eine eigene RT. Retroelemente viralen Ursprungs sind Retrotransposons (ohne *env* Gen) und Retroviren (mit *env* Gen).

2.2 Retroviren

Retroviren sind die am höchsten organisierte Form der Retroelemente. Man nimmt an, dass exogene Retroviren von endogenen Retroposonen abstammen, indem sie ein zelluläres *Envelope*-Gen akquiriert haben. Sie wurden erstmals 1908 und 1911 beschrieben, als es sowohl der Arbeitsgruppe um Ellermann und Bang, als auch P. Rous gelang, Leukämien bzw. Tumore bei Geflügel mittels Ultrafiltraten zu übertragen [Modrow et al. 2003]. J.J. Bittner beschrieb 1936 das MMTV (*Murine Mammary Tumor Virus*) als Erreger der malignen Milchdrüsenerkrankung bei Mäusen, ein weiterer Hinweis auf die Assoziation von Retroviren mit Tumorerkrankungen. Mit dem HTLV (*Human T-cell Leukemia Virus*) beschrieb R.C. Gallo 1986 das erste humane Retrovirus, welches bei erwachsenen Menschen Krebserkrankungen auslösen kann [Gallo 1986]. Zu den wohl bekanntesten humanen Retroviren zählt das HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), welches von L. Montagnier und R.C. Gallo 1983/1984 als Auslöser der erworbenen Immunschwäche AIDS identifiziert wurde.

Die Familie der Retroviridae ist in sieben Genera unterteilt: α - β -, γ -, δ -, und ϵ -Retroviren sowie Lentiviren und Spumaviren. Der Aufbau infektiöser Viruspartikel ist im Allgemeinen sehr ähnlich, die Viruspartikel haben einen Durchmesser von etwa 100nm und sind umgeben von einer Hüll-

membran (*envelope*), die von der Zytoplasmamembran abgeleitet ist (siehe Abb. 2.2). Eingelagert in diese Membran ist das transmembrane Hüllprotein (TM-Protein). An den extraviralen Bereich des TM-Proteins ist nicht-kovalent das externe Glykoprotein (SU-Protein, *Surface Unit*) gebunden. Transmembranprotein und externes Glykoprotein

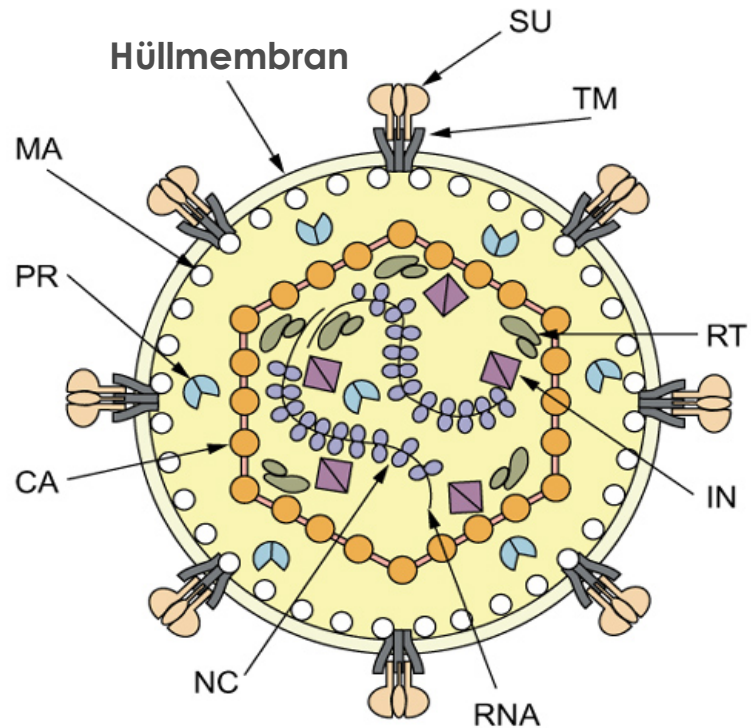


Abb. 2.2: Aufbau eines Retroviruspartikels.

Schematischer Querschnitt durch einen retroviralen Partikel, Beschriftung siehe Text [modifiziert aus Vogt 1997b].

liegen als trimere Komplexe in der Hüllmembran vor. Im Innern der Membran angelagert befinden sich die netzartig miteinander verbundenen Matrixproteine (MA), die über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden sind. Im Inneren des Partikels befindet sich das Virus-Kapsid, das eine sphärisch-ikosaedrische (bei α -, β -, γ - und δ -Retroviren und Spumaviren) oder konische (bei einigen β -Viren und Lentiviren) Form besitzt. Die Hülle des Kapsids besteht aus Kapsidproteinen (CA). Im Inneren des Kapsids befinden sich zwei identische Moleküle einzelsträngiger (+) RNA, die mit den Nukleokapsidproteinen (NC) komplexiert sind. Kapsidproteine, Matrixproteine und Nukleokapsidproteine sind Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine). Im Viruspartikel befinden sich zudem noch die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR).

Das Genom der Retroviren umfasst 7 bis 12kb und kodiert für die vier Proteine: das Gag-Protein (*group specific antigen*), ein Polyprotein, welches durch die viruseigene Protease in die

verschiedenen Nukleokapsidprotein gespalten wird. Eine Protease (Prt/PR), einen Polymerase-Komplex (Pol) mit Reverser Transkriptase, RNaseH und Integrase sowie das *Envelope*-Protein (Env), ein Vorläuferprotein, welches durch eine zelluläre Protease in einen aminoterminalen, externen (SU) und einen carboxy-terminalen, transmembranen (TM) Anteil gespalten wird (siehe Abb. 2.3). Die entsprechenden Gene finden sich bei allen einfachen Retroviren. Darüber hinaus besitzen komplexe Retroviren, wie HTLV oder HIV, weitere regulatorische und akzessorische Gene, deren Proteine die Genexpression regulieren.

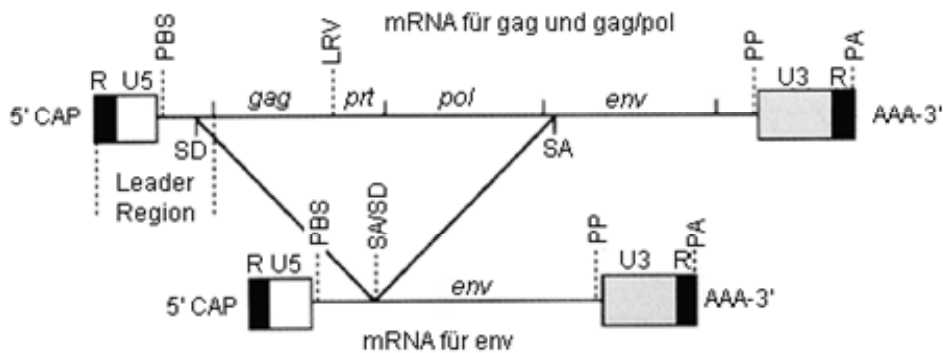


Abbildung 2.3: Organisation des RNA-Genoms von Retroviren.

Dargestellt sind die Vollängen-mRNA und die *env*-mRNA mit ihren flankierenden Sequenzen. Die Abkürzungen sind dem Text zu entnehmen. SA = Spleißakzeptor, PA = Polyadenylierungssignal, PBS = Primerbindestelle, LRV = Leserasterverschiebung [modifiziert aus Vogt 1997a].

Die kodierenden Regionen werden am 5'- und 3'-Ende von regulatorischen Kontrollsequenzen flankiert. Die R-Region (R = redundant) liegt in identischer Basenfolge und Orientierung unmittelbar nach der 5'CAP und vor dem Poly-A am 3'-Ende. Direkt an die R-Region am 5'-Ende schließt sich eine als U5 (U = unique) bezeichnete Basenfolge an. Darauf folgt die Primerbindungsstelle (PBS), die über Basenpaarung mit dem 3'-Ende einer zellulären t-RNA komplexiert ist. Der Genomabschnitt zwischen PBS und dem Beginn des *gag*-Gens wird als Leader Sequenz bezeichnet, sie beinhaltet eine Spleißdonorstelle (SD) zur Produktion der gespleißten *env*-mRNA. Im Anschluss an die kodierenden Gene befindet sich der Polypurinbereich (PP) gefolgt von der U3-Region und dem zweiten R-Bereich. U5 und U3 beinhalten Sequenzen, die für die Integration des Provirus in das Genom der Wirtszelle eine bedeutende Rolle spielen. Der Polypurinbereich ist ein Kontrollelement bei der Initiation der reversen Transkription.

Retroviren können neben dem exogenen Replikationsweg (horizontale Übertragung) durch Bildung neuer infektiöser Partikel auch endogen (vertikale Übertragung) weitergegeben werden. Hierbei werden die Proviren als Bestandteil von Keimbahnzellen auf die

Folgegeneration übertragen. Dies wurde erstmals 1963 von J.J. Bittner für das MMTV beschrieben [Modrow et al. 2003]. Neben den exogenen Viren existieren so auch endogene Viren, die in Zellen der Keimbahn und somit auch in allen somatischen Zellen inseriert sind. Endogene Retroviren (ERV) sind bei verschiedensten Tieren inklusive des Menschen zu finden. Trotz der theoretisch geschätzten Zahl von einer de novo Insertion von Retroelementen pro hundert Geburten [Deiniger und Batzer 2002] wurde beim Menschen bis heute keine Transpositionsaktivität von endogenen Retroviren oder eine neue Endogenisierung exogener Viren dokumentiert, auch wenn sie nicht völlig ausgeschlossen werden kann [Bannert und Kurth 2004]. Beispiele hierfür sind für Retroviren von verschiedenen Säugetieren bekannt. Von dem MMTV und dem murinen Leukämie Virus bei Mäusen, dem JSRV (*Jaagsiekte Sheep Retrovirus*) bei Schafen, die PERVs (*Porcine Endogene Retroviren*), dem ALV (*Avian Leukemia Virus*) bei Hühnern oder dem FeLV (*Feline Leukemia Virus*) bei Katzen sind aktuell sowohl endogene, wie auch exogenen Stämme bekannt [Boeke und Stoye 1997].

2.3 Humane endogene Retroviren (HERV)

Der Ursprung heutiger humaner endogener Retroviren sind retrovirale Proviren, die vor ca. 40 Millionen Jahren ins Genom unserer Vorfahren eingebaut wurden [Löwer et al. 1996]. Aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks bezüglich infektiöser Viruspartikel und der Ansammlung von Mutationen im Laufe der Jahre, wird der Großteil dieser Viren nicht transkribiert und ist nicht mehr replikationskompetent. Nur wenige endogene Retroviren besitzen ein vollständiges Genom vergleichbar mit dem exogener Retroviren [Bannert und Kurth 2004]. Zusätzlich bestehen große Teile dieser Sequenzen aus so genannten *solitary* LTRs, welche die internen Sequenzen durch homologe Rekombination der flankierenden LTRs verloren haben [Lander et al. 2001]. Die Nomenklatur beruht auf der Bindungsstelle des Primers, welcher die reverse Transkription initiiert. Dabei wird der Einbuchstabencode der Aminosäure des jeweiligen tRNA-Primers verwendet. Leider stößt diese Methode an ihre Grenzen, wenn entfernt verwandte Viren dieselbe tRNA verwenden. Oft unvollständige Informationen über diese Region, verursacht durch Mutationen oder Deletionen, machen die Klassifikation unmöglich oder zumindest sehr verwirrend [Bannert und Kurth 2004].

Der Grund für die Bemühungen, neue HERVs zu identifizieren, ist vor allem auf die Entdeckung zurückzuführen, dass replikationskompetente endogene Retroviren in Mäusen, Schafen und anderen Säugern mit einigen Formen von Krebs assoziiert sind. In neuerer Zeit werden die meisten HERVs oder ihre Reste mit Hilfe der schnell wachsenden Genom-Datenbanken identifiziert, aber nur wenige dieser Proviren besitzen intakte offene

Leserahmen für die drei Hauptproteine Gag, Pol und Env [Mayer et al. 1999, Griffiths 2001, Turner et al. 2001].

Trotz der großen Anzahl an deletierten, mutierten und somit inaktiven Proviren ist die Expression von mRNA und Proteinen von verschiedenen HERV-Sequenzen in humanen Gewebe nachgewiesen worden. So wurde die Expression von HERV-K [Franklin et al. 1988, Simpson et al. 1996,], HERV-H [Johansen et al. 1989], HERV-R (ERV-3) [Larsson et al. 1994, Andersson et al. 1998] und HERV-W [Stauffer et al. 2004] in der Plazenta gezeigt. Bei HERV-W lässt sich eine Beteiligung an der zellulären Differenzierung des Synzytiotrophoblasten über Syncitin, ein Produkt des *env*-Gens, nachweisen [Mi et al. 2000]. Neuere Techniken wie MicroArrays lassen Analysen der Expressionsmuster von HERVs in einem größeren Umfang und in verschiedensten Geweben zu. So konnte bei einer Studie zur Expression von HERV-K (HML-2), -W, -H und -E in normalem und kanzerogenem Gewebe gezeigt werden, dass HERV-K in Normalgeweben wie Muskelgewebe, Haut und Gehirn, ebenso exprimiert wird, wie in Keimzelltumoren und anderen kanzerogenen Geweben. HERV-H wird vor allem in Krebsarten des Magen-Darm-Traktes exprimiert. Im Gegensatz dazu wird HERV-W in normalem Plazentagewebe exprimiert [Stauffer et al. 2004]. Zu den transkribierten HERVs zählt auch HERV-E auf Chromosom 17q11, in Pankreas und Schilddrüsengewebe konnte eine Expression nachgewiesen werden [Shimora et al. 2001].

Da HERV-K vor allem in Keimzelltumoren nachgewiesen werden konnte und mit einer Reihe weiterer Retroviren auch in der Plazenta exprimiert wird, lag es nahe, auch embryonales und fetales Gewebe auf Expression von endogenen Retroviren zu untersuchen. In einer Studie mit normalem fötalem Gewebe zeigte sich, dass HERV-R *env* vor allem in der Nebennierenrinde exprimiert wird. Eine erhöhte Expression wurde ebenfalls in Ausgangsgeweben von Niere, Zunge, Herz, Leber und zentralem Nervensystem detektiert [Anderson et al. 2002].

2.3.1 Humanes Endogenes Retrovirus K (HERV-K)

Im Gegensatz zu anderen HERV-Familien, die durch Deletionen und andere Mutationen stark geschädigt sind, sind einige Mitglieder der HERV-K-Familie weitestgehend intakt. Sie stellen die biologisch aktivste Familie innerhalb der humanen endogenen Retroviren dar. Die Klassifizierung über Sequenzhomologien im *pol*-Gen unterteilt sie in sechs Gruppen, HML-1 bis -6. Innerhalb einer Gruppe sind die einzelnen Elemente zu mehr als 85% identisch, zwischen den Gruppen besteht dagegen nur eine Sequenzähnlichkeit von maximal 75% [Medstrand und Blomberg 1993, Seifarth et al. 1998].

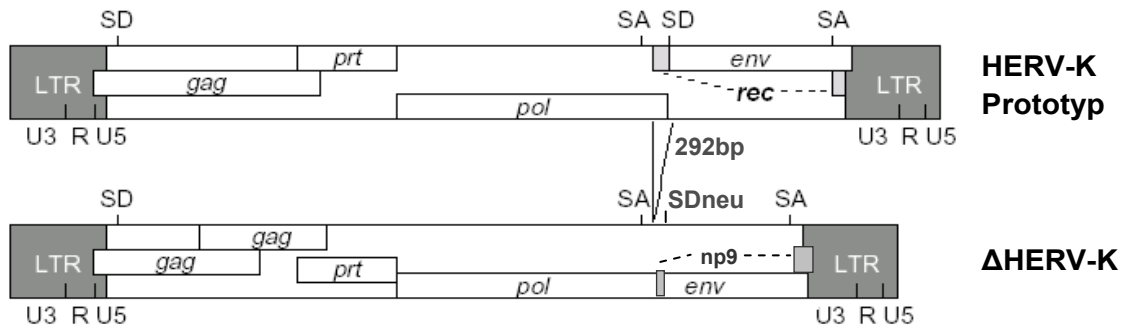
Zur Zeit sind nur Vollängengenome von Proviren der Gruppen HML-2 und -6 vollständig sequenziert worden. Vor allem die Gruppe HERV-K (HML-2) ist gut untersucht, sie besteht aus etwa 30 Proviren, wenn auch einige mit größeren Deletionen, und geschätzten 10.000 bis 25.000 *solitary* LTRs, die über das gesamte Genom verteilt sind [Seifarth et al. 1998]. Alle scheinbar intakten HERV-K Proviren gehören zu dieser evolutionär jüngsten Gruppe, welche ausschließlich im Genom von Catarrhines (Altwelt-Affen und Hominiden) zu finden ist. Dass Viren dieser Gruppe auch noch vor ca. fünf Millionen Jahren nach der evolutionären Trennung der Menschen von den Affen aktiv waren, zeigen einige wenige Loci, die auf den Menschen beschränkt sind [Barbulescu et al. 1999, Medstrand und Mager 1998, Turner et al. 2001].

Die erste HERV-K Sequenz wurde 1986 von Ono mit einer Sonde gegen eine konservierte Region des *pol*-Gens im Southern Blot entdeckt. Dieses Provirus, HERV-K10, war auch das erste, welches vollständig sequenziert wurde [Ono et al. 1986]. HERV-K10 und verwandte HERV-K Proviren weisen eine charakteristische Deletion von 292bp auf, die zu einer Fusion des *pol*-Gens mit dem *env*-Gen führt (HERV-K Deletionsmutante; Δ HERV-K). Das später sequenzierte HERV-K Provirus (HML-2.HOM) auf Chromosom 7 [Mayer et al. 1999] weist diese Deletion nicht auf und besitzt vollständige Leserahmen für alle viralen Gene (HERV-K Prototyp). Für dieses HERV-K Provirus sind alle Polymorphismen beschrieben, alle Varianten beinhalten aber vorzeitige Stopp-Codone, Deletionen oder eine defekte Reverse Transkriptase [Mayer et al. 1999, Bannert und Kurth 2004].

Weitere, scheinbar intakte, HERV-K Proviren wurden 2001 beschrieben, darunter auch das „jüngste“ HERV-K Provirus, HERV-K 113, sein Alter wird auf weniger als 20.000 Jahre geschätzt. Das Provirus liegt auf Chromosom 19p13.11 und ist noch nicht komplett in der humanen Population fixiert. Genotypisierung mit genetisch unterschiedlichen Individuen zeigt eine allele Häufigkeit von 19% [Turner et al. 2001]. Das Provirus kommt bei kaukasischer Bevölkerung eher selten vor, während es bei afrikanischer Abstammung häufiger zu finden ist. Es besitzt vollständige Leserahmen für alle beschriebenen viralen Gene und alle bekannten funktionellen Domänen sind intakt [Moyes et al. 2005]. Daher ist es denkbar, dass ein replikationskompetentes, HERV-Propvirus innerhalb der humanen Population existiert.

Genomische Organisation von HERV-K

DNA



mRNA

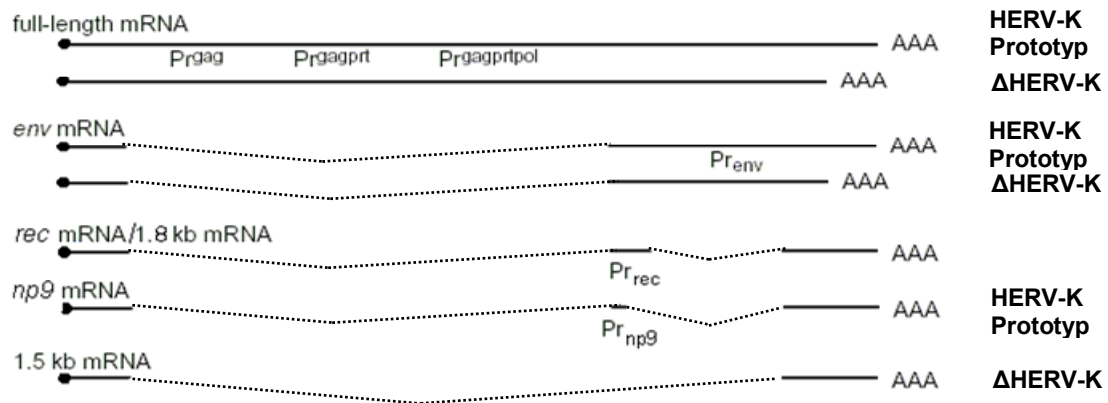


Abb. 2.4: Genomische Organisation von HERV-K und gespleißte mRNA Transkripte. Organisation von HERV-K Proviren des Prototyps und ΔHERV-K. Exprimierte Transkripte der HERV-K Proviren: Vollängen mRNA und gespleißtes *env*, *rec*, *np9* und das 1,5kb Transkript. Die Kodierung für die entsprechenden Proteine Gag, Protease, Polymerase, Env, Rec und Np9 sind gekennzeichnet [modifiziert nach Löwer et al 1995].

Die Produktion HERV-K spezifischer Vollängen- und gespleißter mRNA konnte in Teratokarzinomzellen und in Melanomen nachgewiesen werden [Löwer et al. 1993, Muster et al. 2003]. Zusätzlich zur Vollängen-mRNA und der einfach gespleißten *env*-mRNA, werden noch zwei doppelt gespleißte Transkripte gebildet, die für zwei akzessorische Proteine, Rec und Np9, kodieren [Löwer et al. 1995, Armbrüster et al. 2002]. Des weiteren wird ein einfach gespleißtes 1,5kb großes Transkript, mit bis heute unbekannter Bedeutung, exprimiert (siehe Abb. 2.4). Die Expression und das korrekte Spleißen der unterschiedlichen mRNAs ist von Bedeutung, da nur so Proteine gebildet werden, welche mit einer eventuellen Funktion an zellulären Prozessen beteiligt sein können.

Im Elektronenmikroskop wurden in verschiedenen Teratokarzinom-Zelllinien Retrovirus-ähnliche Partikel gefunden, die als HTDV-Partikel (*Human Teratocarcinoma-Derived Virus*) bezeichnet werden und deren Ursprung HERV-K ist [Boller et al. 1983, Löwer et al. 1984]. Ähnliche Partikel wurden in Melanomzellen entdeckt [Muster et al. 2003]. RT-Aktivität wurde sowohl in Teratokarzinom-Zelllinien, als auch in Melanomzellen nachgewiesen [Tönjes et al. 1996, Muster et al. 2003]. Die Produktion der anderen Genprodukte und deren enzymatische Aktivität konnte ebenfalls gezeigt werden. So bilden GH-Zellen ein myristiliertes Gag-Vorläuferprotein, das durch autoproteolytische Aktivität der HERV-K Protease prozessiert wird [Boller et al. 1993, Müller-Lantzsch et al. 1993, Schommer et al. 1996, Kitamura et al. 1996], woraus Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidprotein entstehen. In Melanomzellen konnten sowohl prozessierte Gag-Proteine, eine funktionelle Protease, als auch das Env-Vorläuferprotein und prozessiertes TM- und SU-Protein nachgewiesen werden [Muster et al. 2003]. Vor allem das Vorhandensein des *Envelope*-Proteins und seiner Spaltprodukte ist von Bedeutung, da sie, wenn sie korrekt prozessiert sind, in den extrazellulären Raum gelangen und zugänglich sind (siehe Abb. 2.5).

gp36/TM

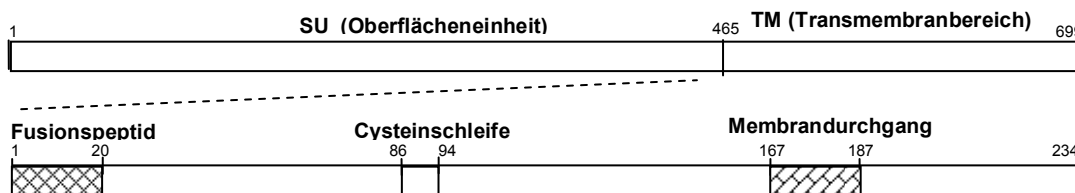


Abb. 2.5: *Envelope* Vorläufer Protein und prozessiertes TM-Peptid von HERV-K.

Schematische Darstellung des *Envelope* Vorläuferproteins, aus dem durch proteolytische Spaltung das Oberflächenprotein und das Transmembranprotein entstehen. Bei dem TM-Protein ist die Anordnung der strukturellen Domänen, Fusionspeptid, Cysteinschleife und Transmembrandurchgang, dargestellt.

Zusätzlich zu den strukturellen und enzymatischen Proteinen werden zwei akzessorische Proteine, Rec und Np9 [Löwer et al. 1995, Armbrüster et al. 2002], gebildet. Beide Proteine werden von doppelt gespleißter mRNA, von einem zweiten Spleißdonor und -akzeptor Paar im *env*-Bereich exprimiert (siehe Abb. 2.4). Das HERV-K Prototyp Provirus kodiert für Rec, ΔHERV-K für Np9. Durch die fehlenden 292bp im *env*-Gen der deletierten Proviren, ist der ursprüngliche zweite Spleißdonor nicht mehr vorhanden. Hierfür entstand ein neuer, für HERV-K Deletionsmutanten spezifischer, Spleißdonor. Zusätzlich führt bei Np9 eine Leserasterverschiebung am Spleißakzeptor dazu, dass ein neues zweites Exon gebildet wird. Env, Rec und Np9 besitzen so identische 15 Aminosäuren des ersten Exons.

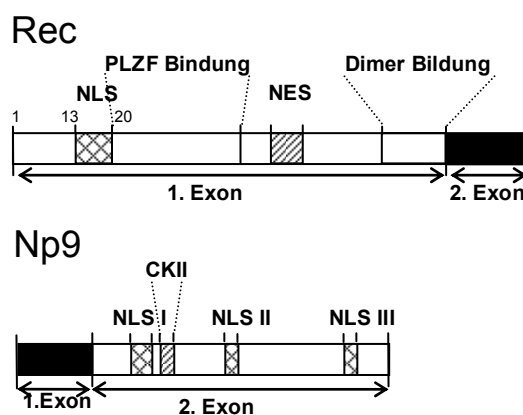


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des Rec- und Np9-Proteins von HERV-K.

Schematische Darstellung der exprimierten Proteine Rec und Np9. Dargestellt sind die funktionellen Domänen. NLS Nucleus Lokalisations Signal, NES Nucleus Export Signal, PLZF Promyelozytische Leukämie Zinkfinger Protein, CKII Casein Kinase II Phosphorylierungsstelle (siehe Text).

Rec, ein 14,7kDa Protein, ist funktionell homolog zu Rev von HIV und Rex von HTLV. Analog zu Rev und Rex vermittelt Rec den Transport von mRNA mit definierten Sequenzen bzw. Sekundärstrukturen (RcRE, Rec-Responsive Element) aus dem Kern ins Cytoplasma [Magin et al. 1999, Boese et al. 2000a]. Rec gelangt aufgrund seiner Kernlokalisationssequenz (NLS, *nuclear localisation signal*) in den Kern, bindet dort an nicht vollständig gespleißte mRNA mit entsprechendem RcR-Element. Anschließend bindet der Komplex aus Rec und mRNA aufgrund der Kernexportsequenz (NES, *nuclear export signal*) von Rec an den zellulären Exportrezeptor Crm1 (auch Exportin1) und wird durch diesen zurück ins Cytoplasma geschleust [Boese et al. 2000a]. Somit spielt Rec eine wichtige Rolle bei der effizienten Expression von Strukturproteinen von HERV-K. Neben dieser Funktion bindet Rec an das promyelozytische Leukämie Zinkfinger Protein (PLZF) [Boese et al. 2000b], welches eine Rolle bei Zelldifferenzierung, Apoptose und Spermatogenese spielt (Barna et al. 2000, Boese et al. 2000b, Schaknovich et al. 1998). Zudem besitzt Rec transformierendes Potential. Es unterstützt die Tumorbildung in Nacktmäusen [Boese et al. 2000b] und transgene Mäuse, die Rec in einem induzierbaren Expressionssystem tragen, zeigen eine gestörte Keimzellentwicklung. Zudem bilden sie Karzinom-ähnliche Veränderungen, ein Vorläufer von klassischen Seminomen beim Menschen [Galli et al. 2005]. Die Expression von Rec-Protein konnte auch zuerst in Keimzelltumor-Zelllinien [Löwer et al. 1995, Magin et al. 1999] und Melanomen [Muster et al. 2003] gezeigt werden. Vor allem sein transformierendes Potential machte die Rec-Expression zum Ziel der Untersuchungen nach einer Bedeutung von HERV-K, auch im malignen Melanom.

Das von der HERV-K Deletionsmutante gespleißte Np9-Protein ist 8,7kDa groß und erst seit kurzem bekannt [Armbrüster et al. 2002]. Durch die 292bp Deletion bei Δ HERV-K ist die Spleißdonorstelle im *env*-Gen nicht mehr vorhanden. Ein doppelter Nukleotidaustausch bei diesen Proviren (TA zu AG) führte zu einem Δ HERV-K spezifischen Spleißdonor. Np9 besitzt drei potentielle Kernlokalisationssequenzen (NLS I bis III) und ist auch dort lokalisiert. Die Expression von *np9*-mRNA konnte in über 90% aller untersuchten transformierten Zelllinien und in Biopsien von Primärtumoren, Seminomen, Mammakarzinomen und Lymphozyten von Leukämiepatienten, nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war in Vergleichsproben aus gesundem Gewebe (aus Darm, Magen und Plazenta), Fibroblasten und Lymphozyten keine *np9*-Expression nachzuweisen [Armbrüster et al. 2002]. Genauso wie die Expression von *rec* wurde die Expression von *np9* vorwiegend in transformiertem Gewebe nachgewiesen und ist somit Ziel der Untersuchungen.

2.3.2 Biologische Bedeutung von HERV-K

Indirekte Hinweise auf die Expression von HERV-K konnten zunächst in Untersuchungen mit Seren von verschiedenen Patienten gewonnen werden. Bei Patienten mit Hodentumoren oder Leukämien, aber auch bei Schwangeren konnte eine erhöhte ELISA-Aktivität gegen synthetische Proteine von HERV-K gefunden werden [Denner et al. 1995]. So zeigten 45% aller Patienten mit Hodentumor eine Reaktion gegen synthetische Peptide des transmembranen Hüllproteins von HERV-K, darunter 58% mit Teratokarzinom. Erhöhte Antikörpertiter gegen rekombinantes Env-Protein konnten bei 85% der Patienten mit Seminom oder anderen Keimzelltumoren festgestellt werden, vor allem gegen den Anteil des transmembranen Hüllproteins [Sauter et al. 1996]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass in Keimzelltumoren auch Proteine von HERV-K, Gag und ENV, nachgewiesen werden konnten [Phelps 1997, Herbst et al. 1998]. Die Tatsache, dass eine humorale und zelluläre Immunreaktion gegen HERV Proteine in Krebspatienten festgestellt wurde, eröffnet die Möglichkeit, diese Antigene eventuell für eine Immuntherapie oder als diagnostisches Mittel zu nutzen. Auch die Expression der mRNA könnte als Tumormarker eingesetzt werden.

Die Transkription der HERV-K Vollängen-mRNA und gespleißter *env*- sowie *rec*- und *np9*-mRNA konnte vor allem in verschiedenen Tumoren festgestellt werden. So wurden gespleißte *env*- und *rec*-Transkripte schon vor einigen Jahren in Teratokarzinomen nachgewiesen [Löwer et al. 1993]. Ebenso konnte in Brustkrebs-Zelllinien [Etkind et al. 1997] und später auch in Brustkrebsgewebe [Wang-Johannig et al. 2001] die Expression von HERV-K gezeigt werden. In Melanomzellen konnte sowohl die Expression von Vollängen und gespleißter mRNA, wie auch prozessierte Gag-Proteine, eine funktionelle Protease, und

auch das Env-Vorläuferprotein mit prozessiertem TM- und SU-Protein nachgewiesen werden [Muster et al. 2003]. Bei der Maus und anderen Tieren konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression endogener Retroviren und Immun- und Tumorerkrankungen nachgewiesen werden [Übersicht Stoye und Coffin 1985]. Beim Menschen allerdings konnte bislang kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Expression retroviraler Sequenzen und der Tumorentstehung gezeigt werden. Es gibt jedoch, wenn auch kontroverse, Hinweise, dass humane endogene Retroviren in der Ätiologie von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus [Conrad et al. 1997], multiple Sklerose [Sugimoto et al. 2001] oder bei systemisch auftretendem Lupus erythematosus [Ogasawara et al. 2001] eine Rolle spielen könnten.

Häufig wirken exogene Retroviren immunsuppressiv und rufen ähnlich wie HIV und HTLV eine generalisierte Immunsuppression hervor [Denner 1987]. Früh konnte gezeigt werden, dass nicht nur infektiöse Viruspartikel, sondern auch inaktivierte Viren die Immunantwort des Wirtes *in vivo* beeinträchtigen. Diese Immunsuppression wird möglicherweise durch eine hochkonservierte Region im transmembranen Hüllprotein der Viren (ISU) verursacht. *In vitro* unterdrücken inaktivierte MuLV-, FeLV- und HIV-Partikel, aufgespaltene Viruspartikel, gereinigte Transmembranproteine wie das p15E von FeLV und MuLV und synthetische Peptide wie CKS-17 von MuLV und FeLV verschiedene Immunreaktionen. *In vivo* wird durch inaktiviertes FeLV sowohl die Makrophagen-Infiltration als auch die Antikörperantwort gegen Zelloberflächen-Antigene gehemmt und die Tumorprogression durch ein Challenge-Virus stimuliert [Oostendorp et al. 1993]. Auch für inaktivierte HIV-1 Partikel und synthetische Peptide der ISU-Region von HIV-1 konnten immunsuppressive Eigenschaften gezeigt werden [Cianciolo et al. 1985, Pahwa et al. 1985, Oostendorp et al. 1993, Denner et al. 1994]. Die Wirkweise des immunsuppressiven Peptids CKS-17 wurde in verschiedenen Studien untersucht und ein Einfluss auf das cAMP-Level und die Aktivität von MAP-Kinasen festgestellt [Haraguchi et al. 1995, Takahashi et al. 2001]. Zudem werden verschiedene Zytokine beeinflusst, so kommt es zu einem erhöhten Level an Typ2 Zytokinen, wie IL-10 und gleichzeitig zu einem verringerten Level an Typ1 Zytokinen wie IL-2, IL-12, Interferon γ (IFN γ) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α). Dieses Ungleichgewicht an Zytokinen beeinflusst die zellvermittelte Immunität negativ [Haraguchi et al. 1995 a und b].

Eine Veränderung des Zytokinmilieus hat bedeutenden Einfluss auf die Reifung und die nachfolgende Funktion von dendritischen Zellen. Ein so verändertes Zytokinmilieu konnte bei Patienten mit malignem Melanom in den so genannten Wächter-Lymphknoten (Sentinel nodes, SN), den regionalen Lymphknoten, die dem Primärtumor am nächsten liegen, festgestellt werden. Es wird daher angenommen, dass der Primärtumor mit dem lokalen

Immunsystem interagiert. Zudem konnte ein immunsuppressiver Effekt in diesen Lymphknoten nachgewiesen werden, für den vermutet wird, die schnelle Metastasierung von malignen Melanom zu begünstigen [Lee et al. 2005, Botella-Estrada et al. 2005].

Der Zusammenhang zwischen Entstehung von Tumoren sowie einer beobachteten Immunsuppression und der Expression von HERV-K Sequenzen, im besonderen von TM und Rec, ist noch nicht geklärt. Ergebnisse der bisherigen Forschung auf diesem Gebiet lassen jedoch darauf schließen, dass zumindest eine Verknüpfung dieser beiden Ereignisse besteht, wobei die Art dieser Verbindungen noch unbekannt ist.

2.4 Malignes Melanom

Das maligne Melanom ist der Hauttumor mit dem höchsten Malignitätsgrad und einer hohen und raschen Metastasierungstendenz. Es entsteht intradermal aus Melanozyten oder bestehenden Naevi. Diese befinden sich in der Epidermis, weshalb 90% der Tumore sich primär an der Haut entwickeln. Die Neigung, bereits bei kleiner TumorgroÙe zu metastasieren, und eine geringe Ansprechrate auf eine Therapie, sind der Grund für seine außerordentliche Gefährlichkeit [Berking et al. 2005]. Die Ätiologie der malignen Transformation gesunder Melanozyten ist nur teilweise bekannt und obwohl der Anteil an malignen Hautgeschwülsten nur 3% beträgt, werden nahezu alle Todesfälle an malignen Hauttumoren durch das Melanom bedingt [Balch et al. 1992].

Weltweit nehmen die Erkrankungsfälle an malignem Melanom um 6% pro Jahr zu [Weinstock 1998]. Es gibt jedoch geographische und ethnische Unterschiede. In der weißen Bevölkerung liegt die Inzidenz des Melanoms um bis zu 100mal höher als bei Afrikanern oder Asiaten [Armstrong und Kricke 1995]. In Mitteleuropa liegt die Inzidenz derzeit bei 10-15 Fällen je 100.000 Einwohner [Armstrong und Kricke 1994]. Seit den 40er Jahren verdoppelten sich die Inzidenzraten des malignen Melanoms ca. alle 15 Jahre [Berking 2005]. Die steigende Inzidenz hat mehrere Ursachen, zum einen ein höheres Durchschnittsalter, genetische Dispositionen, immunsuppressive Faktoren sowie geänderte Reise- und soziale Gewohnheiten, die Zahl erlittener Sonnenbrände und das Lebensalter, in dem erstmals eine starke Sonnenexposition erfolgte [Whiteman et al. 2001], zudem eine verbesserte Diagnostik und eine erhöhte Aufmerksamkeit. Im Unterschied zu anderen, malignen Tumoren ist die frühzeitige Entdeckung eines Melanoms relativ leicht möglich, da es durch seinen Sitz an der Haut leicht diagnostiziert werden kann. Das maligne Melanom kann in allen Altersstufen auftreten, vor dem 15. Lebensjahr ist es allerdings selten, gehäuft tritt es zwischen dem 40. und 55. Lebensjahr auf. Die Letalität des malignen Melanoms zeigte bis Ende der 70er Jahre in den westlichen Industrieländern ebenfalls eine ansteigende Tendenz.

Die Zahl der erlittenen Sonnenbrände steht in direkter Korrelation mit der Entwicklung eines Melanoms. UV-Licht ist der wesentlichste heute bekannte krankheitsauslösende Faktor. UV-B Strahlung (280-315nm) ist besonders schädigend, da sie direkte DNA Schäden verursachen kann. Nicht zu unterschätzen ist jedoch auch das Potential von UV-A Strahlung (315-400nm), welche indirekt wirkt und über freie Radikale Mutationen verursachen [Berking et al. 2005, Hussein 2005] aber auch Wachstumsfaktoren stimulieren kann [Herlyn et al. 2000].

Maligne Melanome haben, wie andere Krebsarten auch, einen genetischen Hintergrund. Etwa 10% aller malignen Melanome treten familiär gehäuft auf. Bei Patienten mit familiärem Melanom wurden verschiedene Gene gefunden, die mit dem dysplastischen Nävuszellnävus Syndrom, und dem damit stark erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Melanoms, verbunden zu sein scheinen [Berking et al. 2005]. Die Gene CDKN2A (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) und CDK4 (*Cyclin-dependent kinase 4*) sind in die nähere Betrachtung gerückt. CDKN2A auch p16, ein Gen für ein *Tumor Suppressor* Protein mit einer wichtigen Rolle bei der Zellzyklus Kontrolle und der Apoptose, ist relativ gut untersucht. Mutationen von p16 treten bei 25% der familiären Melanome auf [Hussusian et al. 1994]. CDK4 Mutationen dagegen wurden nur in wenigen familiären Melanomen gefunden [Zuo et al. 1996]. Allerdings konnte bisher weder für familiär auftretende noch spontane Melanome ein einziges verantwortliches Gen gefunden werden, das in einer Mehrzahl der Melanompatienten mutiert oder verändert exprimiert war [Bataille 2003]. Jedoch treten vermehrt Mutationen von N-Ras und p53 (10-20% aller Fälle) [Polsky und Cordon-Cardo 2003, Chudnovsky et al. 2005] und im BRAF-Gen auf (60%). Dieses hat einen Einfluss auf die RAS-RAF-ERK-MAP Signaltransduktion [Andersen et al. 2004]. Die Expression von endogenen retroviralen Sequenzen ist in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht worden.

Klinische Charakterisierung und Diagnose von malignen Melanomen

Die Eindringtiefe des Tumors beim malignen Melanom stellt den wesentlichen prognostischen Faktor dar. Da die Sterblichkeit nahezu linear mit der Eindringtiefe zunimmt, ist die frühe Erfassung des malignen Melanoms die derzeit effektivste Methode zur Senkung der Sterblichkeitsrate. Zur Metastasierung beim malignen Melanom gehören das Volumen des Tumors und die Berücksichtigung regionärer und sich ausbreitender Tumormetastasen. Zur Einordnung in die jeweilige Kategorie wird der vertikale Tumordurchmesser (Tumordicke) als entscheidender Parameter herangezogen [Balch et al. 2000, Balch et al. 2004]. Mikrometastasen werden nach der Biopsie der Sentinel (Wächter) Lymphknoten oder nach der vollständigen Entfernung ausgewählter Lymphknoten diagnostiziert. Die endgültige Diagnose erfolgt durch histologische Aufarbeitung des kompletten Primärtumors.

Stadieneinteilung nach dem American Joint Committee on Cancer [Balch et al. 2000]:

Stadium I	< 1mm	
	1 - 2mm	
Stadium II	2 - 4mm	
Stadium III	> 4mm	
	eine Lymphknotenmetastase	
	oder kutane Metastase zwischen	
	Primärtumor und	
	nächstgelegenen Lymphknoten	
Stadium IV	- alle oberen	
	- eine Lymphknotenmetastase	Mikrometastase
		Makrometastase
	- zwei bis drei	Mikrometastase
	Lymphknotenmetastasen	Makrometastase
	- 4 oder mehr	In-transit Metastase(n) ohne
	Lymphknotenmetastasen,	Lymphknotenmetastase
	Lymphknotenpakete,	entfernte Haut- oder
	Kombination von In-transit	Lymphknotenmetastasen
	Metastasen oder ulzerierte	
	Melanome und	
	Lymphknotenmetastasen	

Das maligne Melanom kann sowohl primär lymphogen, als auch primär hämatogen metastasieren. Eine Metastasierung kann praktisch in jedes Organ erfolgen. Etwa zwei Drittel aller ersten Metastasen sind jedoch zunächst auf das regionäre Lymphabflussgebiet beschränkt. Bei Fernmetastasen ist eine operative Entfernung bei solitären Metastasen an Leber, Lunge und Gehirns ratsam, da für adjuvante Therapieformen unter Umständen günstigere Voraussetzungen geschaffen werden. Sonstige Fernmetastasen, beispielsweise an der Haut, sollen nur dann chirurgisch entfernt werden, wenn durch ihre Entfernung eine Verbesserung der Lebensqualität der Patienten zu erwarten ist. Nach wie vor stellt die chirurgische Entfernung des Primärtumors die einzig potentiell erfolgreiche Behandlung dar, jedoch werden die Weite der Tumorentnahme und der prophylaktischen, regionalen Lymphknotenentfernung diskutiert. Die Entnahme der Wächter-Lymphknoten ist derzeit die effektivste Methode, um eine Ausbreitung des Melanoms in die regionalen Lymphknoten festzustellen.

Melanome im Stadium II und III haben das höchste Risiko einer Metastasierung. Das Ziel adjuvanter Therapieformen ist es, bei klinischer und radiologischer Tumorfreiheit, die Bildung von Metastasen zu verhindern. Zu den adjuvanten Therapien, welche Anwendung finden, gehören neben der Chemotherapie mit Dacarbacin oder einer Strahlentherapie (vor allem bei inoperablen oder mehrfach aufgetretenen Rückfällen), die Immuntherapie mit der Gabe von α -Interferon. In zahlreichen weltweiten Studien erscheinen die Vakzinierung mit dendritischen Zellen und gentherapeutische Verfahren als Erfolg versprechende adjuvante Therapieformen. Die Prognose kann mit Bestimmung der Tumordicke und der klinischen Stadieneinteilung gut beurteilt werden. Die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt bei Vorliegen von Satelliten und In-transit-Metastasen bei 25-40%, bei Vorliegen von regionären Lymphknotenmetastasen bei 15-30% und bei Vorliegen von Fernmetastasen ist die Prognose aussichtslos. Ohne Behandlung beträgt die Überlebenszeit durchschnittlich sechs Monate. Heute ist, trotz der zahlenmäßigen Zunahme, die generelle Prognose des Melanoms besser, da die Tumoren durch frühe Diagnose zum Zeitpunkt der Operation einen geringen Invasionsgrad aufweisen und somit besser heilbar sind [Rath et al. 2004].

2.5 Embryonale Stammzellen

Bis heute gibt es keine eindeutige Antwort auf die Frage: „Was genau ist eine Stammzelle?“. Die vorherrschende Definition lautet, dass Stammzellen ein theoretisch unlimitiertes Teilungspotential besitzen und ihre Tochterzellen eine irreversible terminale Differenzierung zu reifen Zellen durchführen können [Hall und Watt 1989]. Abhängig vom Differenzierungspotential werden Stammzellen als totipotent (Zygote), pluripotent (embryonale Stammzelle) oder multipotent (z.B. mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen) bezeichnet [Gage 2000]. Die Proliferation, die Migration, die Differenzierung und die Reifung von Stammzellen während der Embryonalentwicklung und der Aufrechterhaltung aller Zelllinien des adulten Organismus sind komplexe, hoch geordnete und streng regulierte Prozesse. Erstmals ist es auch beim Menschen möglich, die weitgehend unverstandenen, komplexen Prozesse der Gewebedifferenzierung und Organbildung *in vitro* zu studieren. Die Möglichkeit, pluripotente embryonale Stammzellen in Kultur zu halten, eröffnet neue Möglichkeiten medizinischer Forschung.

Murine embryonale Stammzellen (ES) wurden schon von ca. 25 Jahren beschrieben, als sie aus der inneren Zellmasse sich entwickelnder Blastozysten gewonnen wurden und es gelang sie *in vitro* zu kultivieren [Evans und Kaufmann 1981, Martin 1981]. *In vitro* konnten murine ES-Zellen in undifferenziertem Zustand aufrechterhalten und vermehrt werden, ohne dass sie ihr Potential, sich bei entsprechender Stimulation in alle somatischen Phänotypen zu differenzieren, verloren. Im folgenden wurden ES-Zellen von verschiedenen weiteren Spezies gewonnen, so dass heute ES Zelllinien von Nagern [Evans und Kaufmann 1981, Martin 1981, Doetschman et al. 1988, Innaconne et al. 1994], Kaninchen [Graves und Moreadith 1993] und Primaten [Thomson et al. 1996 und 1998a] erhältlich sind. Humane embryonale Stammzellen wurden schließlich erstmals 1998 isoliert [Thomson et al. 1998b], bis heute ist eine ständig wachsende Zahl an ES-Zelllinien verfügbar [Thomson et al. 1998b, Amit et al. 2000, Reubinoff et al. 2000, Richards et al. 2002, Hovatta et al. 2003, Mitalipova et al. 2003].

Murine ES-Zellen können in Kultur unendlich vermehrt werden, wenn sie auf so genannten Feederzellen (murine embryonale Fibroblasten, MEF) und/oder bei Zusatz von LIF (*leukemia inhibitory factor*) wachsen [Smith et al. 1987]. Auch wenn murine ES Zellen wertvolle Einblicke in die komplexen Prozesse der Gewebedifferenzierung und Organbildung geben, unterscheiden sie sich von humanen ES Zellkulturen. ES-Zellen sprechen nicht auf LIF an und benötigen daher die Kultivierung auf murinen Feederzellen (MEF) sowie die Zugabe von *basic fibroblast growth factor* [Thomson et al. 1998b, Amit et al. 2000, Reubinoff et al. 2000, Laslett et al. 2003]. Für therapeutische Ansätze ist es allerdings nicht möglich humane

ES-Zellen auf murinen Feederzellen oder mit Medium, welches tierische Bestandteile enthält, zu kultivieren, da das Risiko Pathogene zu übertragen nicht abschätzbar ist [Rippon und Bishop 2004]. Seit kurzem werden daher humane ES-Zellen auf humanen Feederzellen (HFF) und ohne jegliche tierische Produkte, wie Serum, kultiviert [Richards et al. 2002, Amit et al. 2003, Hovatta et al. 2003, Richards et al. 2003].

Verständlicherweise ist die Charakterisierung und *in vitro* Differenzierung von murinen ES-Zellen entsprechend weiter fortgeschritten als bei humanen ES-Zellen, aber die Differenzierung in Kardiomyozyten, mit der Expression gewebsspezifischer Marker, Strukturproteine und Rezeptoren [Wobus et al. 2001, Boheler et al. 2002], in Chondrozyten [Kramer et al. 2000], Adipozyten [Dani et al. 1997], endotheliale Zellen [Yamashita et al. 2000], aveolares Epithel [Ali et al. 2002], Hepatozyten [Chinzei et al. 2002, Kuai et al. 2003, Rambhatla et al. 2003], Inselzellen [Lumelsky et al. 2001, Kim et al. 2003] sowie in die neuronale Linie [Stavridis und Smith 2003] sind für murine sowie humane ES Zellen beschrieben worden. Bis jetzt beschränkt sich die Differenzierung zumeist auf adhärenzte Zellkultur, dennoch wird für die meisten therapeutischen Ansätze der Einsatz von differenzierten ES-Zellen in höher organisierten, dreidimensionalen Strukturen unerlässlich sein.

Auch wenn das Potential des ES-Zellen in der Medizin riesig ist, muss die Sicherheit der differenzierten ES-Zellen gewährleistet sein. So ist zur Zeit das Hauptproblem, dass die verwendeten Protokolle keine zu 100% ausdifferenzierten Zellen gewährleisten können. Das bedeutet, dass ein Teil der ES-Zellen als pluripotente Zellen in der Kultur verbleibt, was das Risiko der Bildung von Teratomen [Rippon und Bishop 2004] birgt. Alle bis heute durchgeführten Transplantationen mit differenzierten murinen ES-Zellen führten zu der Bildung von Teratomen [Wakitani et al. 2003, Teramoto et al. 2005, Fujikawa et al. 2005] und zur anschließenden Zerstörung des Transplantats bzw. des Organs. Diese Probleme könnten mit besseren Differenzierungsprotokollen und der anschließenden Reinigung der differenzierten Zellen gelöst werden. Zu diesen noch immer unzureichend verstandenen Mechanismen der Differenzierung von Stamm- und Progenitorzellen kommt die, ebenfalls noch unzureichend verstandene, Rolle der endogenen Retroviren. Normalerweise ist die Expression endogener retroviraler Sequenzen unterdrückt, jedoch können exogene Faktoren wie UV-Strahlung oder endogene Faktoren wie Zytokine oder Hormone die Expression dieser Sequenzen aktivieren [Ono et al. 1987, Hohenadl et al. 1999]. Differenzierungsprozesse embryonaler Stammzellen werden *in vivo* wie auch *in vitro* mit der Modulation der Zytokin- und Hormonmuster eingeleitet und gesteuert [Baylink 1983, Jaiswal et al. 1997, Pittenger et al. 1999, Soukas et al. 2001]. Die Auswirkungen von experimentell eingeleiteten

Differenzierungsprozessen auf die Expression von Nicht-Targetgenen, wie zum Beispiel endogene retrovirale Sequenzen, ist bis heute wenig untersucht. Für die osteogene Differenzierung *in vitro* ist die Aktivierung von HERV-K *gag*- und *env*-Sequenzen jedoch beschrieben [Carricasole et al. 2000]. Zudem weisen Untersuchungen darauf hin, dass retrovirale Sequenzen natürlicherweise während der Embryonalentwicklung exprimiert werden [Andersson et al. 2002]. Zahlreiche veränderte Gewebe, wie Tumorgewebe und insbesondere Teratokarzinome weisen die Expression endogener retroviraler Sequenzen und die Produktion von Viruspartikeln auf [Löwer et al. 1993, Armbrüster et al. 2002, Muster et al. 2003]. Neue Techniken wie die Chiptechnologie ermöglichen es, die Veränderungen während des Differenzierungsprozesses auch auf Expressionsebene einer Vielzahl interessanter Gene nachzuvollziehen.

Parallel zu der Abschätzung der Vor- und Nachteile embryonaler und adulter Stammzellen für die Grundlagenforschung und für den Gewebeersatz im Rahmen des Tissue Engineerings, muss die Sicherheit auch in Bezug auf die Expression potentiell tumorigener retroviraler Sequenzen gewährleistet sein.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Funktion der humanen endogenen Retroviren (HERVs) ist noch unklar. Aufgrund verschiedener Hinweise auf eine Assoziation der Expression von HERV-K und der Tumorenstehung stellt sich die Frage, ob virale Proteine, wie das transmembrane Hüllprotein, Rec oder Np9, bei der Tumorentstehung oder bei Metastasierungsprozessen involviert sind. Das transmembrane Hüllprotein zeigt in den Extrazellularraum und ist so dem Immunsystem zugänglich. Für Rec und Np9 wurden transformierende Eigenschaften nachgewiesen. Somit sind vor allem diese viralen Proteine und ihre exprimierte mRNA in dieser Arbeit von Bedeutung. Die Expression von HERV-K konnte in verschiedenen humanen Geweben und Zelllinien nachgewiesen werden und erfolgte sowohl für den Prototyp als auch für die Deletionsmutante von HERV-K. Der differenzierte Nachweis von Vollängentranskripten, wie auch für gespleißte mRNA und die entsprechenden Proteine konnten in verschiedenen Tumoren gezeigt werden. Sogar die Produktion von virusähnlichen Partikeln konnte für die Teratokarzinomzelllinie GH gezeigt werden. Erstmals wurde die Expression von mRNA und Proteinen in Geweben und Zelllinien maligner Melanome beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst Untersuchungen über die Expression der verschiedenen HERV-K mRNA Spezies in Melanomgeweben und Melanomzelllinien durchzuführen. Der Status der Expression von HERV-K in verschiedenen Stadien der Krankheit sollte so bestimmt werden. Zudem beschränken sich die meisten Nachweise von HERV-K auf den semiquantitativen Nachweis von Vollängen und gespleißter mRNA, daher sollte ein real-time PCR-System zum quantitativen Nachweis von HERV-K entwickelt werden, um eine Aussage über die Menge an exprimierter HERV-K mRNA treffen zu können.

Parallel sollte die Expression von HERV-K Proteinen in Melanompatienten direkt, in histologischen Schnitten von Melanomgeweben sowie indirekt, über im Serum vorhandene Antikörper gegen HERV-K Proteine, untersucht werden. Hierzu sollten das transmembrane Hüllprotein und das akzessorische Protein Np9 von HERV-K rekombinant hergestellt und spezifische Antiseren generiert werden.

Da eine Anwendung von embryonalen Stammzellen am Menschen in immer greifbarere Nähe rückt, sollte die Expression von HERV-K in Stammzellen und daraus differenzierten Zellen untersucht werden. Dies stellt zusätzliche Informationen zur Einschätzung der Risiken bei der Verwendung embryonaler Stammzellen dar.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Wenn nicht anders in den Protokollen aufgeführt, wurden alle verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Melanomgewebe

Alle verwendeten Melanomgewebe wurden von Dr. Trefzer und Dr. Hofmann von der Dermatologie der Charité, Berlin zur Verfügung gestellt (siehe Anhang Seite IV). Bei den hier verwendeten Gewebestücken handelt es sich ausschließlich um Melanommetastasen. Ein Teilstück der Metastasen wurde sofort nach der Entnahme eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2 Zellen und Medien

In der Dermatologie der Charité wurden aus Melanommetastasen Zelllinien etabliert und zur Verfügung gestellt (siehe Anhang Seite V). Des Weiteren wurden dort die Nicht-Melanomzelllinien kultiviert und als Kontrollen ebenfalls zur Verfügung gestellt: Jurkat (T-Lymphoblasten), HL60 (Promyeloblasten), A27/80, 7774 und SK70V3 (ovariale Karzinome), U87 (Astrozytome, Grad III), SW620 und SW480 (kolorectale Adenocarcinome), Hacat (Keratinozyten), 120/87 (Mammakarzinom), 257/85 (Magenkarzinom), K562 (Knochenmark, chronische myelogene Leukämie), Namalwa (B-Lymphocyten), D181/85 (Pancreas), EA14 (Gliom) und A431 NS (epidermales Karzinom), alle von der American Type Culture Collection (ATCC/LGC Promochem, Wesel, Deutschland, siehe Anhang Seite V).

Alle weiteren verwendeten Zelllinien wurden bei der European Collection of Cell Cultures (ECACC, UK), bei ATCC oder Cascade Biologics (über LGC Promochem) bestellt, die jeweiligen Katalognummern sind angegeben (siehe Tabelle 1).

Medien und Zusätze:

Die Medien DMEM 4,5g/L Glucose (Biochrom KG, Berlin, Deutschland), RPMI (Invitrogen, Karlsruhe Deutschland) und McCoy's 5A (Biochrom) wurden jeweils mit 10% (v/v) FBS (Biochrom) 2mM L-Glutamin (200mM; Biochrom), 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin (Penicillin 10000U/ml, Streptomycin 10mg/ml; Biochrom) und 15mM HEPES (1M; Biochrom) versetzt. Für SK-MEL 28 und SK-MEL-1 Zellen wurden 1,5g/l Natrium-Hydrogencarbonat anstelle von HEPES verwendet. Wie in Tabelle 1

angegeben wurden folgende weitere Zusätze verwendet: 1% (v/v) Non Essential Amino Acids (NEAA) und 1mM Natrium-Pyruvat (1M). Neonatale Melanozyten wurden mit Medium 154 (Cascade Biologics) und folgenden Zusätzen kultiviert: Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS; Cascade Biologics) und Penicillin, Streptomycin, & AmphotericinB (PSA; Cascade Biologics).

Des weiteren wurden PBS ohne Kalzium und Magnesium (Biochrom), Trypsin (0,25%) und Hygromycin (50mg/ml; beides Invitrogen) verwendet.

Zellen:

Tabelle 1: verwendete Zelllinien

Zellen	Zellart/Herkunft	Spezies	Medium	Zusätze
GH	Teratokarzinom-Zelllinie	human	DMEM	
293	embryonale Nierenzelllinie ATCC CRL-1573	human	DMEM	
MEWO	malignes Melanom ECACC 93082609	human	DMEM	NEAA
G-361	caucasian malignes Melanom ECACC 88030401	human	McCoy's 5A	
GR-M	caucasian Melanom ECACC 95032301	human	RPMI	
SK-MEL-28	malignes Melanom der Haut ATCC HTB-72	human	DMEM	Na-Pyruvat NEAA NaH ₂ PO ₄
SK-MEL-1	malignes Melanom der Haut ATCC HTB-67	human	DMEM	Na-Pyruvat NEAA Na ₂ HCO ₃
Melanom-Zelllinien	Dermatologie der Charité	human	RPMI	
HEMn-LP	neonatale epidermale Melanozyten Cascade Biologics C-002-5C	human	Medium 154	HMGS PSA

HEMn-DP	neonatale epidermale	human	Medium 154	HMGS
	Melanozyten			PSA
	Cascade Biologics C-202-5C			
LNCaP	Prostatakarzimum	human		
	ATCC CRL-1740			
MDBK	Nierenzelllinie	bovine	DMEM	NEAA
	ECACC 90050801			
PG4	Astrozytenzelllinie	felin	McCoys 5A	NEAA
	ECACC 94102703		oder DMEM	
3T3	Fibroblasten-Zelllinie	murin	DMEM	
	ATCC CCL-92			
PK15	Nierenzelllinie	porcin	DMEM	
	ATCC CCL-33			

3.2.3 Kulturbedingungen für immortalisierte Zelllinien

Das Wachstum von immortalisierten Zelllinien wird prinzipiell nur durch das Angebot an Platz und Nährstoffen limitiert. Daher müssen Zellen in Kultur in regelmäßigem Abstand (je nach Zelllinie alle 2-4 Tage) mit frischem Nährmedium versorgt und/oder verdünnt werden. Suspensionszellen (hier nur SK-MEL-1) können direkt verdünnt werden, adhärent wachsende Zellen dagegen, müssen dazu vom Untergrund gelöst werden. Dies kann entweder durch mechanische Methoden (Zellschaber) oder durch proteolytischen Verdau der Adhäsionsproteine durch Trypsin geschehen. Alle Zellkulturversuche fanden unter sterilen L3*** in dafür vorgesehen Sterilbänken (Kendro, Langensebold, Deutschland) mit laminarem Luftstrom statt. Sowohl Suspensionszellen als auch adhärent wachsenden Zellen wurden in Zellkulturflaschen (T25, T75 und T150 von TPP, Schweiz) mit den entsprechenden Medien kultiviert (siehe oben). Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium aus den Kulturflaschen komplett entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen von der Oberfläche wurden sie mit 3 bis 7ml Trypsin für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und durch die Zugabe der doppelten Menge serumhaltigen Mediums beendet. Die abgelösten Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt, die Suspension in Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 Minuten bei 500g zentrifugiert und das Pellet resuspendiert. Je nach Zellart wurde ein Zehntel bis ein Drittel der Zellsuspension mit frischem Vollmedium auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Suspensionszellen wurden zunächst bei 500g für 5min. pelletiert, dann in 10-20ml Vollmedium aufgenommen und die Zellen vereinzelt. Ein Drittel der Zellsuspension wurde

mit frischem Vollmedium auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Alle Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ im Brutschrank (Kendro) inkubiert.

3.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die langfristige Lagerung von Zellen über mehrere Jahre ist nur in flüssigem Stickstoff bei -196°C möglich. Um zu gewährleisten, dass möglichst wenige Zellen beim Einfrierprozess in Folge der Bildung von Eiskristallen im Zellinneren Schaden nehmen, müssen diese mit einem „Frostschutzmittel“ eingefroren werden. Die Zellen wurden in Suspension gebracht, vereinzelt (siehe 3.2.2) und bei 500g für 5 Minuten pelletiert. Bis zu 2×10^6 Zellen wurden in 1ml vorgekühltem FBS mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgenommen und in ein 2ml Kryogefäß überführt. Die Röhrchen wurden für einige Stunden bei -20°C eingefroren und dann in einer verschlossenen Styroporbox bei -80°C über Nacht gelagert. Nach einem Tag wurden die Zellen in einen Kryotank gegeben. So wird sichergestellt, dass der Einfrierprozess langsam abläuft und die Zellen geschont werden.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryogefäße im Wasserbad bei 37°C möglichst schnell aufgetaut und der Inhalt in eine Kulturflasche überführt, in die bereits warmes Vollmedium vorgelegt war.

3.2.5 Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl mit Trypanblau

Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch die Membran lebender Zellen zurückgehalten wird, tote Zellen mit poröser Zellmembran sind für den Farbstoff permeabel und färben sich blau. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer kann so die Gesamtzellzahl ermittelt und gleichzeitig die Zellen auf ihre Vitalität überprüft werden. Hierzu werden gleiche Volumina (20µl) Zellsuspension (siehe 3.2.2) und 0,4% Trypanblau-Lösung gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer rasch ausgezählt, da Trypanblau nach kurzer Zeit auch lebende Zellen anfärbt. Durch Auszählen der Zellen in allen vier Großquadranten kann die Zellzahl berechnet werden

3.2.6 Transfektion von Zellen

Für spätere Ansätze zur Kokultivierung wurden 293, PG4 und MDBK Zellen mit einem Selektionsmarker transformiert. Hierzu wurde der Vektor pHyEGFP (BD Biosciences Palo Alto, CA, USA) verwendet (siehe Anhang Seite XVIII). Hygromycin, wirkt auf die Proteinsynthese am 80s Ribosom und die optimale Konzentration liegt zwischen 255-1000µg/ml. Zunächst wurde die Konzentration an Selektionsreagenz ermittelt, bei welcher sensitive Zellen binnen einer Woche absterben. Hierzu wurden 60.000 Zellen/well in eine 6-well Platte gesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden 0, 150, 300, 450, 600 und 700µg/ml Hygromycin zugegeben und der Verlauf der Kultivierung die nächsten Tage unter dem Mikroskop kontrolliert.

Zur Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² in Zellkulturschalen ausgesät und bis zu 80% Konfluenz in Vollmedium kultiviert. Dann wurden

15ml serumfreies Medium zugegeben und die Zellen über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden pro Schale 24µg Vektor-DNA mit 1,5ml serum- und antibiotikafreiem Medium gemischt, parallel wurden 60µl des Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen) mit 1,5ml serum- und antibiotikafreiem Medium gemischt. Beides wurde 5min. bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend gemischt und nochmals 20min. inkubiert. Dann wurde das Gemisch gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Nach Inkubation für 24 Stunden im Brutschrank wurde das Medium durch Vollmedium ersetzt und die Zellen weitere 48 Stunden kultiviert. Zur Selektion wurden nun 500µg/ml Hygromycin in Vollmedium zugegeben und die Zellen weiter kultiviert. Die vollständige Selektion wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft.

3.2.7 Infektion von Zellen mit HERV-K

Infektion mit virushaltigem Überstand

Zur Infektion mit HERV-K wurden virusproduzierende Zellen (hier SK-MEL-28 und GH) in T150 Flaschen mit 100.000 Zellen/cm² ausgesät und drei Tage kultiviert. Das Medium wurde aus den Flaschen in Röhrchen überführt und bei 500g für 5min. pelletiert. Der so erhaltene zellfreie Überstand wurde durch einen 0,45µm Sterilfilter (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) filtriert und zu den zu infizierenden Zellen gegeben. PG4, MDBK und 3T3 wurden mit HERV-K Überstand infiziert. Der Versuch wurde jeweils ohne und mit 6µg/ml Polybrene durchgeführt. Nach Inkubation über Nacht wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht. Die Infektion erfolgte alle vier Tage bis zu zehn Mal in Folge. Anschließend wurden die Zellen weitere 14 Tage in Kultur gehalten und bei jeder Passage ein Aliquot zur Bestimmung der Provirusintergration genommen.

Infektion durch Kokultivierung

Die Infektion mittels Kokultivierung bietet den Vorteil, dass zwischen den Zellen Kontakte entstehen können, welche die Infektion erleichtern. Hierzu wurden virus-produzierende SK-MEL-28-Zellen zusammen mit den zu infizierenden Zellen PG4p/HygEGFP, MDBK/pHygEGFP und 293/pHygEGFP (siehe 3.2.5) kultiviert. Zur Kokultivierung wurden insgesamt 10.000 Zellen pro Flasche in den Verhältnissen 1:2, 1:1, 2:1 und 3:1 SK-MEL-28 zu PG4/pHYG, MDBK/pHYG bzw. 293/pHYG ausgesät. Die Kokultivierung erfolgte für 14 Tage in normaler Kultivierungsroutine. Anschließend wurde Selektions-medium, Vollmedium mit 500µg/ml Hygromycin, zugegeben, um die Hygromycin sensitiven SK-MEL-28-Zellen abzutöten. Die Zellen wurden eine weitere Woche kultiviert. Nach dieser Zeit sollten alle in der Kultur vorhandenen SK-MEL-28-Zellen abgetötet und ausverdünnt worden sein. Die Zellen wurden noch weitere 14 Tage in Kultur gehalten und bei jeder Passage ein Aliquot zur Bestimmung der Provirusintergration genommen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von RNA, DNA und Protein aus derselben Probe wurde TRI-Reagent von Sigma verwendet. Hierzu wurden kultivierte Zellen mit PBS gewaschen und dann direkt in einer ausreichenden Menge an TRI-Reagent suspendiert. Gewebeproben wurden zunächst in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zerkleinert und anschließend im Homogenisatorgefäß mit passendem Kolben (Wheaton, Millville, NJ, USA) in TRI-Reagent homogenisiert. Die Proben können in TRI-Reagent bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Zur Trennung der Phasen wurde 1/5 Volumen Chloroform zu den Proben gegeben und nach einer Inkubation für 15min. bei Raumtemperatur mit 12.000g bei 4°C für 15min. zentrifugiert. Es entstanden drei Phasen: die oberste, wässrige Phase enthielt RNA, die weiße Interphase DNA und die untere, organische Phase Protein.

Zur Aufreinigung der RNA aus der wässrigen Phase wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die wässrige Phase wurde abgenommen in ein neues Gefäß überführt und ab Schritt 4 den Angaben im Protokoll des RNeasy Mini Kits gefolgt. Der im Protokoll optional angegebene Verdau der DNA wurde bei allen Proben durchgeführt. Aufgereinigte RNA wurde mittels OD-Messung quantifiziert (siehe 3.3.3) und bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.2 DNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von DNA wurde der aus der RNA Aufreinigung verbleibende Rest TRI-Reagent verwendet. Die DNA wurde nach den Angaben des Herstellers mittels Ethanol ausgefällt und aufgereinigt. Im Anschluss wurde die DNA-Menge über Messung der optischen Dichte quantifiziert (siehe Kapitel 3.3.3) und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Proben, die nur zur Aufreinigung der DNA dienten, wurden nicht in TRI-Reagent aufgenommen, sondern mit Hilfe des QIAmp Blood Kit Mini (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

3.3.3 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung und die Bestimmung der Reinheit von Nukleinsäuren erfolgte über eine OD-Bestimmung (Photometer Eppendorf). Es wurde die OD bei 260nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) aufgenommen. Aus dem Verhältnis der OD-Werte von 260nm zu 280nm wurde die Proteinverunreinigung bestimmt. Die Proben sollten mindestens ein Verhältnis von 1 zu 1,4 aufweisen.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) liegt eine spezifische Bindung und Verlängerung zweier der zu amplifizierenden DNA oder cDNA komplementärer Oligonukleotide zugrunde. Diese Oligonukleotide (Primer) flankieren 5' und 3' den zu amplifizierenden DNA-Bereich und dienen als Start der DNA-Amplifikation. Mit Hilfe der PCR lassen sich spezifische DNA-Fragmente, ausgehend von sehr kleinen DNA-Mengen, durch diese zyklisch ablaufende Reaktion exponentiell vermehren (Mullis, et al., 1986). Zunächst wird die Doppelhelix der Ausgangs-DNA (Template) durch Erhitzen auf 95°C in ihre Einzelstränge aufgespalten. Im Anschluss hybridisieren die Primer durch Absenken der Reaktionstemperatur (auf ca. 45-65°C, abhängig von der Schmelztemperatur der Primer) komplementär mit je einem der beiden DNA-Stränge. Bei einer Reaktionstemperatur von 72°C werden die Primer am 3'-OH-Ende in der anschließenden DNA-Synthese durch die thermostabile Taq-Polymerase gemäß des Matrizenstranges verlängert, wobei die Syntheserichtungen der beiden Primer gegeneinander gerichtet sind. Diese drei Schritte - Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer und DNA-Synthese - stellen einen PCR-Zyklus dar. Durch Wiederholung der Zyklen wird theoretisch eine exponentielle Amplifikation des durch die Primer flankierten DNA-Abschnitts erzielt. So kann eine spezifische Sequenz amplifiziert werden.

Ein typischer PCR-Ansatz ist im Folgenden aufgeführt:

- bis zu 300ng genomische DNA
 - 2µl 10x PCR-Puffer (Roche, Mannheim, Deutschland)
 - 250nM forward Primer (Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland)
 - 250nM reverse Primer (Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland)
 - 10nmol dNTP-Mix (10mM each; Peqlab, Erlangen, Deutschland)
 - 1-5U Ampli-Taq-Gold DNA-Polymerase (Roche, Mannheim, Deutschland)
- add 20µl ddH₂O

Da eine einfache Taq-Polymerase schon bei der Vorbereitung der PCR zu unspezifischen Amplifikaten führen kann, wurde ein hot-start Enzym (Hot-Star-Taq-Polymerase) benutzt.

3.3.5 one-step Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die one-step Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction (reverse Polymerase Kettenreaktion) kombiniert die Umschreibung von RNA (siehe 3.3.4) zu cDNA und die anschließende PCR im Einsatz mit genspezifischen Primern. Zunächst fand das Umschreiben der eingesetzten RNA in cDNA bei 45°C für 30min. statt. Dem folgte für 5min. bei 94°C die Inaktivierung der Reversen Transkriptase und gleichzeitige Aktivierung der Taq DNA Polymerase. Im Anschluss wurde eine konventionelle PCR (siehe 3.3.5) mit 35 Zyklen durchgeführt. Es wurde der SuperScript™ One-Step RT-PCR System mit Platinum® Taq DNA Polymerase Kit von Invitrogen verwendet.

Ein typischer RT-PCR Ansatz ist im Folgenden aufgeführt:

- 100ng gesamt RNA
 - 10µl 2x Reaktions-Puffer (0,2mM je dNTP und 1,2mM MgSO₄ Endkonzentration)
 - 250nM forward Primer (Sigma-Genosys)
 - 250nM reverse Primer (Sigma-Genosys)
 - 0,5µl SuperScript™ Reverse Transkriptase/Platinum® Taq DNA Polymerase Mix
- add 20µl ddH₂O

3.3.6 Agarosegelelektrophorese von DNA

Agarosegele wurden zur größenspezifischen Auftrennung von DNA-Fragmenten, z.B. nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau verwendet. Dabei läuft die negativ geladene DNA im elektrischen Feld Richtung Anode durch ein grobmaschiges Netz aus Zuckerpolymeren. Die ideale Laufbedingung beträgt dabei 5Volt/cm. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 1-2% (w/v) Agarosegele verwendet. Als Größenstandard diente ein kommerziell erhältlicher DNA-Standard (Invitrogen). Die DNA wurde durch einen interkalierenden, UV-detektierbaren Farbstoff (0,5µg/ml Ethidiumbromid) markiert und unter UV-Licht (302nm) fotografisch dokumentiert, hierbei können Banden ab ca. 20ng visuell wahrgenommen werden.

3.3.7 Reverse Transkriptase real-time PCR

Die real-time PCR ist eine Methode zur gleichzeitigen, spezifischen Amplifikation und Detektion von DNA [Higuchi, et al. 1992] und ermöglicht es, die PCR-Reaktion in allen Zyklen zu verfolgen. Die eigentliche Reaktion verläuft wie bei der konventionellen, semiquantitativen PCR, dem Reaktionsansatz wird aber zusätzlich eine fluoreszenz-markierte Hybridisierungssonde (TaqMan PCR) oder ein DNA-interkalierender Farbstoff zugesetzt. Anfangs wurde der DNA-Interkalator Ethidiumbromid in den PCR-Ansatz integriert, später wurde es durch das weniger giftige und sensitivere SYBR Green® ersetzt. Über eine optische Einheit wird bei beiden Methoden die Fluoreszenz in jedem Zyklus der PCR-Reaktion bestimmt.

Moderne real-time PCR-Verfahren verwenden amplifikatspezifische, fluoreszenz-markierte Sonden. So wird die Signalspezifität erhöht, weil das Signal sowohl von der Bindung von zwei spezifischen Primern, als auch von der Bindung der spezifischen Sonde abhängt. Die Sonde ist ein Oligonucleotid an dessen 5'-Ende ein Reporter- Fluoreszenz-Farbstoff und an dessen 3'-Ende ein Quencher-Farbstoff konjugiert sind. Bei einer intakten Sonde wird durch den geringen Abstand (Förster-Radius) zwischen Quencher und Reporter die Fluoreszenz des Reporters durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) unterdrückt. Während der Elongationphase der PCR trifft die Taq-DNA-Polymerase auf das 5'-Ende der Sonde und der Reporter wird über die 5'-3'-Exonuclease der Polymerase von der Sonde abgespalten, der

Abstand von Quencher und Reporter wird zu groß um die UV-Anregung des Reporters zu unterdrücken und detektierbares Licht wird vom Reporter emittiert [Lee et al. 1993]. Die Real-time PCR ermöglicht im Gegensatz zur Standard-PCR einen quantitativen Vergleich der Amplifikate aus zwei Proben und hat einen weiteren, dynamischen Messbereich. Für die real-time PCR wurde der MX4000-Cycler von Stratagene verwendet.

Zur quantitativen Bestimmung mittels real-time PCR wurde ebenfalls eine Reverse Transkriptase PCR verwendet (Invitrogen), um die Variabilität durch die cDNA-Synthese so gering wie möglich zu halten. Zunächst wurden die optimalen Reaktionsbedingungen der Reaktion mit 20ng RNA der positiven Kontrolle GH bestimmt. Hierfür wurde als erstes die Sonde zwischen 300nM und 50nM verdünnt. In einem zweiten Schritt wurden die Primer zwischen 500nM und 100nM verdünnt und bei zwei verschiedenen MgSO_4 -Konzentrationen (3mM und 5mM) verglichen.

Hieraus ergab sich der folgende optimale Reaktionsansatz:

- 20ng RNA Template
 - 10 μ l 2x Reaktionspuffer (0,2mM je dNTP und 3mM MgSO_4 Endkonzentration)
 - 0,5 μ l ROX Referenz Farbstoff
 - 250nM forward Primer (Sigma-Genosys)
 - 250nM reverse Primer (Sigma-Genosys)
 - 200nM Sonde (Sigma-Genosys)
- add 20 μ l ddH₂O

Alle Ansätze wurden in mindestens drei Replikaten gemessen mit einer Laufzeit von 45 Zyklen, die Daten einer PCR wurden in jeden Zyklus bei der Annealingtemperatur aufgenommen.

Auswertung der real-time RT-PCR

Die Analyse der real-time RT-PCR erfolgt digital über die während der RT-PCR aufgenommenen Daten durchgeführt und nicht über eine Gelanalyse. Die Auswertung erfolgte über den Threshold Cycle (C_T). Dieser gibt den Zyklus der PCR an, in dem die Fluoreszenz einer Probe das erste Mal deutlich über der Hintergrundfluoreszenz (Schwellenwert) liegt. Hierbei gilt, je mehr Zielgen in der Probe vorhanden ist, desto kleiner ist der C_T -Wert.

Die Effizienz der Reaktion bei optimalen Bedingungen kann über die Steigung der Geraden der C_T -Werte bei definierten Verdünnungen bestimmt werden (Stratagene Application Note #10). Für akkurate und reproduzierbare Daten sollte die Effizienz nahe bei 100% liegen, d.h. die Template-DNA wird mit jedem Zyklus verdoppelt. Hierfür wurde die GH-RNA seriell zwischen 40ng und 0ng verdünnt und die Effizienz der einzelnen Primer bestimmt.

Für die Berechnung der Effizienz gilt:

$$\text{Exponentielle Amplifikation} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

und

$$\text{Effizienz } E = [10^{(-1/\text{Steigung})}] - 1$$

Die weitere Auswertung erfolgte nach Modifikation der von K.Livak beschriebenen $\Delta\Delta C_T$ -Methode [Livak 1997]. Statt der beschriebenen Abgleichung der Proben auf ein Haushaltsgen wurden für jeden Ansatz 50ng Gesamt-RNA verwendet. Für die einzelnen Proben wird dann die Expression relativ zu einem Kalibrator bestimmt. Als Kalibrator wurde GH- oder SK-MEL-28-RNA verwendet. Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate sowie die Bestimmung der relativen Expression von HERV-K wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm Microsoft Excel durchgeführt.

Es gilt:

$$\text{relative Expression} = (1+E)^{-\Delta C_T}$$

und
$$\Delta C_T = C_{T \text{ Probe}} - C_{T \text{ Kalibrator}}$$

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Protein-Aufreinigung

Zur Protein-Aufreinigung wurde der verbleibende Überstand TRI-Reagent aus der DNA Isolation eingesetzt. Hieraus wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers die Proteine mit Isopropanol ausgefällt und aufgereinigt. Proteine wurden in 1% SDS bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Des Weiteren wurde aus kultivierten Zellen Gesamtzellprotein direkt im Lysat verwendet. Hierzu wurden abgelöste Zellen mit PBS gewaschen, pelletiert und in RIPA-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubation für 15min. auf Eis wurden unlösliche Bestandteile mit 10.000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Gefäß überführt und bei -20°C bis zu weiteren Verwendung gelagert.

RIPA-Puffer (pH 7,5)
25mM Tris-HCl
150mM NaCl
0,5% Natriumdeoxycholat
0,1% SDS
2% Tween

3.4.2 Quantifizierung von Proteinen

Bradford-Assay

Der Assay nutzt eine erstmals von Bradford et al. beschriebene Methode, die auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums bei Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine basiert. Da der Extinktionskoeffizient über weite Konzentrationsbereiche konstant bleibt, kann mit Hilfe des Lambert Beerschen Gesetzes:

$$E = \varepsilon * c * d$$

wobei E die Extinktion, ε der Extinktionsfaktor, c die Konzentration und d die Schichtdicke ist, die Konzentration der Proteinlösung photometrisch bestimmt werden.

Das Bradfordreagenz befindet sich vor der Reaktion mit Proteinen in der protonierten, roten kationisierten Form, bei Bindung von Protein wird die blaue anionische Form stabilisiert, welche dann photometrisch detektiert werden kann. Da zu hohe Konzentrationen an Detergenzien jedoch die grüne neutrale Form des Bradfordreagenz stabilisieren, konnte diese Methode für die Proteinlösungen in 1% SDS nicht angewendet werden.

BCA-Protein Assay

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben in 1% SDS wurde der BCA Protein Assay von Pierce (Bonn, Deutschland) herangezogen. Diese Methode verbindet die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} in alkalischer Umgebung durch Proteine (Biuret-Reaktion) und die selektive colorimetrische Quantifizierung von Cu^{1+} durch die Reaktion mit Bicinchinonischer Säure. Zuerst wurde die Gebrauchslösung hergestellt, hierfür wurden 50 Teile Reagenz A mit einem Teil Reagenz B gemischt. Von der Gebrauchslösung wurden 200 μl pro Well einer 96-well Platte vorgelegt und anschließend 10 μl Probe, Standard oder Wasser zugegeben. Die Platte wurde für 30min. bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben im Elisa Reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 570nm gegen eine Referenz von 492nm vermessen und die Proteinkonzentration im Vergleich zur Eichgeraden des BSA-Standards bestimmt.

Als Standard für die Quantifizierung wurde BSA in Konzentrationen von 200, 400, 600, 800, 1000 und 1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. Es wurden bei beiden Methoden jeweils Dreifachbestimmungen angefertigt.

3.4.3 SDS-Page

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamide-Gelelektrophorese) ist eine überwiegend analytisch genutzte Methode zur massenabhängigen Auftrennung von Proteinen [Laemmli et al., 1970]. Dabei wandern SDS-beladene, weitgehend entfaltete Proteine durch ein Polyacrylamidgel, angetrieben durch ein angelegtes, elektrisches Feld. Die gleichmäßige Beladung mit dem anionischen Detergenz SDS, welches als Mizelle um das Protein die Ladungen abschirmt, ermöglicht eine massenabhängige Auftrennung der Proteine. Die Proteinproben (E.coli-Lysate, Zell-Lysate, aufgereinigte Proteine, etc.) wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5-10min. bei 95°C inkubiert. Die SDS-PAGE bestand aus einem 4% Sammelgel und einem 10% Trenngel nach Schagger und von Jagow, 1987. Ein kommerzieller, vorgefärbter Größenstandard (Seeblue Plus II, Invitrogen) wurde mitgeführt. An das Gel im Mighty Small II System (Hoefer, San Francisco, CA, USA) wurde ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 130V angelegt.

Die Gele wurden mittels Elektroblot auf eine Membran übertragen (siehe Kapitel 3.5.3 Seite 42) oder direkt für 1h bei Raumtemperatur mit Coomassie Blue G250 (Biorad, München, Deutschland) gefärbt und im Anschluss, um nicht komplexierten Farbstoff zu entfernen, 4h bei Raumtemperatur mit Entfärbelösung entfärbt.

Kathodenpuffer (pH 8,25)

0,1M Tris

0,1M Tricin

0,1% (w/v) SDS

Anodenpuffer (pH 8,9)

0,2M Tris

Gelpuffer (pH 8,4)

0,1M Tris

0,3% (w/v) SDS

Probenpuffer (2x):

50mM Tris

12% (v/v) Glycerin

4% (w/v) SDS

5% (v/v) β -Mercaptoethanol

0,01% (w/v) Coomassie Blue G250

Entfärber-Lösung

10%(v/v) Essigsäure

25%(v/v) Methanol

in ddH₂O**3.4.4 Klonierung, Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen**Restriktionsverdau mit Endonukleasen

Zunächst wurde die dem Protein entsprechende DNA-Sequenz mittels PCR und spezifischen Primern zum Einführen von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen amplifiziert. Restriktionsendonukleasen liegen als Homodimere vor und katalysieren ATP-abhängig die sequenzspezifische Spaltung der kovalenten Phosphat-Zuckerbindung in der DNA-Doppelhelix. Die Erkennungssequenz dieser Enzyme kann 4-8 Nukleotide lang sein und ist im Regelfall palindromisch aufgebaut. Die Aufspaltung der DNA-Doppelhelix erfolgt meist innerhalb der Erkennungssequenz und kann sowohl glatte Enden (*blunt ends*) als auch überhängende Ende (*sticky ends*) ergeben. Die Auswahl der verwendeten Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland) und des zugehörigen Reaktionspuffer (New England Biolabs) erfolgte in Abhängigkeit vom Zielvektor und dem einzubringenden DNA-Fragment (*Insert*).

Bei Doppelverdauansätzen wurde nach Angaben des Herstellers ein für beide Enzyme geeigneter Puffer verwendet, oder, bei Pufferinkompatibilität, ein sequentieller Verdau durchgeführt.

Ein typischer Reaktionsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

- 100ng-2 μ g Plasmid-DNA oder PCR-Amplifikat
 - 2 μ l 10x Reaktionspuffer (New England Biolabs)
 - 2 μ l 10x BSA (New England Biolabs)
 - 2-5units Enzym 1 (New England Biolabs)
 - 2-5units Enzym 2 (New England Biolabs)
- add 20 μ l ddH₂O

Die Reaktion erfolgte in der Regel bei 37°C (abhängig vom Temperaturoptimum der verwendeten Enzyme) für zwei Stunden

Dephosphorylierung mit SAP

Um eine Religation von einfach geschnittenen Vektorfragmenten zu unterbinden, wurden geöffnete Vektorfragmente mit der SAP (*shrimp alkalische Phosphatase*) am 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu musste die DNA zunächst mit einem PCR-Purification-Kit (Qiagen, siehe unten) aus dem Restriktionspuffer in ddH₂O überführt werden.

Ein typischer Reaktionsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

- 4µl 10x Reaktionspuffer RX (New England Biolabs)
- 5U SAP (New England Biolabs)
- add 40µl ddH₂O

Die Reaktion erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Im Anschluss wurde die SAP durch Erhitzen auf 65°C für 30min. inaktiviert.

Plasmid-DNA-Präparation

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E.coli wurden kommerzielle Kits auf der Basis der Anionentauscher-Säulenchromatographie verwendet (Genomed Jetstar Maxi/Mini Plasmid Purification System, Genomed, Löhne, Deutschland).

Aufreinigung von linearen DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen oder aus dem PCR-Reaktionsmix wurden kommerzielle Kits auf der Basis der Anionentauscher-Säulenchromatographie verwendet (Genomed, Gel Extraction Kit und Genomed, PCR Purification Kit). Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Ligation

DNA-Ligasen katalysieren ATP-abhängig die Bildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen einem freien 5'-Phosphat- und einem freien 3'-OH-Ende von DNA-Molekülen. Restriktionsverdaute DNA-Fragmente wurden mit passend dazu geschnittenen Vektoren in einer Ligation fusioniert. Ligationsansätze wurden bei 16°C, 8-16h inkubiert, um eine möglichst große Reaktionseffizienz zu gewährleisten.

Ein typischer Ligationsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

- 100-200ng Vektor-DNA
- 300-600ng Insert-DNA
- 2µl 10x T4-Ligase-Puffer (New England Biolabs)
- 1-5units T4 Ligase (New England Biolabs)
- add 20µl ddH₂O

TOPO® TA Klonierung zur Sequenzierung von PCR Fragmenten

Zur Analyse der Produkte der RT-PCR wurden diese mit Hilfe des TOPO® Kits von Invitrogen kloniert. Hierbei wurden die PCR-Produkte über die von der Taq-Polymerase unspezifisch angehängten Adenosinreste in mit Hilfe der Topoisomerase in den pCR4-TOPO Vektor (siehe Anhang Seite XVIII) mit überhängenden Thymidinresten kloniert. Die PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel aufgereinigt (siehe Seite 31) oder direkt in die Klonierungsreaktion eingesetzt.

Ein Ansatz ist im Folgenden aufgeführt:

- 0,5-4µl PCR-Produkt
- 1µl Salzlösung
- 1µl Vektor pCR®4- TOPO
- add 6µl ddH₂O

Die Ligation wird von der am Vektor anhängenden Topoisomerase durchgeführt und hat den Vorteil, dass sie im Gegensatz zur Ligation mit T4-DNA-Ligase innerhalb von fünf Minuten bei Raumtemperatur abgeschlossen ist und direkt für eine Bakterien-Transformation verwendet werden kann.

Transformation

Bakterien:

Top10 F' (Stratagene): *E. coli* (F'(lacIq, Tn10(TetR)) mcrA Δ(mrrhsdRMS-mcrBC) Φ80

lacZΔm15 ΔlacX74 deoR recA1 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1nupG)

BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene): *E. coli* B F- ompThsdS(rB- mB) dcm+ Tetr gal

λ(DE3) endA Hte (argU proL Camr)

Als Transformation wird das Einbringen von Plasmid-DNA in elektro- oder chemokompetente Bakterien und Hefen bezeichnet (Cohen et al. 1972). Chemokompetente *E. coli* Top10 F' und BL21-CodonPlus(DE3)-RP wurden nach den Angaben im QIAexpressionist (Qiagen, 5. Auflage, 2002, S.39f) generiert und in 100µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

Bei einer Transformation wurden 10µl Ligationsansatz (siehe oben) oder 100ng gereinigte Plasmid-DNA zu einem auf Eis aufgetauten 100µl Bakterien-Aliquot gegeben. Der Ansatz wurde durchmischt und 30min. auf Eis inkubiert. Durch Erhitzen auf 42°C wurde für 45s ein Hitzeschock durchgeführt, wodurch sich Poren in der Bakterienwand bilden, durch die die DNA aufgenommen wird. Im Anschluss wurde der Ansatz für 3min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500µl LB-Medium (ohne Zusatz von Antibiotika) wurde der Ansatz 30min. bei 37°C geschüttelt, so dass die über das eingebrachte Plasmid vermittelte Resistenz ausgebildet werden konnte. Die Bakterien wurden bei 2.000g 2min. pelletiert und in 100µl Medium aufgenommen. 50-100µl Bakteriensuspension wurden auf einer LB-Agar-Platte mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und 16h bei 37°C inkubiert.

LB-Medium: 1% (w/v) Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
1% (w/v) NaCl

Antibiotika: Ampicillin (100µg/ml Endkonzentration)

Sequenzierung

Um sicher zu stellen, dass eingebrachte DNA-Fragmente sich im richtigen Leseraster und in vollständiger Länge im Vektor befinden wurde die DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. [1977] zur Überprüfung verwendet. Die moderne DNA-Sequenzierung nutzt die PCR, wobei neben den Desoxy-Nuklosidtriphosphaten (dNTP) auch Didesoxy-Nuklosidtriphosphate (ddNTP) im Reaktionsmix eingesetzt werden. Bei dem verwendeten DNA Sequenzierungsprotokoll wurden markierte ddNTPs im ABI BigDye 3.1-Mastermix (ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Ein typischer Sequenzierungsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

- 1ng-3µg Template-DNA (PCR-Produkte: 1-20ng, Plasmide: 150ng-3µg)
- 5pmol Primer
- 2µl BigDye-Mastermix
- 1µl 5xPuffer (ABI)
- add 10µl ddH₂O

Zur Auswertung wurde der im Haus bereitgestellte Sequenzierservice mit dem ABI Lycor 3200-Sequencer genutzt.

Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Proteine können rekombinant hergestellt werden, hierzu gibt es verschiedene kommerziell erhältliche Systeme mit aufeinander abgestimmten Expressionsvektor, Bakterien-Expressionsstamm und Aufreinigungssystem. Hier wurde das pMAL-System von New England Biolabs (New England Biolabs) für das HERV-K Transmembranprotein verwendet. Das 42kDa große Maltose-Bindeprotein wurde als Fusionsprotein mit dem Transmembranprotein exprimiert und kann über eine Affinitätschromatographie mit Amylose aufgereinigt werden. Für das kleinere HERV-K Rec Protein dagegen wurde das pCAL-n System von Stratagene verwendet. Hier wurde ein 4kD großes Calmodulin-Bindeprotein als Fusionsprotein mit dem Rec Protein exprimiert (siehe Anhang Seite XVI und XVII).

Für die Expression von rekombinanten Proteinen wurden chemokompetente *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) verwendet.

IPTG-induzierte Expression

Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG) ist ein Galaktoseanalogon und wirkt genau wie dieses als Aktivator der lac-Promotor-abhängigen Transkription von nachgeschalteten Genen. Im Wildtyp *E. coli* wird so ein Umschalten zwischen der Verwertung der Substrate Glucose und Galaktose ermöglicht. Viele kommerziell erwerbliche Expressionsplasmide tragen diesen Promotor, so dass die Transkription des eingebrachten Gens und die nachfolgende Proteinproduktion gezielt durch Zugabe des Pseudosubstrates IPTG von außen eingeleitet werden kann. Von den verwendeten *E. coli* BL21 wurde über Nacht eine frische 5ml LB-Kultur mit Selektionsantibiotikum angesetzt. Am nächsten Tag wurden Expressionskulturen (1000ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum, für Expressionen mit dem pMAL System zusätzlich 2g/l Glukose) mit der Vorkultur angeimpft. Die Expressionskultur wurde bei 225rpm und 37°C bis geschüttelt bis eine optische Dichte von 0,8 bei einer Wellenlänge von 600nm erreicht war. Durch Zugabe von 1mM (Endkonzentration) IPTG wurde die Expression der rekombinanten Gene induziert. Nach 3h Inkubation bei 225rpm und 37°C wurden die Bakterien bei 6000g pelletiert. Das Bakterienpellet wurde bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

Aufschluß der Bakterien

Der Aufschluss der stabilen Wand von gram-negativen Bakterien (hier *E. coli*) kann sowohl mit mechanischem (Ultraschall, Branson Sonifer 250), als auch mit enzymatischen (Lysozym) Methoden erfolgen [Jolles et al. 1969]. Ein eingefrorenes Bakterienpellet aus 1000ml Kulturvolumen wurde in 50ml Säulenpuffer aufgenommen, resuspendiert und mit einer Ultraschallsonde lysiert. Ungelöste Bakterienbestandteile wurden durch Zentrifugation mit 10.000g für 30min. bei Raumtemperatur abgetrennt. Der Überstand wurde affinitätschromatographisch gereinigt. Das eluierte Fusionsprotein wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4.5 Test zur Aktivität von Reverser Transkriptase

Zur Bestimmung von Aktivität Reverser Transkriptasen in Zellkulturüberständen wurden der kommerzielle HS-kit Mg²⁺ RT von Cavid (Cavid Tech AB, Upsala, Schweden) verwendet. Es wurde nach dem über Nacht-Protokoll des Herstellers verfahren.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Herstellung von Immunsereen in der Ziege

Die Ziegen wurden in der Tierversuchsanstalt, Berlin-Marienfelde (BfR) gehalten. 500µg Antigen wurde am Tag der Immunisierung in PBS aufgenommen und 1:1 mit öligem Adjuvant (Incomplete Freund's Adjuvant, Pierce) gemischt. Durch mehrfaches Suspendieren durch eine Kanüle (Ø0,6mm, BD, Heidelberg, Deutschland) erhielt das Antigen-Adjuvant-Gemisch eine halb feste, sahnige Konsistenz. Die Immunisierung erfolgte durch intramuskuläre Injektion des Gemisches, in der Regel wurde je 1ml in die Muskulatur beider Oberschenkel injiziert. Drei und sechs Wochen nach der Immunisierung (Prime) erfolgte der Boost mit dem gleichen Immunogen-Adjuvant-Gemisch und nach dem gleichen Applikationsschema. Drei Wochen nach jeder Immunisierung (vor jedem Boost) wurde den Ziegen Blut abgenommen (ca. 50ml) und bei 4°C über Nacht gelagert. Das entstandene Koagulat wurde am nächsten Tag bei 16.000g und 4°C 30min. pelletiert. Der Serumüberstand wurde abgenommen und das Koagulat verworfen. Die Lagerung der Seren erfolgte bei -20°C.

Ein Teil der Antikörper wurde aufgereinigt, hierzu wurden Protein-G-Säulen (Montage Antibody Purification Kit, Millipore, Schwalbach, Deutschland) verwendet, um speziell IgG-Antikörper aus dem Immunsereum aufzureinigen. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Des weiteren wurden gp36 spezifische Antikörper affinität-chromatographisch aufgereinigt. Hierzu wurden 0,5g Sepharose in 100ml 1mM HCl resuspendiert und für 15min. gewaschen. 8mg rekombinantes gp36-Protein wurde gegen Kopplungspuffer über Nacht dialysiert und dann zur Sepharose gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C über Kopf geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde mit fünf Volumen Kopplungspuffer gewaschen und danach verbliebene aktive Gruppen mit 0,1M Tris-HCl (pH 8,0) für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Zuletzt wurde dreimal abwechselnd mit Puffer 1 und Puffer 2 gewaschen und mit der gp36-Sepharose anschließend eine Säule gepackt. Die Säule wurde mit 3 Volumen PBS gewaschen. Über Nacht wurde bei 4°C 15ml von Ziegensereum 26 über die Säule gepumpt und am nächsten Morgen ungebundenes Material mit 10 Volumen PBS gewaschen. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte in 1ml Fraktionen mit Elutionspuffer in 200µl 2M Tris. Die Säule wurde anschließend durch dreimal abwechselndes Waschen mit Puffer 1 und Puffer 2 regeneriert.

Puffer 1

0,1M Tris HCl (pH 8,0)
0,5M NaCl

Kopplungspuffer

0,1M NaHCO₃ (pH 8.3)
0,5M NaCl

Puffer 2

0,1M Acetat (pH 4,0)
0,5M NaCl

Elutionspuffer (pH 2,5)

0,05M Glycine-HCl
0,5m NaCl; 100µg/ml PMSF

3.5.2 Epitop-Kartierung mit einer Pepspot®-Membran

Die Pepspot-Membran (Jerini, Berlin, Deutschland) ermöglicht die schnelle Eingrenzung von antikörper- und serumspezifischen Epitopen auf einem bekannten Antigen. Dazu wurde eine Peptidbank aus 15 Aminosäuren langen Peptiden hergestellt, die um je 13 Aminosäuren überlappen, d.h. die Aminosäuresequenz der Peptide verschiebt sich von Peptid zu Peptid zwei Aminosäuren Richtung C-Terminus. Die Peptide wurden kovalent über den C-Terminus an eine Nitrozellulose-Membran gekoppelt. Die verwendeten Membranen umfassen die gesamte Aminosäuresequenz des Rec Proteins bzw. des transmembranen Hüllproteins von HERV-K. Die Inkubation mit dem zu testenden Serum erfolgte nach Angaben der Herstellerfirma, wobei die Verdünnung von Primär- und Sekundärantikörpern optimiert werden musste (siehe 3.5.2). Die Epitope des Serums ergeben sich aus der bei allen positiv reagierenden, aufeinander folgenden Peptid-Spots auftretenden Sequenz.

3.5.3 Westernblot mit Immunsereen

Die Westernblot Analyse ist eine immunoanalytische Methode zur Detektion von Proteinen auf einer Trägermembran mit spezifischen Antikörpern [Towbin et al. 1989]. Beim verwendeten *Semidry-Elektroblotting*-Verfahren (Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell, Biorad) wurden die Proteine nach der Auftrennung in der SDS-PAGE durch ein senkrecht zum Gel orientiertes elektrisches Feld (10-15V für 60min.) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, 0,2µm Poren von Millipore, Billerica, MA, USA) transferiert. Bindungsstellen auf der Membran, die nicht durch Proteine besetzt waren, wurden durch einstündige Inkubation der Membran in einer 5%igen Magermilch-Lösung in Waschpuffer blockiert. Die blockierte Membran wurde mit dem primären Antikörper (bzw. dem primären Antiserum, Verdünnung von 1:50 bis 1:20000, siehe 3.5.2) über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (je 10min.) entfernt. Die Membran wurde dann für 2h bei Raumtemperatur mit einem spezie-spezifischen, Peroxidase (POD)-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte entweder nach der ECL-Methode (Enhanced Chemiluminiszenz) und einem Röntgenfilm (beides Pierce) oder mit einer 3,3'-Diaminobenzidin-Substratlösung (DAB) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (beides Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Bei ECL detektierten Membranen konnte der Blot weiter verwendet werden, hierzu mussten jedoch die gebundenen Antikörper abgelöst werden. Die Membran wurde kurz gewaschen und dann in Strippingpuffer bei 50-65°C für 30-90min. inkubiert. Abschließend wurde noch zweimal gewaschen und die Membran konnte erneut blockiert und mit Antikörpern inkubiert werden.

Für den Westernblot mit Proteinen aus normalen Geweben wurde der kommerzielle WesternBlot VI von US Biological (Swampscott, MA, USA) verwendet.

Transferpuffer (pH 9,2)

48mM Tris

39mM Glycin

20% (v/v) Methanol

0,0375% (w/v) SDS

Waschpuffer (pH 7,3)

50mM Tris

150mM NaCl

0,5% (v/v) Tween-20

0,2% (w/v) Bovines Serum Albumin

Blockierungspuffer (pH 7,4)

Waschpuffer

5% (w/v) Magermilchpulver

Substratlösung (pH 8,0)

0,025 Tris-HCl

Spatelspitze Diaminobenzidin

Stripping-Puffer (pH 6,8)

62,5mM Tris-HCl

2% (w/v) SDS,

100mM β -Mercaptoethanol,**3.5.4 Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie ermöglicht die spezifische Detektion von Proteinen auf der Oberfläche und im Inneren von Zellen. Dazu werden Zielprotein-spezifische Antikörper oder Seren in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern verwendet. Bei einer intrazellulären Färbung muss zunächst die Zellmembran über ein Detergenz permeabilisiert werden, um den Antikörpern Zugang zum Antigen zu verschaffen. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper werden über eine UV-Lichtquelle im Fluoreszenzmikroskop angeregt woraufhin sie Licht in einer farbstoffspezifischen Wellenlänge emittieren. Durch den Einsatz von auf den Farbstoff abgestimmten Filtern können interferierende Wellenlängen ausgeblendet werden. Adhärenz wachsende Zellen wurden auf Deckgläschen in einer 6-well Platte ausgesät und bis zu ca. 70% Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde entfernt, die Deckgläschen mit PBS gespült und mit 2%-Formaldehyd in PBS für 30min. bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10min. mit PBS wurden die Zellen gegebenenfalls mit einer 1%igen Tritonlösung (Triton X100) für 15min. permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung der Zellen wurde wieder dreimal für 10min. mit PBS gewaschen und mit einer 5%igen Milch-in-PBS-Lösung für 1h bei 37°C und 95% Luftfeuchte (im Brutschrank) unspezifische Bindungen abgesättigt. Die Objektträger wurden mit dem entsprechend verdünnten Primärantikörper in einer 5%igen Milch-in-PBS-Lösung für 60min. im Brutschrank inkubiert. Danach wurde dreimal je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Als Zweitantikörper wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelte spezies-spezifische Antikörper verwendet. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für eine Stunde bei 37°C in einer 5%igen Milch-in-PBS-Lösung im Brutschrank. Anschließend wurde dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Deckgläschen aus den Wells genommen und zusammen mit ProLong® Antifade Reagenz (Invitrogen) auf Objektträger gegeben (Zellen nach unten), über Nacht getrocknet und anschließend dunkel gelagert. Die Zellen konnten unter dem

Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden, dabei wurde das FITC bei 488nm angeregt und dessen Emission bei 530nm detektiert.

3.5.5 Immunhistologie von Melanommetastasen

Die Immunhistologie wurde von Frau Petra Siegel an der Hautklinik der Charité durchgeführt. Die entnommenen Melanommetastasen wurden hierfür in 4% Paraformaldehyd fixiert, in Parafin eingebettet und mit dem Mikrotom 4-6µm dünne Schnitte geschnitten. Der Melanomcharakter der Metastasen wurde mit den Antikörpern HMB45 oder α -Tyrosinase verifiziert. Weitere Schnitte der Metastasen wurden mit den jeweiligen Primärantikörpern gegen HERV-K Proteine inkubiert und mit dem LSAB-Kit (DAKO) detektiert. Zur besseren Übersicht wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt.

4. Ergebnisse

4.1 Generierung neuer Methoden zur Analyse der HERV-K Expression

4.1.1 RT-PCR zum semiquantitativen Nachweis der HERV-K Expression

Zum detaillierten Nachweis der mRNA von HERV-K wurden von R. Phelps [1997] entwickelte Primer benutzt. Das Set besteht aus sieben Primern, die jeweils vor bzw. hinter den Spleißdonoren und -akzeptoren lokalisiert sind. Ihre Kombination ermöglicht es mit dem Primer Paar P4 und P5 deletierte (Deletionsmutante) und nicht deletierte (Prototyp) Proviren zu unterscheiden. Des weiteren ist die Unterscheidung zwischen gespleißter und Vollängen-mRNA möglich. So sind die Primerpaare P2 und P3 sowie P4 und P5 spezifisch für die Vollängen-mRNA, P2 und P5 bzw. P6 für das gespleißte *env* und P1 und P7 detektieren sowohl doppelt gespleißtes *rec* sowie auch die einfach gespleißte 1,5kb mRNA (siehe Abb. 4.1).

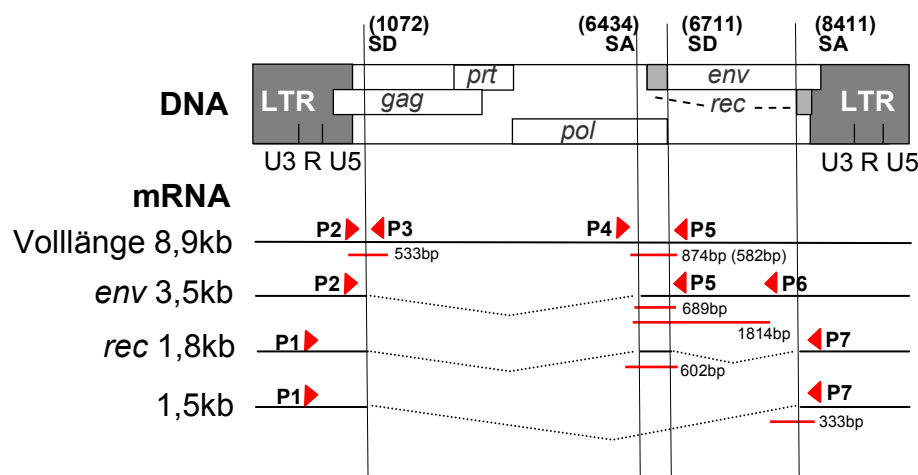


Abb. 4.1: Lokalisation der Primer für HERV-K. Organisation von HERV-K auf DNA-Ebene und die Lokalisation der einzelnen HERV-K spezifischen Primer P1 bis P7 auf mRNA-Ebene.

Im Gelbild ergibt sich so ein spezifisches Bandenmuster, die Expression von HERV-K in Zellen oder Geweben kann so bestimmt werden. Die humane Teratokarzinom-Zelllinie GH, welche Vollängen und gespleißte HERV-K mRNA transkribiert, wurde als Positiv-Kontrolle verwendet. Die humane embryonale Nierenzelllinie 293, dagegen exprimiert zwar Vollängen-mRNA, jedoch kein gespleißtes *env* oder *rec* (siehe Abb. 4.2).

Die Doppelbande in Spur 2 zeigt, dass sowohl Proviren der Deletionsmutante, wie auch Proviren des Prototyp von HERV-K transkribiert werden. Die zusätzliche Bande der 1,5kb mRNA (Spur 5) tritt jedoch nur bei GH- und nicht bei SK-MEL-28-Zellen auf, obwohl beide Zelllinien *env* und *rec* spleißen.

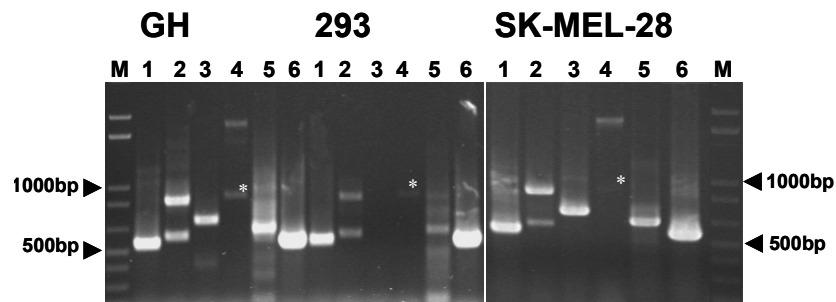


Abb. 4.2: RT-PCR mit HERV-K Primern. Agarosegel der RT-PCR mit dem Primerset von GH, 293 und SK-MEL-28 Zellen, M Marker, 1 P2+P3, 2 P4+P5, 3 P2+P5, 4 P2+P6, 5 P1+P7 und 6 GAPDH; * unspezifisch

4.1.2 RT-PCR zum quantitativen Nachweis der HERV-K Expression

Um quantitativ die Menge exprimierter HERV-K Transkripte in den HERV-K positiven Geweben und Zelllinien bestimmen zu können, wurde eine real-time TaqMan reverse Transkriptase PCR entwickelt. Die Primer für die real-time RT-PCR wurden so gewählt, dass wie bei der konventionellen RT-PCR Vollängen-mRNA und gespleißte *env*-, *rec*- und *np9*-mRNA nachgewiesen werden können, die Unterscheidung zwischen deletiertem HERV-K und dem Prototyp ist allerdings nicht möglich. Der Nachweis verwendet für alle Reaktionen den gleichen forward Primer und die gleiche Sonde. Die Spezifität der jeweiligen Reaktion wird durch den reverse Primer gewährleistet, welcher jeweils über der für das gespleißte Transkript spezifischen Spleißstelle liegt (siehe Abb. 4.3 und Tabelle 1 Anhang Seite II). Die Verwendung von nur einer Sonde ist einfach und kostengünstig, jedoch sind die einzelnen Reaktionen nicht zusammen im Multiplex Assay einsetzbar.

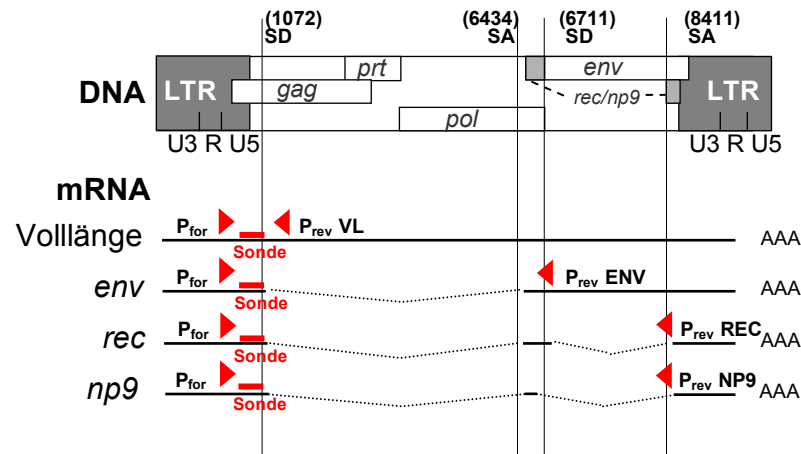


Abb. 4.3: Lokalisation der Primer für den real time RT-PCR Nachweis. Organisation der HERV-K DNA im humanen Genom und Lokalisation der Sonde sowie der einzelnen TaqMan Primer auf mRNA-Ebene.

Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen der real-time RT-PCR

Zur Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden sowohl Sonden- als auch Primerkonzentration variiert und bei verschiedenen Magnesiumsulfatkonzentration getestet. Sonde, Primer MgSO₄ und dNTPs sollten im Überschuss vorliegen, so dass der C_T-Wert der einzelnen Proben nur von der Templatekonzentration abhängt. Zu hohe Konzentrationen der einzelnen Komponenten können jedoch zu unspezifischen Nebenprodukten führen und so die Effizienz der Reaktion erheblich beeinflussen.

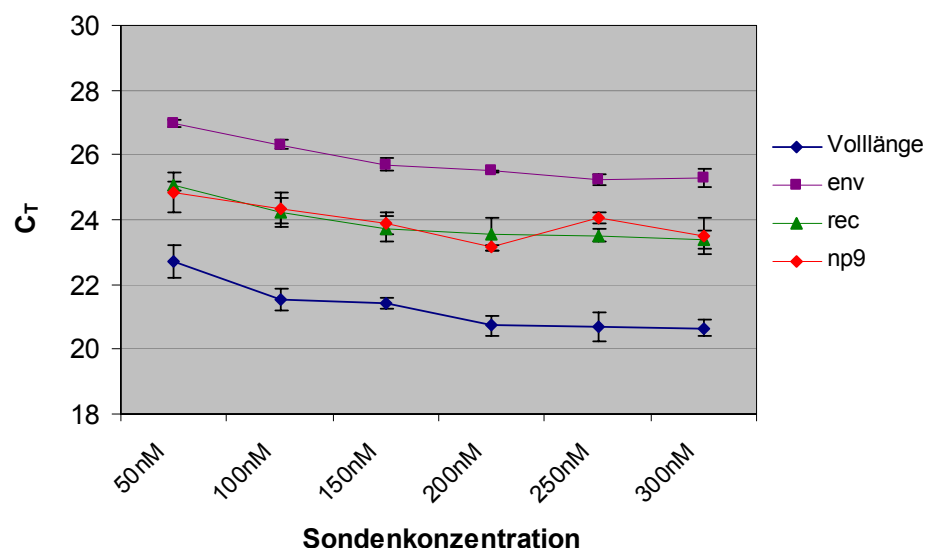


Abb. 4.4: Bestimmung der optimalen Sondenkonzentration. Der C_T in Abhängigkeit der Sondenkonzentration für die einzelnen Nachweise der HERV-K Transkripte

Zunächst wurde die optimale Konzentration der Sonde bei konstanter Primer- (250nM) und Template-Menge (20ng) bestimmt. 200nM erwies sich hier als optimal (niedrigster C_T -Wert) und wurde daher für die weiteren Ansätze übernommen (siehe Abb. 4.4).

Als zweites wurde die optimale Primerkonzentration bei 200nM Sondenkonzentration und konstanter Template-Menge (20ng) bestimmt. Hier wurden zusätzlich zwei verschiedene Magnesiumsulfatmengen, 3mM und 5mM, getestet (siehe Abb. 4.5).

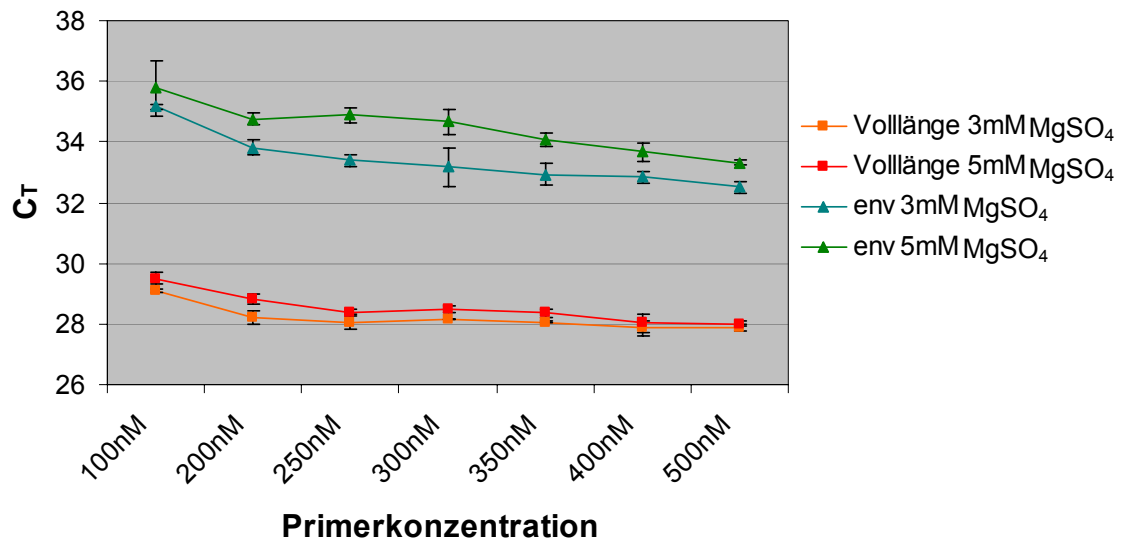


Abb. 4.5: Bestimmung der optimalen Primerkonzentration in Abhängigkeit von MgSO₄. Der C_T in Abhängigkeit der Primerkonzentration bei verschiedenen MgSO₄- Konzentrationen für den Nachweise der HERV-K Volllänge und *env*.

Da sich hier abzeichnete, dass die erhöhte MgSO₄-Konzentration einen nachteiligen Effekt zeigt, wurden die weiteren Primerkonzentrationen bei 3mM MgSO₄ bestimmt. 250nM Primer erwies sich als optimal und wurde für den Standardansatz übernommen (siehe Abb. 4.6).

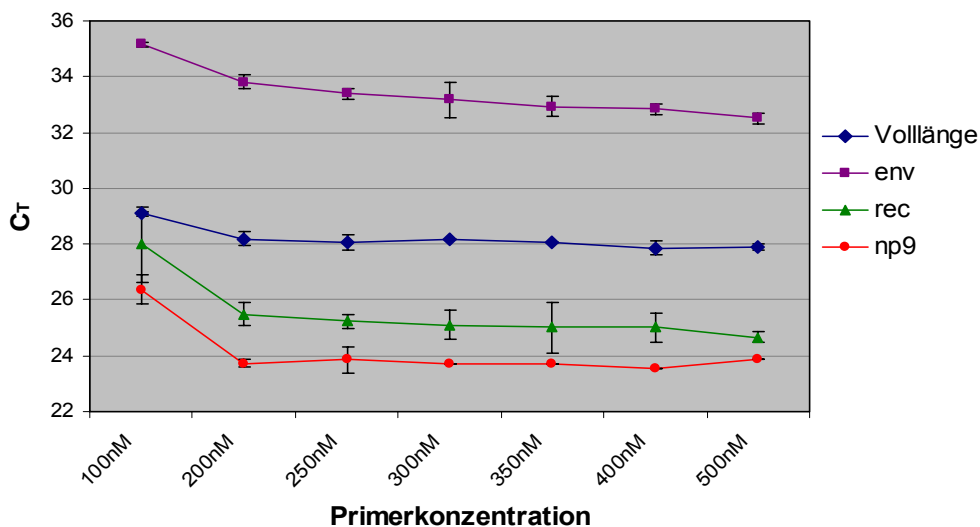


Abb. 4.6: Bestimmung der optimalen Primerkonzentration. Der C_T in Abhängigkeit der Primerkonzentration für die einzelnen Nachweise der HERV-K Transkripte.

Als letzter Optimierungsschritt wurde die Effizienz der Reaktionen mit den unterschiedlichen reverse Primern bestimmt. Für genaue und reproduzierbare Resultate sollte die Effizienz nahe 100% liegen. Aus den C_T -Werten bei definierten Verdünnungen des Templates lässt sich eine Standardkurve errechnen, über deren Steigung sich die Effizienz der Reaktion bestimmen lässt (Stratagene Application Note #10, siehe Material und Methoden Seite 33).

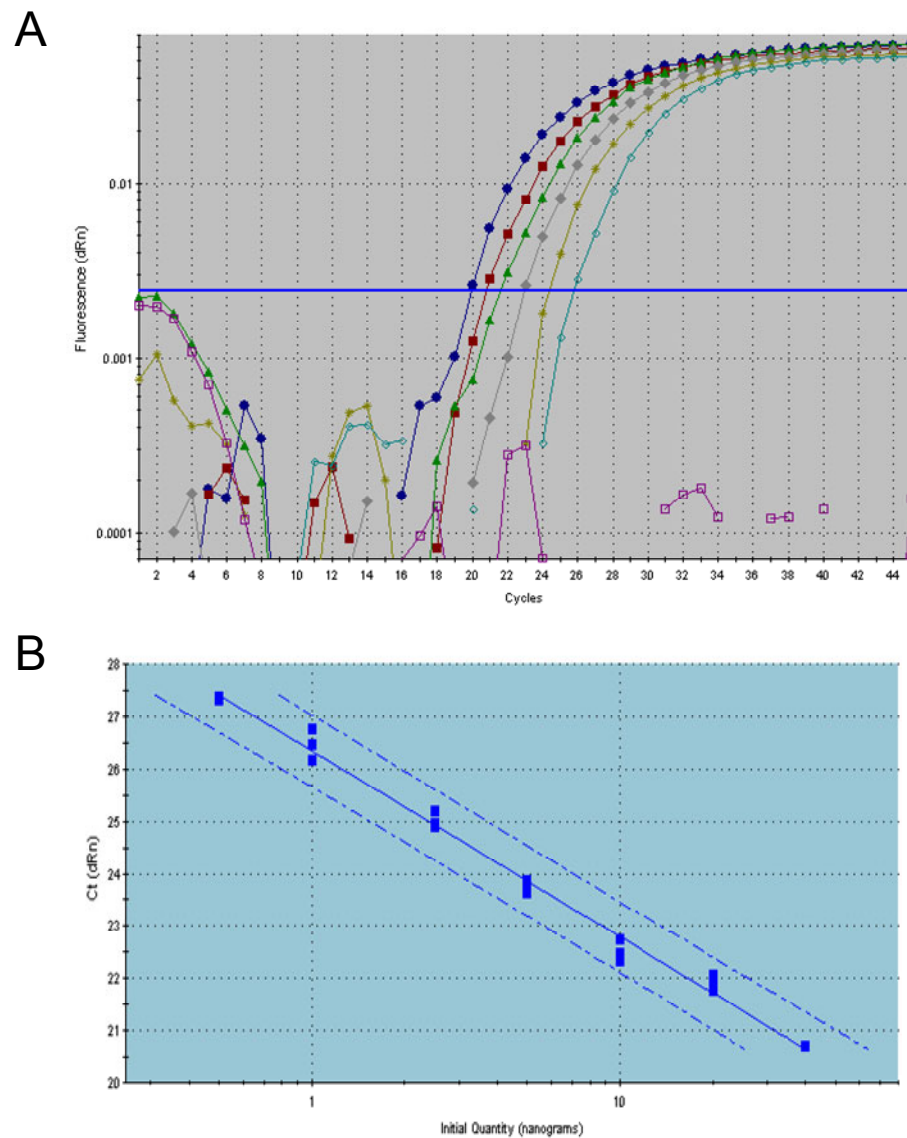


Abb. 4.7: Bestimmung der Effizienz der real time RT-PCR Reaktion am Beispiel des Nachweises der Volllänge von HERV-K. (A) Ausverdünnung der RNA von GH, dargestellt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zyklenzahl. **(B)** Standardgerade der Ausverdünnung, dargestellt sind die C_T -Werte in Abhängigkeit der eingesetzten Templatmenge, gestrichelte Linie: Konfidenzintervall bei 99%

Die Darstellung der Kurven zeigt die Verschiebung des C_T -Wertes um ungefähr einen Zyklus bei der Verdünnung der Template RNA um die Hälfte. Dies spiegelt die Verdopplung der Templatemenge während eines Zyklus wieder (siehe Abbildung 4.7 A). Die Effizienz errechnet sich auf der Steigung der Standardgeraden. Da die Effizienz nicht 100% entspricht (s.u.), entspricht die Verschiebung nicht exakt einem Zyklus.

Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten an, ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei intervallskalierten Merkmalen. Er kann lediglich Werte zwischen -1 und 1 annehmen, bei einem Wert von +1 (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert 0 aufweist, hängen die beiden Merkmale überhaupt nicht linear voneinander ab. Das Bestimmtheitsmaß liegt bei allen vier Reaktionen nahe dem Idealwert 1, d.h. die ermittelten Standardgeraden sind verlässlich.

Die Effizienzen der einzelnen Reaktionen wurden mit Hilfe der Standardkurven-Berechnung des MX4000 Programms bestimmt. Trotz optimierter Konzentrationen von Sonde, Primern und $MgSO_4$ liegen die Effizienzen unter 100% was in die folgende Auswertung der Proben mit einbezogen werden muss.

Tabelle 1: Effizienz der real-time PCR-Reaktionen

Primer	Effizienz	Bestimmtheitsmaß R^2
Volllänge	91,1 %	0,990
<i>env</i>	84,5 %	0,989
<i>rec</i>	78,2 %	0,990
<i>np9</i>	93,6 %	0,994

Davon ausgehend, dass die Effizienz, mit der die einzelnen Reaktionen in den verschiedenen Proben ablaufen, immer gleich ist, lässt sich die Expression von HERV-K relativ zu einem Kalibrator bestimmen. Hierfür wurde für alle Proben die Expression von HERV-K in Bezug auf GH oder SK-MEL-28 RNA bestimmt.

4.1.3 Charakterisierung neuer Antiseren zur Analyse der HERV-K Expression

Ektodomäne des Transmembranproteins gp36

Zur Klonierung des größten Teil der Ektodomäne des Transmembranproteins gp36 (Aminosäuren 488-586) wurde mit Gesamt-RNA von GH-Zellen eine semiquantitative RT-PCR mit den Primern rekTM-forward und rekTM-reverse durchgeführt (siehe Anhang Seite I). Die Primer amplifizieren den 469bp großen Teil der Ektodomäne des gp36/TM -Proteins wie in Abb. 4.8 gezeigt.

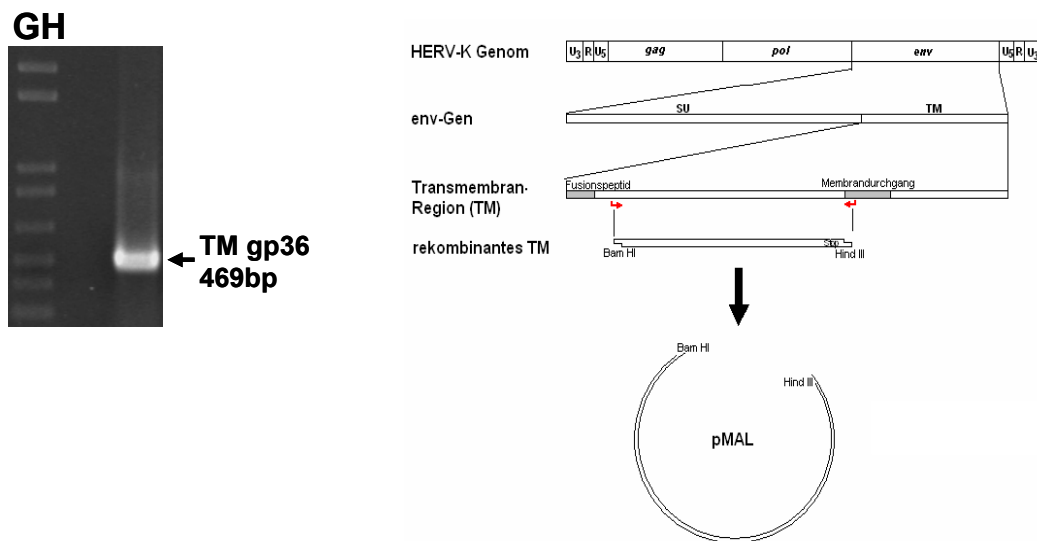


Abb. 4.8: Klonierungsstrategie der Ektodomäne des Transmembranproteins gp36 von HERV-K. Schematische Darstellung der Lage der Klonierungsprimer auf DNA-Ebene sowie der Klonierungsstrategie und das entsprechende Agarosegel der RT-PCR mit GH Gesamt-RNA.

Über die mit den Primern angefügten BamHI- und HindIII- Schnittstellen wurde das PCR-Fragment in den pMAL p2X -Vektor kloniert (siehe Anhang Seite XVI), in *E.coli* BL21 exprimiert und das 57kDa Fusionsprotein (42kDa Maltose-Bindeprotein und 15kDa gp36/TM-Protein) affinitätschromatographisch aufgereinigt. Ein Sequenzvergleich ergab, dass die geklonte Sequenz C6-5 am genauesten dem gp36-Protein von HERV-K 101 gleicht, sich jedoch in einem Aminosäureaustausch in AS481 (Lys zu Asn) unterscheidet. Der von R. Phelps [1997] hergestellte Klon HETM2 gleicht HERV-K 108 und HERV-K HOM, von diesem unterscheidet sich Klon C6-5 in einem weiteren Aminosäureaustausch, AS466 (Arg zu His), (siehe Abb. 4.9).

Ein Immuneserum gegen das von Klon C6-5 exprimierte rekombinante Fusionsprotein wurde in Ziege 26 generiert (siehe Material und Methoden Seite 41).

rTM Klon C6-5	GVALHSSVQS	VNFVNDWQKN	STRLWNSQSS	IDQKLANQIN	DLRQTVIWMG	DRLMSLEHRF
rTM Klon HETM2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TM HERV-K 101	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TM HERV-K 108	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TM HERV-K HOM	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TM HERV-K 113	-----	-----	-----	-----	-----	-----
rTM Klon C6-5	QLQCDWNTSD	FCITPQIYNE	SEHHWDMVRH	HLQGREDNLT	LDISNLKEQI	FEASKAHLNL
rTM Klon HETM2	-----	-----	-----R	-----	---K---	-----
TM HERV-K 101	-----	-----	-----	-----	---K---	-----
TM HERV-K 108	-----	-----	-----R	-----	---K---	-----
TM HERV-K HOM	-----	-----	-----R	-----	---K---	-----
TM HERV-K 113	-----	-----	-----C	-----	---K---	-----
rTM Klon C6-5	VPGTEAIAGV	ADGLANLNPV	TWVKTIGSTT			
rTM Klon HETM2	-----	-----	-----			
TM HERV-K 101	-----	-----	-----			
TM HERV-K 108	-----	-----	-----			
TM HERV-K HOM	-----	-----	-----			
TM HERV-K 113	-----	-----	-----			

Abb. 4.9: Sequenzvergleich der rekombinanten gp36 Proteine. Dargestellt sind die Sequenzen der Klone C6-5 und HETM2 [Phelps 1997] im Vergleich zu verschiedenen HERV-K Sequenzen der NCBI Datenbank (Accnrs. P61566, AAD51798, Q69384 und Q902F9).

Charakterisierung von Ziegenserum 26

Alle bei den einzelnen Immunisierungsschritten gewonnenen Seren erkennen das rekombinante Protein im Westernblot in einer Verdünnung von 1:200 (nach dem ersten Boost) bis 1:1000 (nach dem letzten Boost). Das entsprechende Präimmuneserum reagiert nicht (nicht gezeigt). Zur genaueren Charakterisierung des Ziegenserums gegen HERV-K gp36 wurde eine Epitopkartierung mit einer Pepsot Membran durchgeführt. Das schon vorhandene mit Klon HETM2 erstellte Immuneserum von Ziege 7 [Phelps 1997], welches unter anderem in der Arbeit von Muster et al. [2003] verwendet wurde, diente als Vergleich.

Beide Seren erkennen als Hauptepitop eine Region an der Cysteinschleife (siehe Abb. 4.10, rot dargestellt). Zudem werden vier weitere Epitope erkannt. Ziegenserum 26 erkennt im C-terminalen Teil des rekombinanten Proteins mehrere ineinander übergehende Epitope, deren Unterscheidung, durch die Überlappungen nicht möglich ist. Beide Seren zeigen keine kreuzreaktiven unspezifischen Bindungen außerhalb des zur Immunisierung verwendeten Proteinanteils. Das entsprechende Präimmuneserum reagierte nicht (nicht gezeigt).

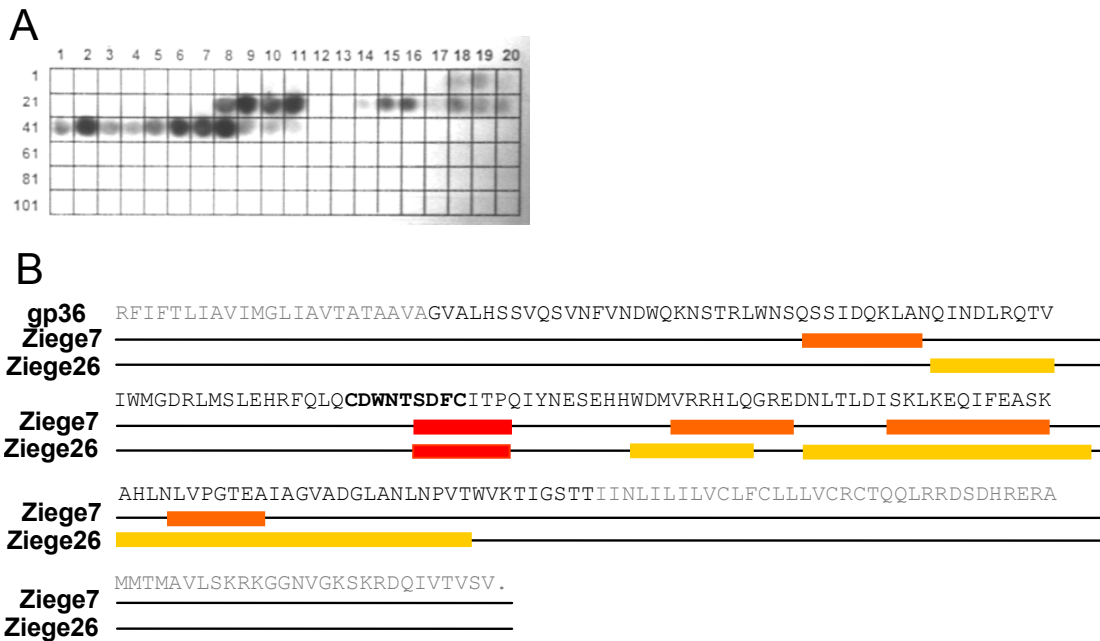


Abb. 4.10: 10 Epitopkartierung der Ziegenserum 7 und 26 spezifisch für HERV-K gp36. (A) Pepspotmembran zur Epitopkartierung am Beispiel für Ziegen Serum 26. (B) Dargestellt ist die Sequenz von gp36 sowie die mittels Pepspot ermittelten Epitope der Ziegenserum 7 und 26 im Vergleich. Die Sequenz des zur Immunisierung verwendeten Anteils ist schwarz dargestellt, die Sequenz der Cysteinschleife fett.

Rekombinantes Np9-Protein

Zur Klonierung des zusätzlichen Proteins Np9 wurde ebenfalls mit Gesamt-RNA von GH-Zellen eine semiquantitative RT-PCR mit den Primern *np9-G* und *np9-H* (siehe Anhang Seite I) durchgeführt.

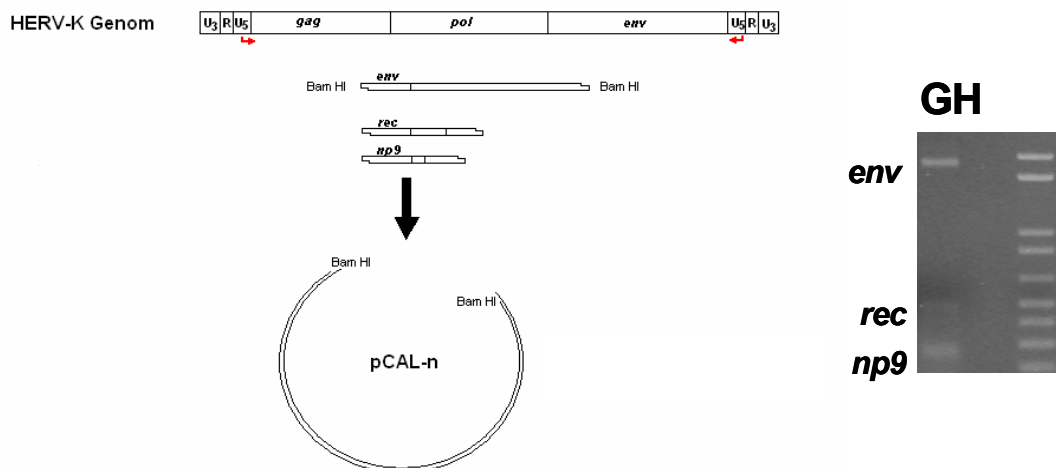


Abb. 4.11: Klonierungsstrategie des HERV-K Np9 Proteins. Schematische Darstellung der Lage der Klonierungsprimer auf DNA-Ebene sowie der Klonierungsstrategie und das entsprechende Agarosegel der RT-PCR mit GH Gesamt-RNA.

Die Primer amplifizieren alle gespleißten mRNAs von HERV-K. Nach der Größenaufftrennung im Agarosegel und einer Gelextraktion wurde das passende Stück in den pCAL-n Vektor kloniert (siehe Abb. 4.11 und Anhang Seite XVII). Ein Sequenzvergleich der Klone von Np9 mit den veröffentlichten Sequenzen von Armbrüster et al. [2002] ergab, dass sie mit dem Np9-Protein von HERV-K HML2.HOM übereinstimmen (siehe Abb. 4.12). Der Klon rNp9-3 wurde in *E.coli* BL21-Zellen exprimiert und das 13kDa Fusionsprotein aus 4kDa Calmodulin-Bindeprotein und 9kDa Np9-Protein affinitäts-chromatographisch aufgereinigt. Ein Immunsereum gegen das von Klon rNp9-3 exprimierte rekombinante Fusionsprotein wurde in Ziege 29 generiert (siehe Material und Methoden Seite 41).

Np9 HERV-K HOM	MNPSEMQRKG	PPRRCLQVYP	TAPKRQRPSR	TGHDDDGGFV
Np9 HERV-K HOM V1	-----	--Q-----	-----	-----
Np9 HERV-K HOM V2	-----	-----	-----	-----
rNp9 Klon 2	-----	-----	-----	-----
rNp9 Klon 3	-----	-----	-----	-----
rNp9 Klon 5	-----	-----	-----	-----
Np9 HERV-K HOM	EKKRGKCGEK	QERSDCYCVC	VERSRHRLHF	VMC.
Np9 HERV-K HOM V1	-----	-----	-----	-LY
Np9 HERV-K HOM V2	-----	-----	-----	---
rNp9 Klon 2	-----	-----	-----	---
rNp9 Klon 3	-----	-----	-----	---
rNp9 Klon 5	-----	-----	-----	---

Abb. 4.12: Sequenzvergleich der rekombinanten Np9 Proteine. Dargestellt sind die Sequenzen der Klone rNp9 2, 3 und 5 im Vergleich zu den veröffentlichten Sequenzen von Armbrüster et al. 2002.

Charakterisierung von Ziegenserum 29

Alle bei den verschiedenen Immunisierungsschritten (siehe Material und Methoden Seite 41) gewonnenen Seren erkennen das rekombinante Protein im Westernblot. Von einer Verdünnung von 1:100 (aufgereinigte Antikörper) bis 1:1.000 des Serums nach der letzten Immunisierung (siehe Abb. 4.13).

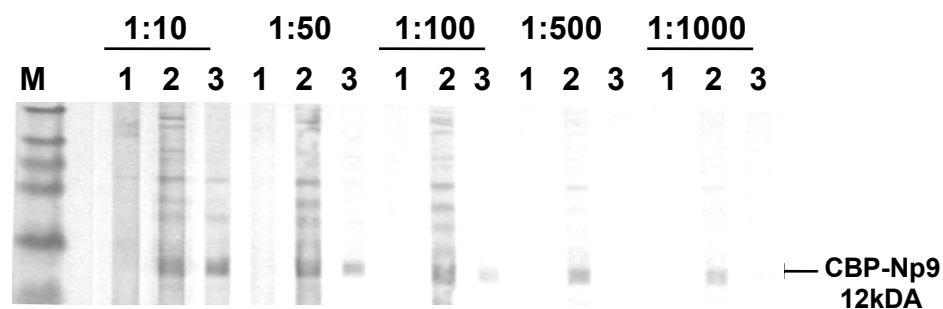


Abb. 4.13: Westernblotanalyse des für rNp9 spezifischen Ziegenserum 29. Dargestellt sind verschiedene Verdünnungen von Präimmunsereum (1), Immunsereum (2) sowie über eine IgG-Säule aufgereinigtes Immunsereum (3) von Ziege 29 nach der dritten Immunisierung.

4.2 Expression von HERV-K in Melanomen

Insgesamt wurden 55 Melanomgewebeproben von der Dermatologie der Charité zur Verfügung gestellt. Aus allen Geweben wurde sowohl RNA als auch Protein isoliert (siehe Kap. 3.3.1).

Ebenso wurden RNA und Proteine aus den 37 in der Charité etablierten Melanomzelllinien und fünf weiteren, kommerziell erhältlichen, Zelllinien (SK-MEL-1, SK-MEL-28, GR-M, G-361 und MEWO) aufgereinigt (siehe Kap. 3.3.2).

Von 24 Patienten waren sowohl Melanomgewebe, als auch die daraus etablierte Zelllinie vorhanden.

Als Kontrolle wurden zum einen RNA aus den in der Charité kultivierten Nicht-Melanomzelllinien verwendet (siehe Kapitel 3.3.2), zum anderen wurde jeweils RNA oder Protein von folgenden Zelllinien mitgeführt: als Positiv-Kontrolle für HERV-K Expression und korrektes Spleißen die humane Teratokarzinomzelllinie GH, als Negativ-Kontrolle die humane embryonale Nierenzelllinie 293 und als Positiv-Kontrolle für maligne Melanome sowie HERV-K Expression und korrektes Spleißen, die Zelllinie SK-MEL-28 (siehe Kapitel 3.2.2).

Die Integrität der verwendeten RNA wurde zunächst mittels RT-PCR mit Primern für die ubiquitär exprimierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) mRNA überprüft. Hierfür wurde zunächst ein Primerpaar verwendet, welches ein Produkt bei 550bp ergibt. Des weiteren wurde später ein zweites Primerpaar entwickelt und verwendet, welches spezifisch nur humanes GAPDH erkennt und ein Produkt von 120bp ergibt (siehe Anhang Seite I).

Parallel wurden die Proben mittels einer PCR ohne Reverse Transkriptase auf eventuelle DNA-Verunreinigungen untersucht. Hierfür wurden die Primer P2 und P3 für die HERV-K Vollängen-mRNA verwendet (siehe Seite 44 und Anhang Seite II).

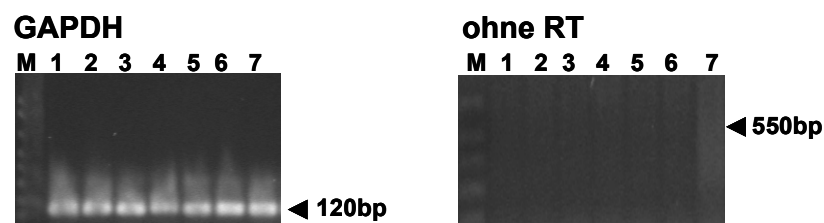


Abb. 4.14: RT-PCR zur Überprüfung der RNA-Integrität und DNA-Kontamination. M Marker, 1 GH, 2 293, 3 SK-MEL-28, 4 KLM und 5 SC (Gewebe), 6 AN und 7 AP (Zellen), siehe Anhang Seite IV und V

Keine der isolierten RNA-Proben zeigte eine Kontamination mit DNA und die Integrität der RNA konnte mittels GAPDH RT-PCR als gut befunden werden (siehe Abb. 4.14 und 4.15 sowie Anhang Seite IV und V).

Sechs der 55 Melanomgewebe wiesen eine starke braune Färbung durch im Gewebe enthaltenes Melanin auf, welches sowohl mit der RNA eluiert wurde und sich auch in der Proteinfraction befand. Es zeigte sich, dass Melanin sowohl in der Quantifizierung der RNA mittels OD-Messung interferiert, wie auch die RT-PCR inhibiert (siehe Abb. 4.15). Die Inhibition der PCR durch Melanin ist in der Literatur beschrieben [Eckhart et al. 2000]. Da sich diese Inhibition nicht durch die Zugabe von bovinem Serum Albumin (BSA) aufheben ließ [Giamberti et al. 1998, Price und Linge 1999] und es sich um eine geringe Anzahl an Proben handelte, wurden diese aus der weiteren Betrachtung ausgenommen (siehe Anhang Seite IV).

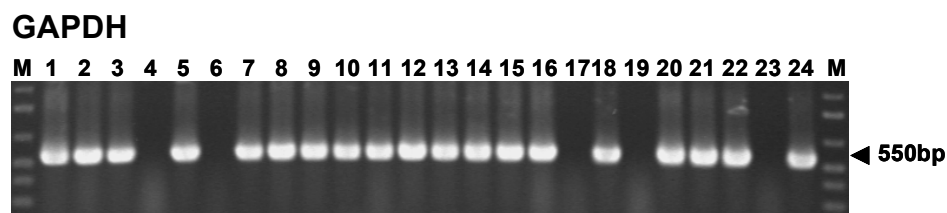


Abb. 4.15: RT-PCR zur Überprüfung der Integrität der RNA der Melanomgewebeprouben. M Marker, 1 bis 24 Gewebeprouben, die Zahlen korrespondieren mit Tabelle 2, Anhang Seite IV

Um zu gewährleisten, dass es sich bei den verwendeten Geweben und Zelllinien um maligne Melanome handelt, wurden alle Proben zunächst auf Expression eines melanomspezifischen Gens hin untersucht. Hierzu wurde ein spezifisches Primerpaar für das Gen für MART-1 (*Melanoma Antigen Recognized by T-Cell 1*) entworfen und getestet. Die Expression von MART-1 ist zu 100% spezifisch und 38% sensitiv für maligne Melanome [Perez et al. 2000].

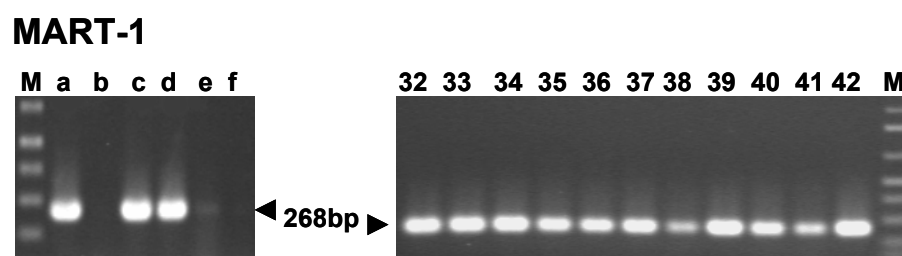


Abb. 4.16: RT-PCR zur Überprüfung des Melanomcharakters bei Melanom-Zelllinien. M Marker, a MEWO, b 293, c SK-MEL-28, d SK-MEL-1, e GR-M und f GH; 32 bis 42 Melanom-Zelllinien, die Zahlen korrespondieren mit Tabelle 2, Anhang Seite V.

Alle verwendeten Melanomproben zeigten zumindest eine schwache Bande in der MART-1 RT-PCR, so dass der Melanomcharakter der verwendeten Proben als gesichert angesehen werden konnte (siehe Anhang Seite IV und V).

4.2.1 Expression von HERVs in Melanomgeweben und -zellen

HERV-R (oder ERV-3) ist mit nur einer Kopie auf Chromosom 7 im Genom vertreten [O'Connel et al. 1984, Wilkinson et al. 1994, Urnovitz und Murphy 1996]. Das *gag-pol*-Gen besitzt keinen offenen Leserahmen, für den *env*-Bereich dagegen wurden mRNA-Expression und Proteinproduktion nachgewiesen [de Parseval und Heidmann 1998]. Die Primer wurden daher so entwickelt, dass sie im *env*-Bereich des Provirus lokalisiert sind. Zum Nachweis der mRNA von HERV-H und -W wurden Primer von J. Johnston et al. [2001] verwendet. Die Primer für HERV-W liegen im *pol*-Bereich des Provirus, die für HERV-H im *gag*-Bereich. Beide sind so entworfen, dass sie in konservierten Bereichen liegen und spezifisch für die jeweilige HERV-Familie sind. Die Bestimmung der HERV-K Expression erfolgt mit den Primern spezifisch für die Vollängen-mRNA bzw. die gespleißte *env*-mRNA (vgl. Seite 45).

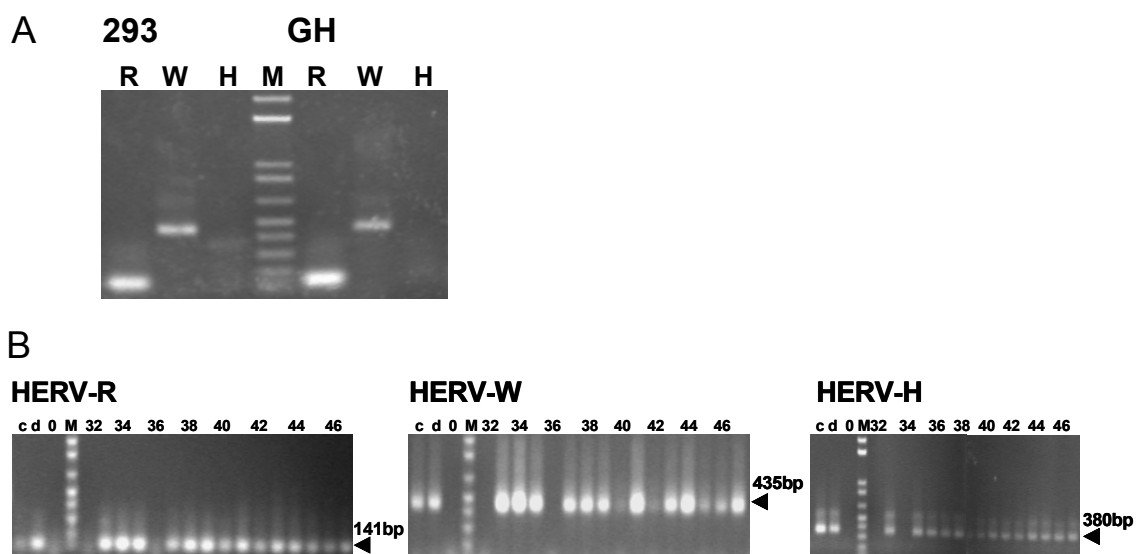


Abb. 4.17: Expression von HERV-R, -W und -H in Melanomzelllinien.

(A) Expression von HERVs in 293- und GH- Zellen; M Marker, R HERV-R, W HERV-W, H HERV-H. (B) Expression von HERVs in Melanomzellen; M Marker, c SK-MEL-28, d SK-MEL-1, 0 H₂O, 32 bis 47 Melanom-Zelllinien, die Zahlen korrespondieren mit Tabelle 2, Anhang Seite V.

Alle vorhandenen Gewebeproben und Zelllinien wurden auf die Expression von HERV-R, HERV-W, HERV-H und HERV-K mittels RT-PCR getestet. HERV-R ließ sich in den meisten untersuchten Proben nachweisen, ebenso HERV-H mit Ausnahme der Melanomzelllinien, die nur zu 60% positiv waren. HERV-W dagegen war nur in 25% der Melanomgewebe und in 60% der Zelllinien exprimiert. HERV-K Volllänge (*gag*) lässt sich in allen untersuchten Zellen nachweisen, gespleißtes *env* dagegen nur in 35% bzw. 43% der Melanome und in keiner Kontrollzelllinie (siehe Tabelle 2 und Anhang Seite IV f). Auffällig ist, dass sich HERV-R, -W und -H in fast allen Kontrollzelllinien nachweisen ließen. Im Gegensatz zu HERV-K, wo gespleißtes *env* nachgewiesen wurde, kann bei der PCR für HERV-R, -W und -H nicht zwischen Vollängen und gespleißter mRNA unterschieden werden.

Tabelle 2: Expression von HERVs

		Melanomgewebe	Melanomzelllinien	Nicht-Melanomzelllinien
		n = 47	n = 41	n = 16
HERV-R	<i>env</i>	100%	98%	100%
HERV-W	<i>pol</i>	23%	80%	94%
HERV-H	<i>gag</i>	83%	61%	94%
HERV-K	<i>gag</i>	100%	100%	100%
	<i>splice env</i>	35%	43%	0%

4.2.2 Bestimmung exprimierter HERV-K Proviren

Als Positiv-Kontrolle der HERV-K Expression wird die Teratokarzinomzelllinie GH verwendet. Hier wurde erstmals die Expression von gespleißtem *env* und *rec* sowie Proteinproduktion und Partikelbildung beschrieben [Löwer et al. 1993]. Allerdings wurde bis heute noch nicht untersucht, welche der ca. 50 HERV-K Loci im Genom transkribiert werden. Da das von R. Phelps [Phelps 1997] entwickelte Primersystem es ermöglicht, zwischen der Deletionsmutante und dem Prototyp von HERV-K zu unterscheiden, ist klar, dass zumindest zwei Proviren unterschiedlichen Typs in allen untersuchten Zellen transkribiert werden. Um besser einschätzen zu können, ob ein heterogener Pool oder nur einige wenige HERV-K-Proviren transkribiert werden, wurden die mit P2+P3 (Volllänge) und P2+P5 (*env*) amplifizierte Banden in TOPO-TA-Vektoren kloniert, pro Konstrukt ca. 24 Klone sequenziert und mit der NCBI Datenbank verglichen. Um einen Eindruck zu bekommen, ob die Expression von HERV-K in Teratokarzinom und Melanomen gleich oder ähnlich ist, wurde Gesamt-RNA von GH-, SK-MEL-28- und 293-Zellen miteinander verglichen.

Vollängen Transkripte von HERV-K

Die Sequenzen von insgesamt 65 Vollängentranskripten, davon je 22 aus GH und 293 und 21 aus SK-MEL-28, wurden mit Hilfe des Moduls MegAlign von Lasergene V6 (DNAStar, Inc., USA) nach der Jotun-Hein-Methode miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass Sequenzen zu großen Teilen übereinstimmen und sich nur in einzelnen Nukleotiden unterscheiden. Aus Kosten und Zeitgründen wurden die klonierten Transkripte nur in einer Richtung sequenziert, so dass dies auch auf einzelne Sequenzierfehler zurückzuführen ist. Die niedrigste Übereinstimmung zweier Sequenzen liegt bei 93%. Diese Übereinstimmung spiegelt sich auch in der niedrigen Zahl an Nukleotidaustauschen wieder (siehe Anhang Seite IX ff) und zeigt, dass in SK-MEL-28-Zellen keine andere HERV-K Loci transkribiert werden, als in GH- oder 293-Zellen und in allen drei Zelllinien Transkripte aller in der NCBI-Datenbank-Suche gefundenen HERV-K Loci auftreten. Der Vergleich ausgewählter Sequenzen mit der NCBI-Datenbank zeigt, dass beide HERV-K Proviren gefunden werden. In der Hauptsache ähneln die Sequenzen dem HERV-K HML2.HOM Provirus (Accnr. AF074086) und dessen allelen Varianten (Accnrs. Y17832 und AF164614) sowie HERKLTGAG (Accnr. Y08032), HERV-K 101, 103 und 115 (Accnrs. AF164609, AF164611 und AY037929) und HERV-K 10 (Accnr. M14123).

Env-Transkripte von HERV-K

Die Sequenzen von insgesamt 42 gespleißten *env*-Transkripten, davon je 21 aus GH- und SK-MEL-28-Zellen, wurden ebenfalls mit Hilfe von MegAlign miteinander verglichen. Auch hier stimmt der Großteil der Sequenzen (35 von 42) überein und unterscheidet sich nur in einzelnen Nukleotiden. Es finden sich sowohl Transkripte aus GH- und SK-MEL-28-Zellen (siehe Anhang Seite XII ff). Ein Vergleich ausgewählter Sequenzen mit der NCBI-Datenbank zeigt, dass auch hier die Sequenzen hauptsächlich dem HERV-K HML2.HOM Provirus (Accnr. AF074086) und dessen allelen Varianten (Accnrs. Y17832 und AF164614) gleichen. Zudem finden sich *env*-Sequenzen wie HERV-K *env*-mRNA (Accnr. X82272) und die *env*-Sequenz des HERV-K Provirus aus Melanomen MERV (Accnr. DQ058015). Neben diesen Sequenzen werden noch weitere acht Sequenzen nur von GH-Zellen transkribiert, die sich von dem Hauptteil durch Deletionen unterscheiden. Ein Vergleich dieser Sequenzen mit der NCBI-Datenbank zeigt, dass sie HERV-K 101, 103 und 107 (Accnrs. AF164609, AF164611 und AF164613) und HERV-K 10 (Accnr. M14123) zugeordnet werden können (deletierte Proviren). In SK-MEL-28 treten diese Transkripte nicht auf.

4.2.3 Semiquantitativer Nachweis der Expression von HERV-K

Kontrollzelllinien und normale Melanozyten

Bei normalen neonatalen Melanozyten HEMn-LP (leicht pigmentiert) und -DP (stark (dark) pigmentiert) konnten die Vollängen-Transkripte von HERV-K nachgewiesen werden. Es konnte kein gespleißtes *env*, dafür aber gespleißtes *rec* detektiert werden. Zusätzlich zeigte sich hier eine prominente Bande bei 230bp, die in keiner weiteren untersuchten Probe detektiert wurde (siehe Abb. 4.18). MART-1 wurde in den normalen Melanozyten nicht exprimiert.

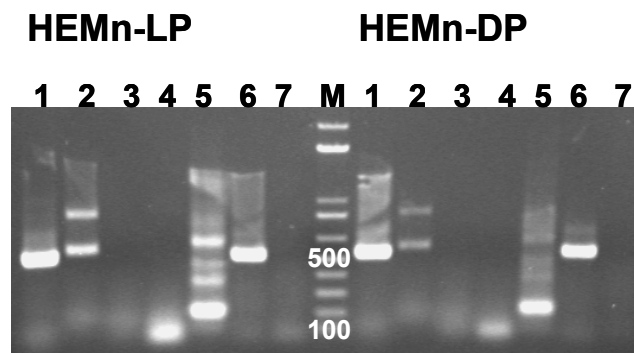


Abb. 4.18: Agarosegel der RT-PCR mit normalen Melanozyten. RT-PCR mit dem HERV-K Primern von normalen Melanozyten; M Marker, 1 P2+P3, 2 P4+P5, 3 P2+P5, 4 P2+P6, 5 P1+P7, 6 GAPDH und 7 DNA Kontrolle.

Bei den verwendeten Nicht-Melanomzelllinien (siehe Material und Methoden Seite 24) konnte ebenfalls in allen Proben die Expression der Vollängen-mRNA von HERV-K nachgewiesen werden. Gespleißtes *env* konnte in nur 2 von 16 (13%), gespleißtes *rec* in und *np9* in keiner Probe nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3 Seite 61). Im Gegensatz zu den Melanomzelllinien und -geweben waren die Banden schwach, was trotz der semiquantitativen RT-PCR auf eine geringe Expression schließen lässt. MART-1 wurde nicht exprimiert (siehe Anhang Seite V).

Melanomgewebe und Melanomzelllinien

Das in 4.1.1 (siehe Seite 45 und Anhang Seite II) beschriebene Primerset bestehend aus sieben Primern wurde verwendet, um die Expression von HERV-K in den verschiedenen Melanomproben zu bestimmen. Alle vorhandenen Gewebeproben und Zelllinien wurden auf die Expression von Vollängen- und gespleißter HERV-K mRNA getestet.

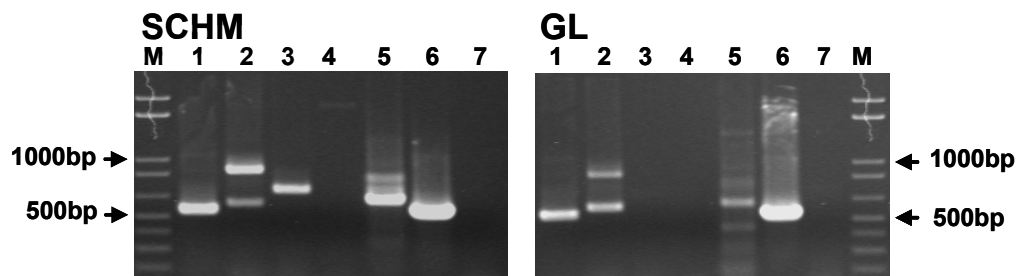


Abb. 4.19: Exemplarisches Agarosegel der RT-PCR mit Melanomproben. RT-PCR mit dem HERV-K Primern von Melanomgewebe SCHM und -zelllinie GL (Anhang Seite IV und V); M Marker, 1 P2+P3, 2 P4+P5, 3 P2+P5, 4 P2+P6, 5 P1+P7, 6 GAPDH und 7 DNA Kontrolle.

In allen Proben, Geweben und Zelllinien ließ sich die Vollängen-mRNA nachweisen. Von den getesteten Melanomgeweben konnte in 35% (17 von 49) gespleißtes *env* und in 39% (19 von 49) gespleißtes *rec* nachgewiesen werden, zusätzlich konnte die 1,5kb mRNA in vier der *rec* positiven Proben detektiert werden. In 26% der Gewebe konnte gespleißtes *np9* nachgewiesen werden. In den getesteten Melanomzelllinien konnte bei 36% (15 von 42) gespleißtes *env* und in 40% (17 von 42) gespleißtes *rec* detektiert werden, die 1,5kb mRNA in 2 der *rec* positiven Proben nachgewiesen werden. 19% der Zelllinien waren positiv für gespleißtes *np9* (siehe Anhang Seite V).

Tabelle 3: Expression von HERV-K

	Gewebe		Zelllinien		Nicht-Melanomzelllinien	
Volllänge	49	100%	42	100%	16	100%
<i>env</i>	17	35%	15	36%	2	13%
<i>rec</i>	19	39%	17	40%	0	0%
1,5kb	4	10%	5	12%	0	0%
<i>np9</i>	13	26%	8	19%	0	0%
gesamt	49	100%	42	100%	16	100%

Das parallele Vorhandensein von 24 Melanombiopsien und daraus entstandener Zellkultur erlaubte es, die Expression von HERV-K in Gewebe und Zellkultur zu vergleichen. Generelle unspezifische Aktivierungen der Expression von HERV-K aufgrund von Kultivierung konnten so ausgeschlossen werden. In 19 Biopsien und Zelllinien stimmte die Expression von HERV-K überein. In drei Fällen war eine in der Biopsie nachweisbare Expression von gespleißtem *env* und *rec* in der Zellkultur nicht nachweisbar. Da nicht alle Zellen eines Tumors HERV-K gleichermaßen spleißen, scheinen hier HERV-K negative Zellen angewachsen zu sein. Jedoch ist in zwei Zelllinien die Expression gespleißter RNA erst bei der Kultivierung aufgetreten (siehe Anhang Seite V).

4.2.4 Real-time RT-PCR zur quantitativen Bestimmung der Expression von HERV-K

GH Kalibrator-RNA und normale Zelllinien

Da sich eine one-step RT-PCR schlecht mit der PCR eines Plasmidstandards vergleichen lässt, wurde zur Quantifizierung der Expression GH-RNA als Kalibrator festgelegt (GH-Zellen weisen eine stetige Expression aller HERV-K mRNA Spezies auf). Sämtliche Proben wurden auf diesen Standard bezogen. Um die Variabilität möglichst gering zu halten, wurde ein Stock an GH Gesamt-RNA hergestellt (positiv Kontrolle der HERV-K Expression), welcher für die einzelnen Vergleiche herangezogen wurde. Dieser Stock wurde ebenfalls für die Optimierung der Reaktionsbedingungen und die Bestimmung der Effizienzen eingesetzt.

Statt der von K. Livak [1997] verwendeten Methode, die Proben über die Expression eines Haushaltsgenes und in Bezug auf den Kalibrator ($\Delta\Delta C_T$) abzugleichen, wurden anstelle des Abgleichs durch die Expression eines Haushaltsgenes gleiche Mengen an Gesamt-RNA in den Assay eingesetzt (ΔC_T). Die Effizienzen der einzelnen Reaktionen wurden ebenfalls in den Berechnungen berücksichtigt.

Zunächst wurde die Expression von HERV-K in SK-MEL-28-, 293-, C8166-Zellen und normalen PBMCs in Bezug auf GH bestimmt. Bei 293-, C8166-Zellen und normalen PBMCs ließ sich, wie auch schon in der semiquantitativen PCR, lediglich die Vollängen- und gespleißte *rec*-mRNA nachweisen. Die Expression der Vollängen-mRNA liegt bei ca. 2% von GH, die der *rec*-mRNA noch darunter. SK-MEL-28-Zellen dagegen weisen eine HERV-K Expression von ca. 50% von GH auf. Bei gespleißtem *rec* ist sie sogar annähernd gleich der Expression bei GH (siehe Abb. 4.20).

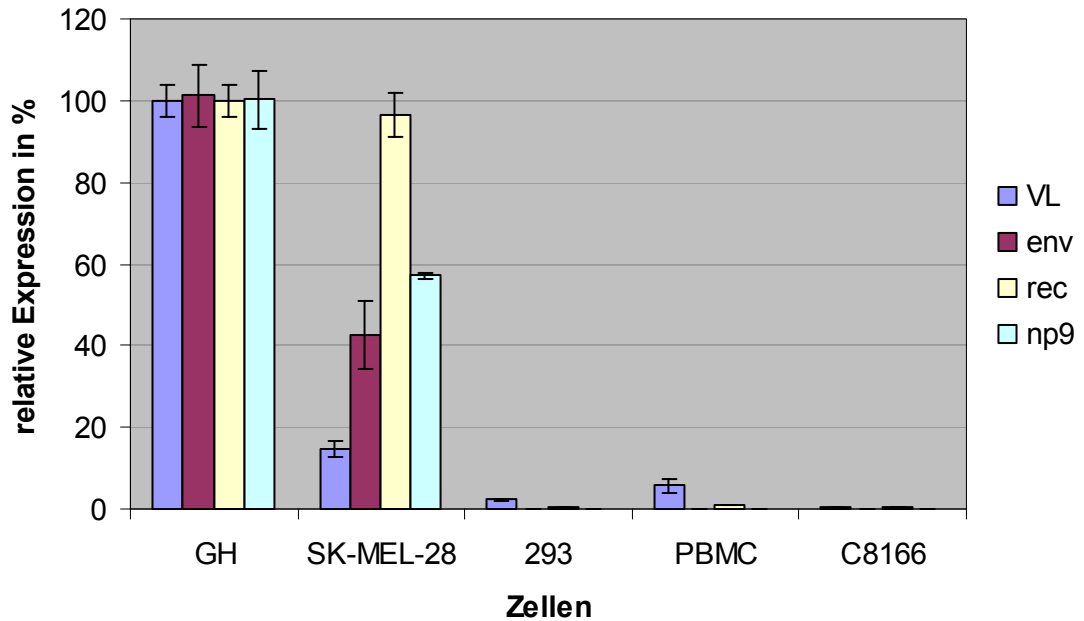


Abb. 4.20: Relative Expression von HERV-K. Dargestellt ist die relative Expression der HERV-K Transkripte in SK-MEL-28-, 293-, C8166-Zellen und PBMCs in Bezug auf GH.

Melanomgewebe und Melanomzelllinien

Bei den Melanomgeweben wurde die zuvor in der semiquantitativen PCR für die Expression von gespleißter HERV-K mRNA positiven Proben getestet, um quantitativ die Menge der Expression abschätzen zu können.

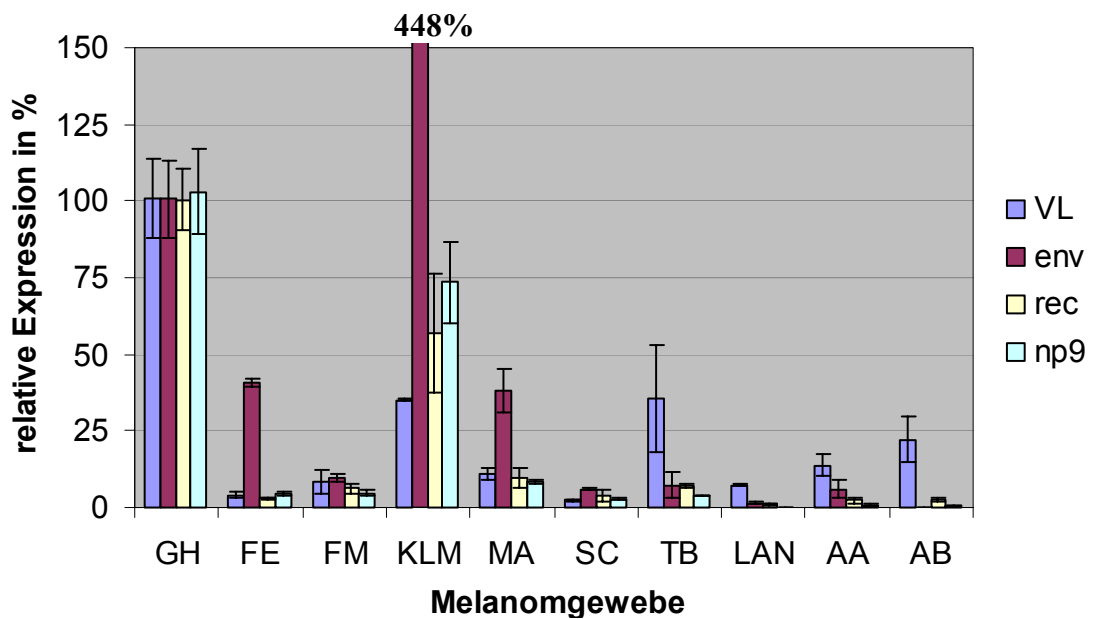


Abb. 4.21: Relative Expression von HERV-K. Dargestellt ist die relative Expression der HERV-K Transkripte in FE-, FM-, KLM-, MA-, SC-, TB-, AA- und AB- Melanomgeweben, AB zeigte in der semiquantitativen PCR nur eine schwache Bande und LAN-Gewebe war negativ für gespleißte HERV-K mRNA (siehe Anhang Seite IV). Jeweils in Bezug auf GH-mRNA.

Die Gewebe FE, FM, KLM, MA, SC, TB und AA (siehe Anhang Seite IV) waren in der vorhergegangenen semiquantitativen PCR positiv für gespleißtes HERV-K. In der real-time RT-PCR ließ sich ebenfalls für alle Proben gespleißte mRNA nachweisen. Der Prozentsatz in Bezug auf GH variiert, bei KLM ist er verglichen mit den anderen Gewebeproben sehr hoch, vor allem der Anteil an gespleißter *env*-mRNA (siehe Abb. 4.21). Bei den anderen Geweben liegt die Expression zwischen 5% und 10% von GH, wobei die Expression gespleißter *env*-mRNA bei FE und MA gegenüber den anderen mRNAs mit 40% von GH auch besonders erhöht ist. Die Gewebeprobe AB zeigte in der semiquantitativen PCR nur eine schwache Bande und zeigt auch in der quantitativen Bestimmung die niedrigste Expression. Die Gewebeprobe LAN zeigte kein gespleißtes HERV-K in der semiquantitativen PCR und auch in der real-time PCR nur eine geringe Expression. Gegenüber anderen negativen Proben (293, C8166-Zellen oder normalen PBMCs, siehe Seite 62f) lässt sich jedoch gespleißtes *env* nachweisen (siehe Abb. 4.21).

Tabelle 4: relative Expression von HERV-K in Melanomgeweben

Gewebe	relative Expression in %			
	VL	<i>env</i>	<i>rec</i>	<i>np9</i>
GH	100,0	101,8	100,5	107,6
FE	4,2	40,7	2,9	4,5
FM	8,4	9,8	6,2	4,7
KLM	53,7	448,1	72,7	108,8
MA	10,8	38,4	9,5	8,4
SC	2,3	6,0	3,8	2,7
TB	35,8	7,4	7,2	4,0
LAN	7,4	1,6	1,0	0,3
AA	13,9	6,0	2,6	0,9
AB	22,3	0,2	2,6	0,4

Von den Melanomzelllinien wurden ebenfalls nur die in der semiquantitativen PCR für gespleißtes HERV-K positiv getesteten Zellen für die Quantifizierung der Expression eingesetzt. Bei den Proben BA, LAU, SCHM, SCHW und ZO (siehe Anhang Seite V) ließ sich in der real-time RT-PCR ebenfalls für alle Proben gespleißte mRNA nachweisen. Der Prozentsatz an gespleißter RNA in Bezug auf GH variiert auch hier, bei SCHW ist er mit 50% (*env* und *np9*) und 68% (*rec*) von GH relativ hoch. Bei den anderen Geweben liegt die Expression zwischen 2% und 10% von GH, wobei die Expression gespleißter mRNA im allgemeinen niedriger ist als bei den Gewebeproben (siehe Abb. 4.22).

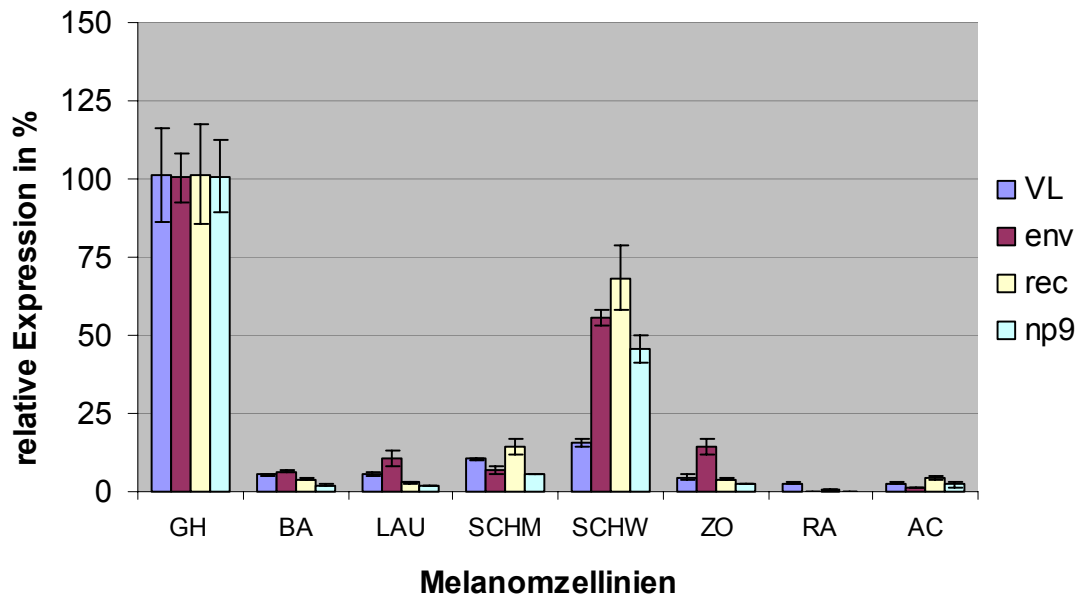


Abb. 4.22: Relative Expression von HERV-K. Dargestellt ist die relative Expression der HERV-K Transkripte in BA-, LAU-, SCHM-, SCHW-, ZO- und AC-Melanomzellen, RA- Zellen waren in der semiquantitativen PCR negativ für gespleißtes HERV-K mRNA (siehe Anhang Seite V). Jeweils in Bezug auf GH mRNA.

Die Zelllinie RA war in der semiquantitativen PCR negativ für gespleißtes HERV-K und zeigt auch in der real-time PCR nur eine geringe Expression der Vollängen-mRNA. Wie bei anderen für die Expression von HERV-K negativen Proben (293, C8166 oder normalen PBMCs siehe Seite 62 f) lässt sich kein gespleißtes *env* oder *np9* nachweisen (siehe Abb. 4.22).

Tabelle 5: Relative Expression von HERV-K in Melanomzelllinien

Zellen	relative Expression in %			
	VL	<i>env</i>	<i>rec</i>	<i>np9</i>
GH	101,1	100,3	101,4	100,7
BA	5,3	6,4	3,9	2,1
LAU	5,5	10,6	3,1	1,9
SCHM	10,4	6,9	14,3	5,8
SCHW	15,8	55,6	68,4	45,5
ZO	4,6	14,4	4,0	2,2
RA	2,6	0,1	0,5	0,0
AC	2,7	1,2	4,6	2,3

Die Expression von HERV-K mRNA wurde in Proben von denen parallel Gewebe und Zelllinien vorhanden sind, ebenfalls quantitativ bestimmt. Exemplarisch wurden zwei Proben miteinander verglichen. Das Muster der Expression von HERV-K stimmte in den Biopsien und den Zelllinien überein, jedoch trat eine Steigerung der Volllängen-mRNA von 2% bzw. 4% im Gewebe auf 5% bzw. 6% in den Zelllinien auf. Damit konnte neben einer generellen unspezifischen Aktivierung auch eine Erhöhung der Expression von gespleißten HERV-K Transkripten aufgrund von Kultivierungsbedingungen ausgeschlossen werden (siehe Abb. 4.23).

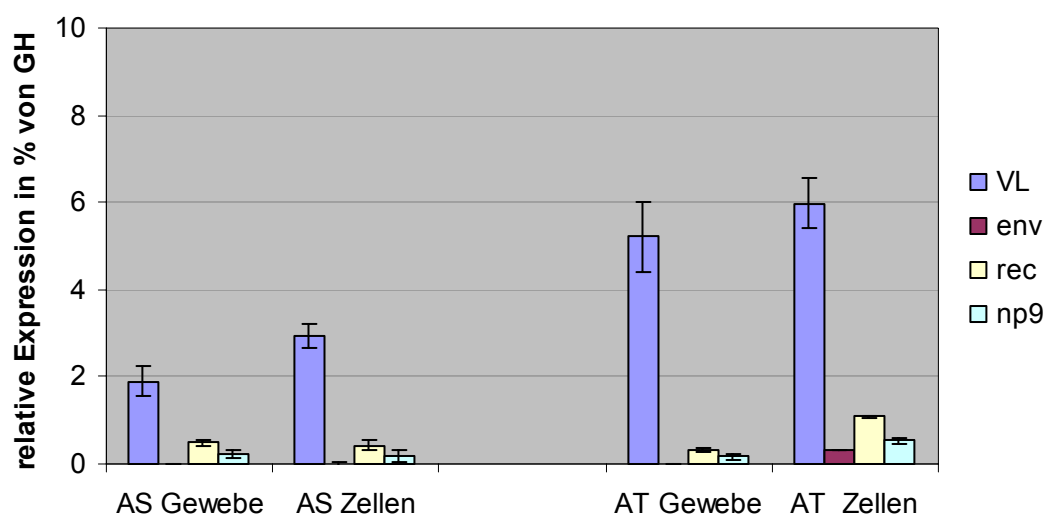


Abb. 4.23: Relative Expression von HERV-K in Ausgangsgeweben und korrespondierenden Zelllinien. Dargestellt ist die relative Expression der HERV-K Transkripte in AS- und AT Melanomen und Zelllinien. Jeweils in Bezug auf GH mRNA.

4.2.5 Expression von HERV-K Proteinen

Die Expression von HERV-K Proteinen wurde mit Hilfe spezifischer Antiseren und den entsprechenden Präimmunsereen untersucht (siehe Anhang, Seite VI). Um zunächst die Expression HERV-K spezifischer Proteine in normalen Geweben zu untersuchen, wurde ein kommerzieller Westernblot der Firma USBiological verwendet. Die Expression von HERV-K in Melanometastasen wurde zum einen über isoliertes Gesamtprotein im Westernblot und zum anderen mittels Immunfluoreszenz und Immunhistologie untersucht.

HERV-K Proteine im Westernblot

Für die Analyse der Expression von HERV-K Proteinen im Westernblot wurden von jeder Probe 20µg Gesamtprotein pro Gelspur aufgetragen. Gesamtprotein von GH-Zellen wurde als Positiv-Kontrolle und von 293-Zellen als Negativ-Kontrolle mitgeführt.

Eine spezifische Bande bei 36kDa in Höhe des prozessierten gp36/TM-Protein lässt sich bei GH- und SK-MEL-28 Zellen nachweisen, zudem kann in SK-MEL-28-Zellen das Env-Vorläuferprotein bei 80kDa nachgewiesen werden. In 293-Zellen lässt sich keine der spezifischen Banden detektieren, das Präimmunsereum zeigt keine Banden (siehe Abb. 4.24).

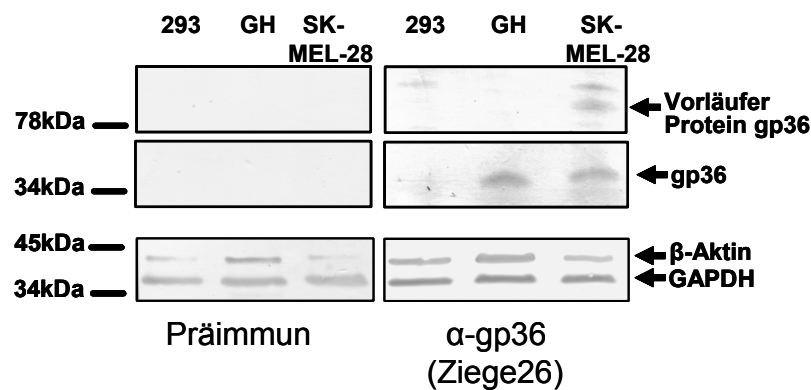


Abb. 4.24: Westernblotanalyse zur HERV-K gp36 Expression. Westernblot mit je 20µg Gesamtprotein von GH-, 293- und SK-MEL-28-Zellen und Ziegenserum 26 spezifisch für HERV-K TM. Vorläuferprotein und gp36 sind markiert. GAPDH und β-Aktin zeigen die gleichmäßige Beladung.

Expression von HERV-K Proteinen in normalen Geweben

Der kommerzielle Western Blot IV von US Biological ist mit je 50µg Zelllysate aus folgenden unveränderten Geweben bestückt: Herz, Leber, Pankreas, Testis, Prostata und Plazenta. Der Blot wurde mit Seren gegen HERV-K gp36/TM, Np9 und Rec sowie den entsprechenden Präimmunsereen, soweit vorhanden, getestet (siehe Anhang Seite VI).

Mit Antiseren gegen HERV-K Np9 und Rec konnte in keinem der Gewebe eine Expression der Proteine nachgewiesen werden, die entsprechenden Präimmunsereen waren ebenfalls negativ. Mit dem Ziegenserum 26 gegen HERV-K gp36/TM konnte in Herz, Leber, Pankreas, Testis und Plazenta eine spezifische Bande bei 30kDa anstelle von 36kDa festgestellt werden, wobei in Plazentagewebe die Expression erhöht ist (siehe Abb. 4.25). In Prostatagewebe dagegen lässt sich kein Protein dieser Größe nachweisen. Dies geht konform mit den Ergebnissen der semiquantitativen RT-PCR, bei der sich in humanen Prostatakarzinomzellen (LNCaP, zur Verfügung gestellt von O.Hohn, RKI) nur Vollängen-mRNA und keine gespleißte mRNA nachweisen lässt.

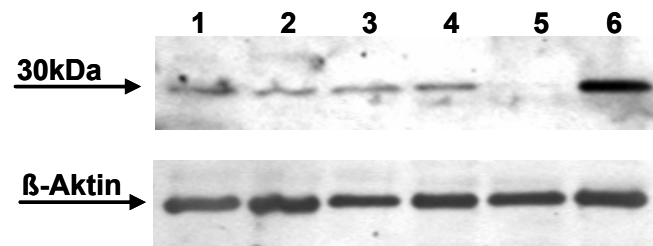
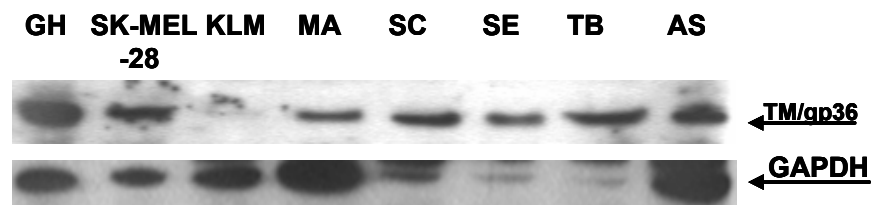


Abb. 4.25: Westernblotanalyse zur HERV-K gp36 Expression in normalen Geweben. Westernblot mit je 50µg Gesamtprotein aus 1 Herz-, 2 Leber-, 3 Pankreas-, 4 Testis-, 5 Prostata- und 6 Plazentagewebe mit Ziegenserum 26 spezifisch für HERV-K TM/gp36. β-Aktin zeigt die gleichmäßige Beladung.

Expression von HERV-K Proteinen in Melanommetastasen

Die in der RT-PCR für HERV-K Expression positiv getesteten Proben wurden auch auf die Expression des Proteins HERV-K gp36/TM untersucht.

Melanomgewebe



Melanomzelllinien

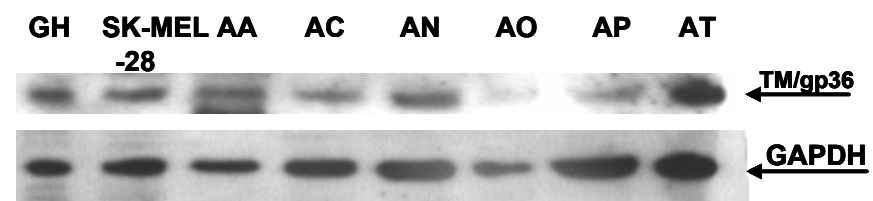


Abb. 4.26: Westernblotanalyse zur HERV-K gp36 Expression in Melanomgeweben und -zelllinien. Westernblot mit je 30µg Gesamtprotein aus den entsprechenden Geweben bzw. Zelllinien (siehe Anhang Seite IV und V) mit Ziegenserum 26 spezifisch für HERV-K TM/gp36. GAPDH zeigt die gleichmäßige Beladung des Gels.

Insgesamt wurden neun Melanomgewebe auf die Expression von HERV-K gp36/TM getestet. Von diesen konnte in sieben ein Protein nachgewiesen werden, zum Teil war die Expression jedoch relativ schwach wie bei TB und SE, hier ist jedoch auch die Anfärbung von GAPDH schwach (siehe Abbildung 4.26). Insgesamt zeigt dieses Gel trotz der gleichen Auftragsmenge eine recht ungleichmäßige Beladung, so dass lediglich eine Aussage über das Vorhandensein und nicht über die relative Menge getroffen werden kann. Von sechs untersuchten Melanomzelllinien konnte in fünf HERV-K-gp36/TM klar nachgewiesen werden, bei AO dagegen nur schwach (siehe Abbildung 4.26).

Mit dem Antiserum gegen HERV-K Np9 konnte in keinem der Gewebe oder Zellen eine Expression des Proteins nachgewiesen werden.

HERV-K Proteine in der Immunfluoreszenz

Um zu bestimmen, ob das TM-Protein von HERV-K in Melanomzellen auf der Oberfläche exprimiert wird, wurde zunächst eine Immunfluoreszenz mit Ziegen Serum 26, spezifisch für HERV-K gp36/TM und permeabilisierten Zellen, durchgeführt. GH- und SK-MEL-28-Zellen zeigen die Expression von TM-Protein (siehe Abb. 4.27 a und c), 293-Zellen dagegen sind negativ (siehe Abb. 4.27 e). Das Muster der Färbung bei GH- und SK-MEL-28-Zellen sieht ähnlich aus und zeigt Cluster von Viruspartikeln an der Zelloberfläche. Das Präimmunsrum zeigt bei allen Zellen keine Reaktion (siehe Abb. 4.27 b, d und f).

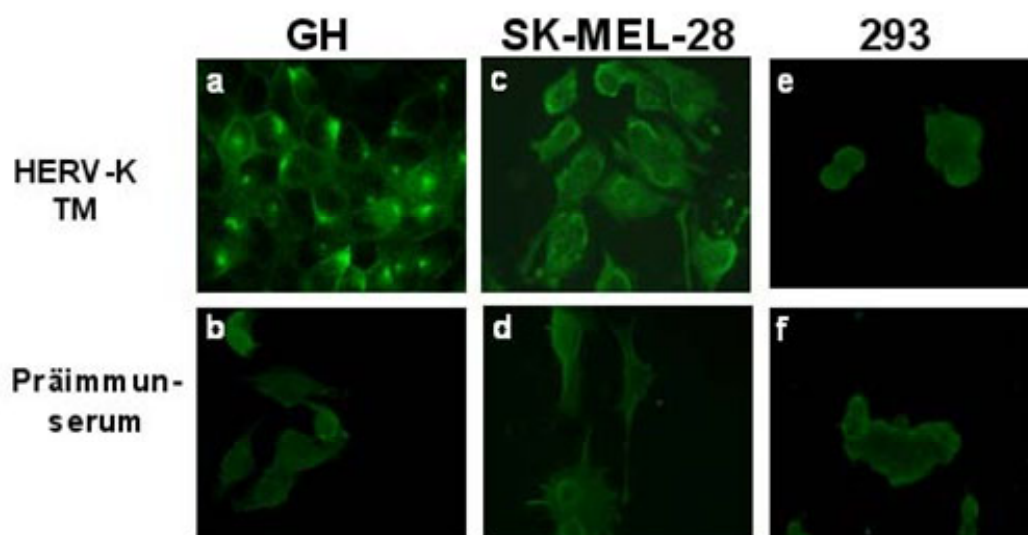


Abb. 4.27: Immunfluoreszenz mit GH-, SK-MEL-28- und 293-Zellen. Die Zellen wurden mit HERV-K gp36/TM spezifischem Ziegen Serum 26 (a, c und e) und mit Präimmunsrum (b, d und f) gefärbt.

Eine Immunfluoreszenzfärbung ohne Permeabilisierung bei SK-MEL-28-Zellen zeigt die Lokalisation der Cluster auf der Zelloberfläche. Die Färbung ist im Mikroskop deutlich über die gesamte Zelloberfläche verteilt, aber sehr schwach und lässt sich daher selbst mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop nicht zufriedenstellend darstellen (siehe Abb. 4.28).

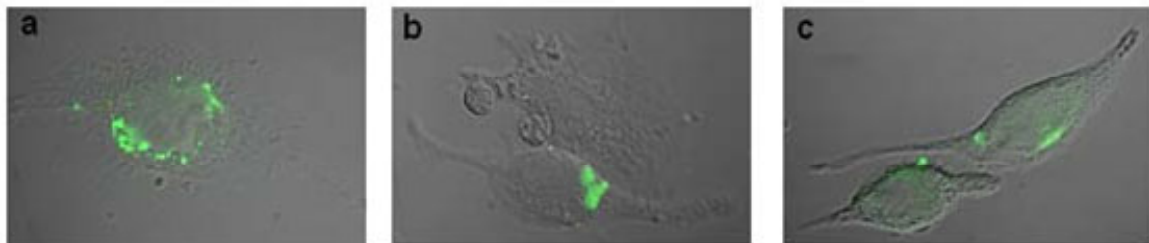


Abb. 4.28: Immunfluoreszenz mit SK-MEL-28 Zellen. Die Zellen wurden nicht permeabilisiert und mit HERV-K gp36/TM spezifischen Ziegen Serum 26 gefärbt.

Des Weiteren wurden die HERV-K Proteine Rec und Np9 bei GH-Zellen in der Immunfluoreszenz untersucht (siehe Abb. 4.29). Die Färbung von GH-Zellen mit dem spezifischen Serum bzw. Präimmunsereum für Np9 wurde analog des angegebenen Protokolls durchgeführt (siehe Material und Methoden Seite 43). Die Färbung gegen HERV-K Rec wurde von Frau S. Hahn (Paul Ehrlich Institut, Langen) angefertigt.

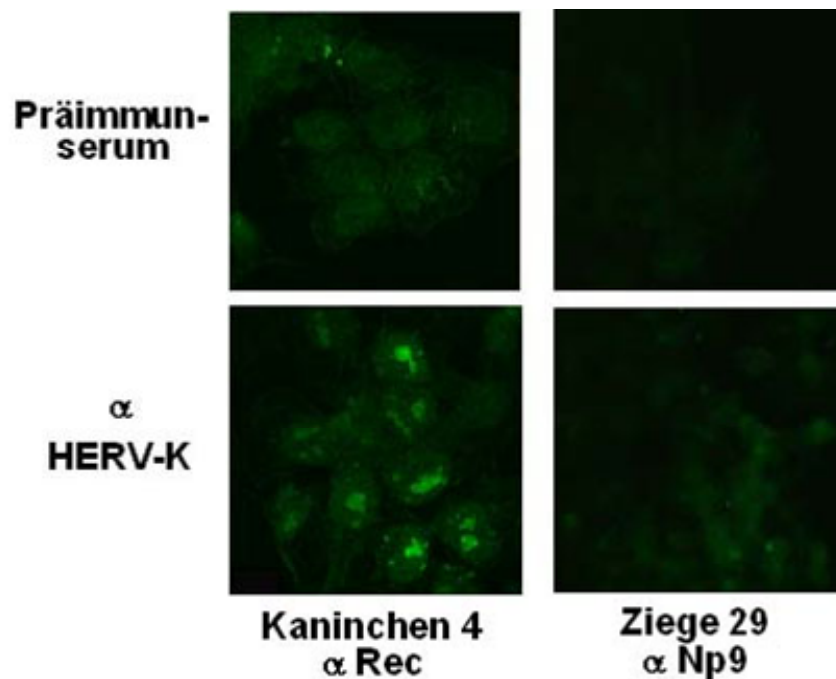


Abb. 4.29: Immunfluoreszenz mit GH-Zellen. Die Zellen wurden mit spezifischen Seren gegen die HERV-K Proteinen Rec (Kaninchen 4) und Np9 (Ziege 29) sowie den entsprechenden Präimmunsereum gefärbt.

Trotz der in Bezug auf GH geringen Expression von gespleißtem Env in den Melanomzelllinien, wurde eine Immunfluoreszenz mit Seren gegen die Proteine gp36/TM, Rec und Np9 durchgeführt. Obwohl auch im Westernblot bei diesen Zellen das Transmembranprotein nachweisbar war, konnte bei keiner der getesteten Zellen eine Färbung beobachtet werden.

HERV-K Proteine in der Immunhistologie

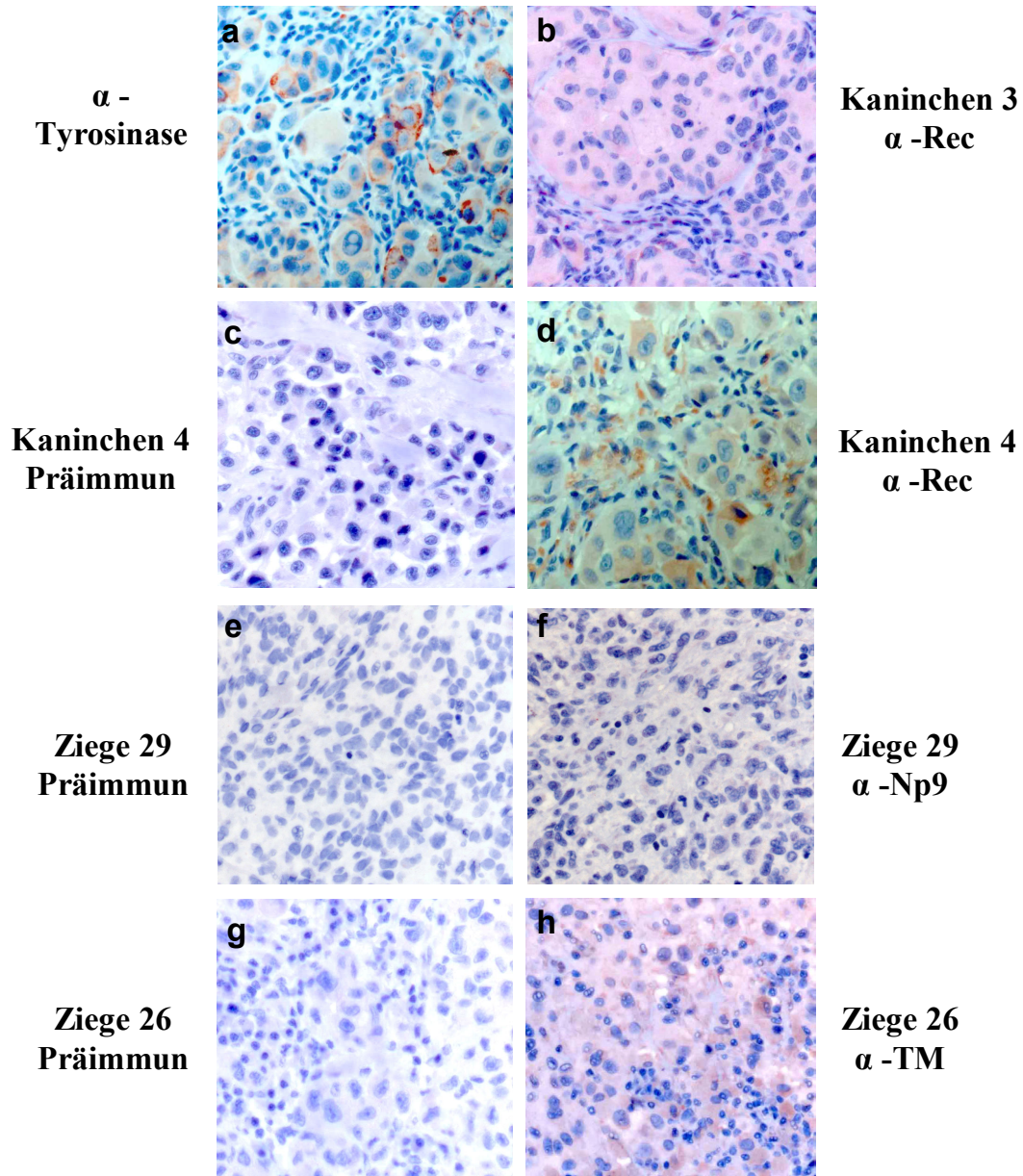


Abb. 4.30: Immunhistologische Färbung von Melanommetastasen. Die Schnitte wurden mit Antikörpern spezifisch für verschiedene HERV-K Proteine und den entsprechenden Präimmunsereen gefärbt, um die Expression von HERV-K Proteinen zu untersuchen.

Die Expression von HERV-K Proteinen wurde zudem im Melanom-Primärtumoren und Metastasen mittels Immunhistologie untersucht. Um den Tumor zu lokalisieren und den Melanomcharakter zu charakterisieren wurde zunächst mit Melanommarkern gefärbt. Hierfür wurden die Antikörper HMB45, spezifisch für gp100, und anti-Tyrosinase verwendet (siehe Abb. 4.30). Die Expression von HERV-K Gag- und gp36/TM-Proteinen konnte so in den Melanomzellen gezeigt werden, wobei das den Tumor umgebende Gewebe nicht angefärbt wurde. Die entsprechenden Präimmunsereen zeigten keine Reaktion. Nicht jede Tumorzelle ist gefärbt, was darauf hinweist, dass HERV-K nicht in jeder Zelle gleichermaßen exprimiert wird. Drei von sechs (50%) Primärtumoren sind positiv für HERV-K TM und vier von fünf (80%) sind positiv für HERV-K Gag. Von den untersuchten Metastasen sind 15 von 36 (42%) positiv für HERV-K TM und 35 von 44 (80%) positiv für Gag.

Tabelle 6: Immunhistologie von HERV-K Proteinen in Primärtumoren und Metastasen

	Primärtumore		Metastasen				
	HERV-K	HERV-K	HERV-K	HERV-K	HERV-K	HERV-K	HMB45
	TM	Gag	TM	Gag	Rec	Np9	
gesamt	6	5	36	44	21	21	21
positive	3	4	15	35	3	0	14
negative	3	1	21	9	18	21	7

4.2.6 HERV-K spezifische Antikörper in Seren von Melanopatienten

102 Seren von Melanopatienten wurden zusammen mit 20 Seren von Patienten mit Alopezie und 25 Seren von normalen Blutspendern auf Antikörper gegen HERV-K Proteine untersucht. 17% (17 von 102) der Seren von Melanopatienten reagierten positiv mit dem rekombinanten HERV-K TM Protein im Westernblot (siehe Tabelle 4 Anhang Seite VII). Die gleichen Seren wurden im Westernblot auf spezifische Antikörper gegen HERV-K Np9 (siehe Tabelle 4 Anhang Seite VII) und von Frau S. Hahn am Paul Ehrlich Institut auf spezifische Antikörper gegen HERV-K Rec getestet. Gegen beide Proteine zeigte sich jedoch keine Reaktion. Von den getesteten Seren der Alopeziepatienten oder normalen Blutspendern reagierte keines positiv.

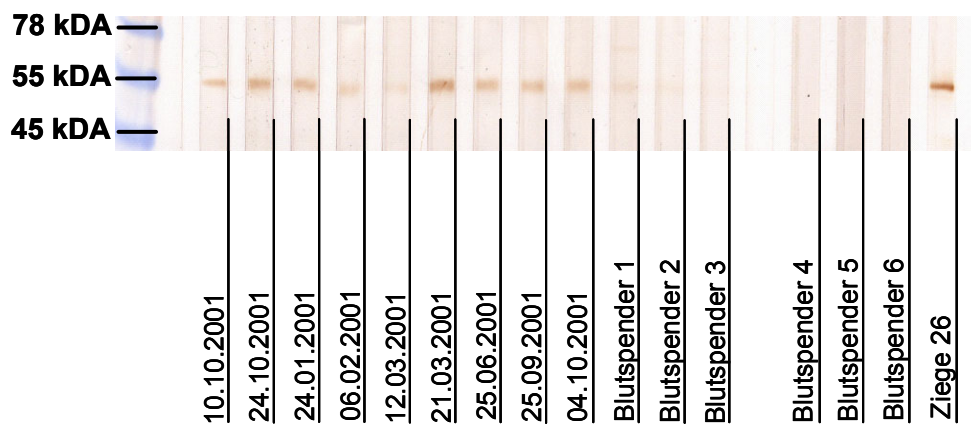


Abb. 4.31: Westernblot Analyse mit rekombinantem HERV-K TM. Serum von Patient LAN über den Verlauf der Zeit getestet auf Antikörper gegen HERV-K TM.

Der Krankheitsverlauf eines Patienten wurden genauer studiert. Von Patient LAN wurde über die Zeit von einem Jahr neun Seren gesammelt und das Level des Serummarkers für malignes Melanom, MIA (Melanoma inhibiting activity) bestimmt. An den Zeitpunkten 0, 17 und 22 Wochen nach der ersten Tumordiagnose war das MIA Level besonders hoch und korrelierte mit dem Auftreten eines Tumors. An diesen Zeitpunkten ist das Level der HERV-K spezifischen Antikörper in Westernblot niedriger als zu den anderen Zeitpunkten (siehe Abb. 4.31).

Tabelle 7: Klinische Daten von Patient LAN

Datum der Blutentnahme	Tumor	MIA Level
10.10.2001	+	14,9
24.10.2001	-	11,6
24.01.2002	-	15,1
06.02.2002	+	11,4
12.03.2002	+	19,7
21.03.2002	-	17,5
25.06.2002	-	9,3
25.09.2002	-	9,3
04.10.2002	-	9,4

4.2.7 Infektionsversuche mit HERV-K Partikeln

Die Produktion von HERV-K Partikeln wurde für GH-Zellen nachgewiesen, daher wurde die Melanomzelllinie SK-MEL-28 auf die Produktion von infektiösen Viruspartikeln getestet.

Zunächst wurden Überstände von SK-MEL-28- und GH-Zellen auf die Aktivität von Reverser Transkriptase getestet und waren positiv. Zusätzlich wurden Pellets aus der Ultrazentrifugation der Überstände positiv im RT-Test getestet sowie auch in der RT-PCR für virale HERV-K RNA. Dies ließ die Produktion von viralen Partikeln von GH- und SK-MEL-28-Zellen vermuten (siehe Abb. 4.32).

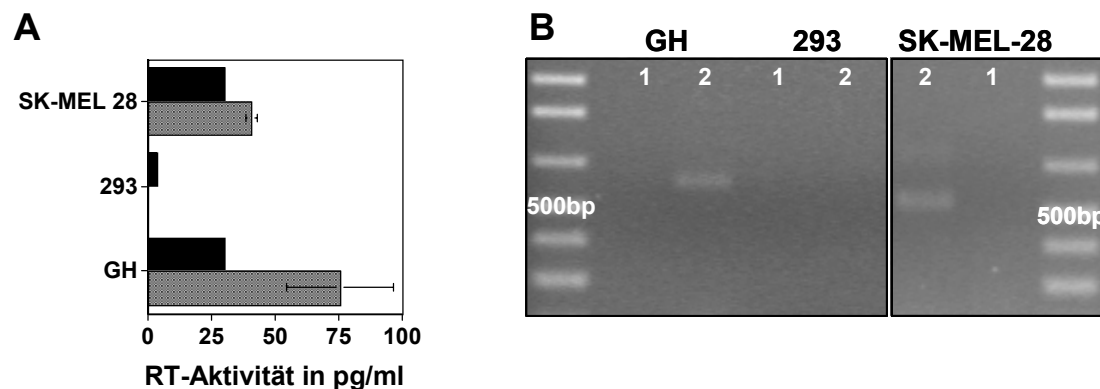


Abb. 4.32: Bestimmung der Aktivität von Reverser Transkriptase in Zellkulturüberständen und Nachweis viraler HERV-K RNA im Viruspellet. (A) Bestimmung der RT-Aktivität im Zellkulturüberstand (schwarz) und im Viruspellet der Ultrazentrifugation von Zellkultur-überständen (grau) von SK-MEL-28-, 293- und GH-Zellen. **(B)** RT-PCR Nachweis viraler HERV-K Vollängen-RNA im Viruspellet aus GH-, 293-, und SK-MEL-28-Zellen. 1 keine RT zur Kontrolle von kontaminierender (zellulärer) DNA; 2 HERV-K Vollängen Nachweis mit Primer-paar P2 und P3 (siehe Seite 47).

Infektionsversuche wurden mit virushaltigen Überständen von SK-MEL-28- und GH-Zellen auf Nicht-humanen PG4-, 3T3- und MDBK-Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurden Kokultivierungen mit den virusproduzierenden Zellen durchgeführt, da der Kontakt der Zellen eine Infektion forcieren kann.

Mittels PCR ließ sich jedoch in den zu infizierenden Zellen, sowohl aus den Infektionen mit Überstand, wie auch aus der Kokultivierung bei MDBK- und 3T3- Zellen kein Provirus nachweisen. Auch wenn HERV-K spezifische Signale nach der Infektion in PG4-Zellen nachgewiesen werden konnte, verlor sich dieses Signal nach spätestens vier Passagen.

Im Pellet aus dem Überstand von SK-MEL-28-Zellen konnten von Frau Holland und Herrn Özel [Robert Koch-Institut, Özel et al. 1988] in der Elektronenmikroskopie Strukturen, ähnlich den aus GH-Zellen gezeigten HERV-K Partikeln [Boller et al. 1993], dargestellt werden. Allerdings erscheinen diese pleiomorph und zeigen nicht die typische Form retroviraler Partikel (siehe Abb. 4.33).

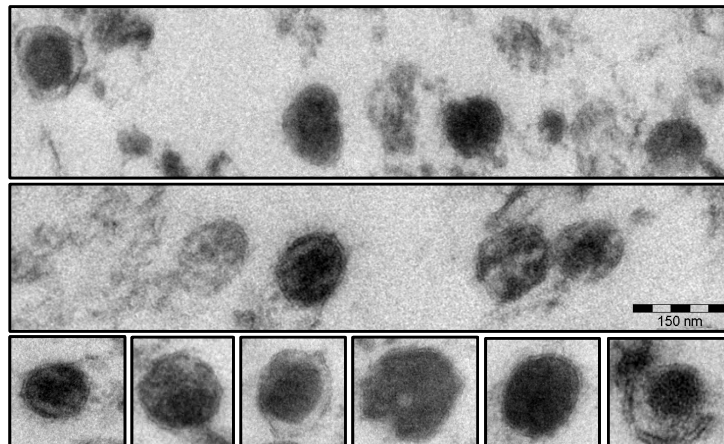


Abb. 4.33: HERV-K Partikel im Pellet aus dem Überstand von SK-MEL-28-Zellen. Dargestellt sind pleiomorphe Strukturen, die retroviralen Partikeln ähnlich sehen, aber defekt zu sein scheinen. 150nm sind angezeigt.

4.3 Expression von HERV-K in humanen embryonalen Stammzellen

4.3.1 Expression von HERV-K in humanen embryonalen Stammzellen

Um den Expressionstatus von HERV-K in embryonalen Stammzellen zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA aus drei verschiedenen Stammzelllinien, H9 und dessen Subklon H9.2 sowie I3, verwendet. Alle Zelllinien sind zunächst auf murinen Feederzellen (MEF) und später auf humanen Feederzellen (HFF) kultiviert worden. Die Kultivierung der Zellen sowie die Aufreinigung von Gesamt-RNA und Proteinen wurde von Frau S. Terstegge (Institut für Rekonstruktive Neurobiology, LIFE & BRAIN GmbH Cellomics Unit, Bonn), durchgeführt. Die Expression von HERV-K Vollängen-mRNA, gespleißter *env*-, *rec*- und *np9*-mRNA ließ sich in allen Zellen nachweisen. Die einzelnen Zelllinien wurden miteinander verglichen und in Bezug auf die Expression von HERV-K in GH Zellen getestet. Eine Schwierigkeit hierbei lag darin, dass zwar von allen Proben gleich viel Gesamt-RNA eingesetzt wurde, jedoch der Anteil der RNA der Feederzellen, human wie murin, nicht zu bestimmen war. Daher ist ein exakter Vergleich hier nicht möglich.

Dennoch zeigte sich, dass die Expression in den hESC bei ca. 10% von GH lag (siehe Abb. 4.34) und erhöht ist. Auch ließ sich, im Gegensatz zu 293-, C8166-Zellen und normalen PBMCs, gespleißtes *env* und *np9* nachweisen (siehe Abb. 4.20, Seite 62 f).

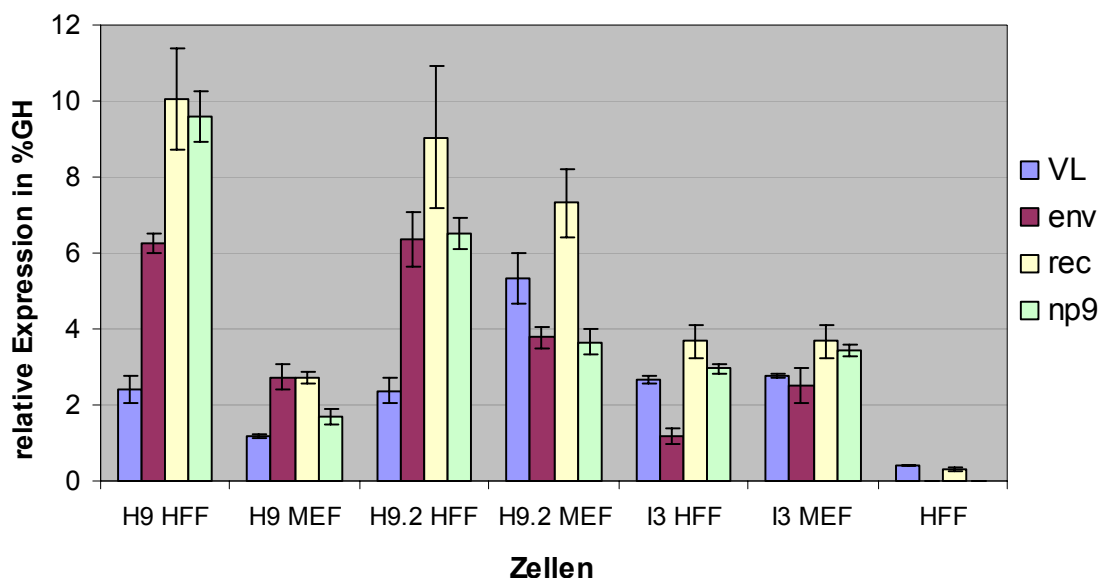


Abb. 4.34: Relative Expression von HERV-K in humanen embryonalen Stammzellen. Dargestellt ist die relative Expression der HERV-K Transkripte in humanen embryonalen Stammzelllinien in Bezug auf GH-Zellen. Stammzelllinien H9, H9.2 und I3 jeweils mit humanen (HFF) bzw. murinen (MEF) Feederzellen kultiviert.

4.3.2 Veränderung der HERV-K Expression während der Differenzierung

Um Veränderungen in der Expression von HERV-K während der Differenzierung nachzuvollziehen, wurden zunächst nur wenige Stadien miteinander verglichen. Von den Ausgangszelllinien I3-MEF und H9.2-MEF (Passagen 50 und 60) wurden differenzierte neuronale Vorläuferzellen (neuronal progenitor; NP-H9.2 bzw. NP-I3) untersucht, zudem wurden Zellen eines Zwischenstadiums (Embryoid Bodies (EBs)) analysiert.

Wie in Abb. 4.34 gezeigt, liegt die Expression von HERV-K in den humanen embryonalen Stammzellen unter 10% in Bezug auf GH. Nach der Differenzierung sinkt die Expression auf ein Level vergleichbar mit anderen Zellen, die negativ für gespleißtes HERV-K sind (293-, C8166-Zellen oder normale PMBCs; siehe Abb. 4.20, Seite 62 f). Gespleißtes *env* ist nicht mehr detektierbar (siehe Abb. 4.35). Die Schwierigkeit, dass der Anteil an RNA von Feederzellen nicht bestimmt werden kann und ein exakter Vergleich nicht möglich ist, ergibt sich auch hier.

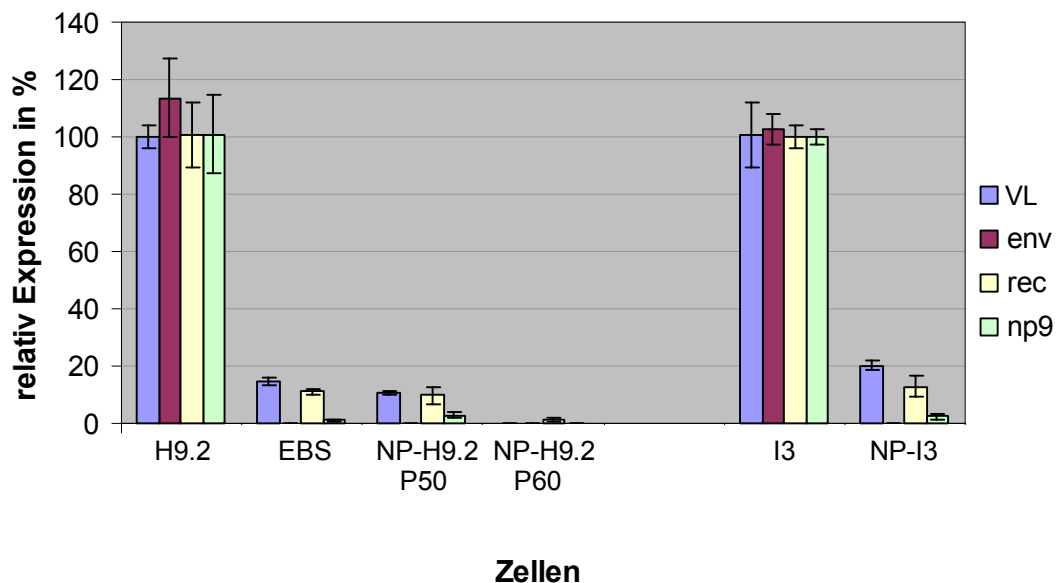


Abb. 4.35: Relative Expression von HERV-K in undifferenzierten ES-Zellen und differenzierten neuronalen Vorläuferzellen. HERV-K Expression in humanen ES Zellen und den jeweilig daraus differenzierten Zellen. Die Expression der differenzierten Zellen ist jeweils auf die hES-Ursprungszelllinie bezogen.

4.3.3 Expression von HERV-K Proteinen in embryonalen Stammzellen

Humane embryonale Stammzellen, kultiviert auf humanen bzw. murinen Feederzellen, wurden auf die Expression von HERV-K gp36/TM getestet. Es konnte in allen Stammzellproben ein Protein nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.36). Die humanen Feederzellen dagegen zeigten kein HERV-K TM/gp36 Protein. Bei den differenzierten Zellen NP-I3, NP-H9.3 und Embryoid Bodies zeigt sich analog zum Rückgang der HERV-K Expression (siehe Seite 77) auch kein oder nur noch sehr wenig (im Falle von NP-I3) TM/gp36 Protein.

Die unterschiedliche Intensität der Banden lässt auch hier, analog zur RT-PCR, keinen Rückschluss auf die Menge an vorhandenem Protein zu, da der Anteil an Proteinen aus den Feederzellen nicht bestimmt werden kann.

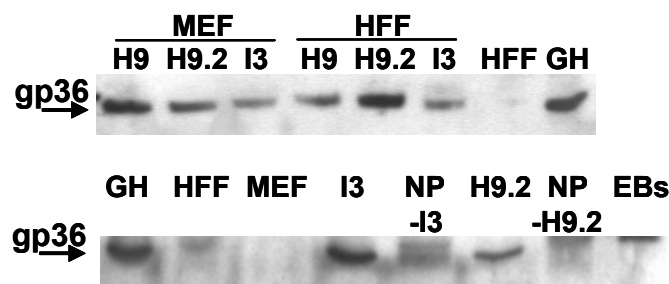


Abb. 4.36: Westernblotanalyse zur HERV-K gp36 Expression in humanen embryonalen Stammzellen und daraus differenzierten neuronalen Progenitorzellen. Westernblot mit je 30µg Gesamtprotein pro Spur (Beschriftung siehe Text Seite 83), gefärbt mit Ziegenserum 26 spezifisch für HERV-K TM. Gp36/TM ist jeweils markiert.

5. Diskussion

Ein Schwerpunkt des Humanen Genom Projektes lag in der Identifikation neuer Gene, [Venter et al. 2001, Lander et al. 2001]. Es eröffnete aber zudem die Möglichkeit, die Teile des Genoms zu untersuchen, die augenscheinlich keine genetischen Informationen enthalten. Die Eigenschaften dieser nicht kodierenden DNA, zu der auch die endogenen retroviralen Sequenzen zählen, sind bis heute nicht gut verstanden. Zwei Hauptfragen „Wie ist sie dort hin gekommen?“ und „Was ist die jetzige Funktion?“ sind zur Zeit Gegenstand der Forschung. Seit mehreren Jahren gelten retrovirale Sequenzen im Genom ein verstärktes Interesse. Die Tatsache, dass ihre exogenen Verwandten Krankheiten auslösen und die Aufrechterhaltung von offenen Leserahmen über den langen Zeitraum seit ihrer Endogenisierung bis heute, machte sie zum Studienobjekt. Seit der Verfügbarkeit der Daten des humanen Genomprojektes ist klar, dass der Anteil nicht kodierender und eben auch retroviraler Sequenzen im Genom höher ist, als zuvor geschätzt wurde. Dieser große Anteil in einem ansonsten hoch organisierten Genom und die exprimierten viralen Proteine lassen stark vermuten, dass den retroviralen Sequenzen doch eine Funktion zugrunde liegt.

5.1 HERVs: Junk-DNA oder Träger einer biologischen Funktion?

Die meisten retroviralen Sequenzen in unserem Genom kommen in vielfachen Kopien vor. Dies wirft unter anderem die Frage auf, ob sie einen Vorteil für den Wirt mit sich bringen [Best et al. 1997]. Der überwiegende Teil der retroviralen Sequenzen im Genom ist defekt und inaktiviert, dennoch haben einige Proviren offene Leseraster für Proteine aufrecht-erhalten und werden unter bestimmten Umständen exprimiert [Wilkinson et al. 1994, Löwer et al. 1996]. So kann die Expression von humanen endogenen retroviralen Sequenzen mit funktionellen Aspekten, wie der Beteiligung des HERV-W *env* Proteins Syncytin an der Bildung des Synzytiotrophoblasten während der Schwangerschaft in Verbindung gebracht werden [Mi et al. 2000]. Andererseits wird auch die Beteiligung an Autoimmunerkrankungen und bei der Entstehung von Tumoren, wenn auch kontrovers, diskutiert [Nakagawa und Harrison 1996, Conrad et al. 1997, Löwer et al. 1998, Posnet und Yarilina. 2001]. Weitere Funktionen, auch nur einiger dieser doch recht zahlreich vorhandenen endogenen Sequenzen, konnten bis heute nicht geklärt werden.

HERV-R oder auch ERV-3 liegt im Gegensatz zu anderen endogenen Retroviren nur mit einer Kopie auf Chromosom 7 vor [O'Connell et al. 1988]. Die Expression intakter *env*-Transkripte wurde in verschiedenen normalen Geweben und den korrespondierenden

Tumorgewebe nachgewiesen [Sibata et al. 1997, Andersson et al. 1998]. Im Vergleich zwischen normalen und kanzerogenem Magen- und Lungengewebe konnte aber kein Unterschied in der Expression von HERV-R *env*-Transkripten gezeigt werden. Lediglich ein Hinweis auf eine erhöhte Expression in epithelialen Geweben und Geweben wie Plazenta, Testis und Prostata ergab sich [Andersson et al. 1998 und 2002]. Jedoch lässt sich eine Expression von endogenen Sequenzen häufig in Reproduktionsgeweben finden [Löwer 1999, Rote et al. 2004]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sibata [1997] und Anderson [1998], lässt sich in den hier untersuchten Melanomgeweben und -zelllinien sowie allen Nicht-Melanomzelllinien Transkripte von HERV-R *env* nachweisen (siehe Ergebnisse Tabelle 2 Seite 58). Auch hier lässt sich kein Unterschied in der Expression zwischen normalen und tumorösen Proben feststellen. Da es sich hier jedoch um eine semiquantitative RT-PCR handelt, kann über das Niveau der Expression keine Aussage getroffen werden.

Die Expression von HERV-W ist ebenfalls gut untersucht, da der *env*-Bereich eines HERV-W Provirus für Syncitin kodiert [Blond et al. 2000]. Es sind 140 HERV-W Sequenzen beschrieben, darunter 39 Proviren, 40 Vollängen-Retroposons und 61 deletierte Sequenzen [Costas et al. 2002]. Eine Expression des *pol*-Gens verschiedener Proviren lässt sich in normalen sowie in Tumorgewebe feststellen, interessanterweise jedoch nicht in der Zelllinie LOX-IMVI (Melanom) [Yi et al. 2004]. In den hier untersuchten Nicht-Melanomzelllinien lässt sich, außer bei U87 (Astrozytom), bei allen eine Expression von HERV-W *pol* feststellen. In den untersuchten Melanomgeweben lässt sich HERV-W *pol* nur bei 23% nachweisen (siehe Ergebnisse Tabelle 2 Seite 58). Auch bei Yi et al. [2004] konnte in der Melanomzelllinie LOX-IMVI-Zellen HERV-W *pol* nicht nachgewiesen werden. Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch hier nur ca. ein Viertel der Proben eine Expression von HERV-W aufweist. Im Gegensatz dazu steht die mit 80% relativ hohe Anzahl der HERV-W *pol* exprimierenden Melanomzelllinien. Die Diskrepanz zwischen Melanomzelllinien und -gewebe ließ sich nicht weiter klären. Hier wäre die Unterscheidung der Expression von HERV-W *gag-pol* und *env* hilfreich.

Die Expression von HERV-H *gag* ließ sich in 83% der Melanomgewebe und in 61% der Zelllinien zeigen. Wie bei den anderen untersuchten HERV lässt sich HERV-H Vollängen-mRNA in fast allen Nicht-Melanomzelllinien nachweisen (siehe Ergebnisse Tabelle 2 Seite 58). Dies ist im Einklang mit den Beobachtungen, dass Transkripte von HERV-H in verschiedenen normalen und Tumorgewebe nachweisbar sind, hohe Expressionslevel sich aber vor allem in Testis und Plazenta zeigen [Stauffer et al. 2004, Forsman et al. 2005]. HERV-H Transkripte wurden bis jetzt vor allem mit T-Zell Leukämie und Multipler Sklerose

in Zusammenhang gebracht [Patzke et al. 2002, Christensen 2005] und immunsuppressive Eigenschaften des Env-Protein wurden nachgewiesen [Mangency et al. 2001]. Auch hier wäre eine PCR zur Unterscheidung von Vollängen- und gespleißten Transkripten hilfreich, um eine Beteiligung des Transmembranproteins Env im malignen Melanom genauer zu untersuchen.

5.2 Entwicklung neuer Methoden zur Analyse der Expression von HERV-K

Semiquantitative und quantitative RT-PCR

Die von Phelps [1997] entwickelte semiquantitative PCR ermöglicht eine Unterscheidung zwischen Vollängen und den verschiedenen gespleißten mRNAs von HERV-K, zudem kann Vollängen-mRNA des Prototyps von HERV-K und deletierter Proviren unterschieden werden (siehe Ergebnisse Seite 45). Eine semiquantitative PCR lässt allerdings keine Rückschlüsse auf die Menge transkribierter mRNA zu. Im Hinblick auf eine Rolle von HERV-K im malignen Melanom wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit ein real-time RT-PCR Assay zur Quantifizierung exprimierter HERV-K mRNA etabliert. Dem Assay wurde die gleiche Strategie wie der semiquantitativen Bestimmung zu Grunde gelegt. Er ermöglicht ebenfalls die unabhängige Bestimmung von Vollängen-mRNA und gespleißte *env*-, *rec*- und *np9*-mRNA (siehe Ergebnisse Seite 47). Bei der Quantifizierung von mRNA ist es nötig, einen festen Bezug zu haben, über den die Expression normalisiert wird. Aufgrund unterschiedlicher PCR-Bedingungen kann eine mRNA-Quantifizierung nicht über einen Plasmidstandard normalisiert werden. Daher wird oft die relative Expression eines so genannten Haushaltsgens, ein Gen, welches in allen untersuchten Proben gleichermaßen exprimiert wird, herangezogen [Livak 1997]. Neuere Studien haben allerdings ergeben, dass für das verwendete Haushaltsgens evaluiert werden muss, ob unter den gegebenen Bedingungen eine stabile Expression gegeben ist [Vandesompele et al. 2002, Stahlberg et al. 2004, Tricarico et al. 2002, Bustin 2002]. Vor allem in Tumorgewebe findet häufig eine tiefgreifende Änderung der Expression statt, so dass nicht immer eine stabile Expression der Haushaltsgene wie GAPDH oder β -Aktin gegeben ist. Aufgrund dieser Voraussetzungen wurde die Expression von HERV-K in dieser Arbeit auf gleiche Mengen eingesetzter Gesamt-RNA und in Bezug zu der Expression in GH-Zellen bestimmt. Bei den verwendeten Melanomzelllinien dürfte diese Methode auch hinreichend genau sein, zumal immer der selbe Stock an GH-RNA verwendet wurde. Die Gewebeproben enthalten jedoch außer den Melanomzellen noch weiteres Gewebe und Lymphozyten, dessen Anteil nicht weiter bestimmt werden kann. Hier ist die Quantifizierung somit nicht zuverlässig. Für die Verbesserung des quantitativen Nachweises der HERV-K Expression wäre es in Zukunft hilfreich, zusätzlich zur Quantifizierung in Bezug auf die

Expression in GH-Zellen ein weiteres Gen zur Normalisierung einzusetzen. Die Expression dieses Gens muss spezifisch für Melanozyten sein und in normalen sowie malignen Melanozyten gleichermaßen exprimiert werden.

Nachweis von HERV-K Proteinen

Zusätzlich zum Nachweis der Expression von HERV-K RNA in Melanomen wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit neue Methoden zum Nachweis von HERV-K Proteinen entwickelt. Hierfür wurden spezifische Antiseren gegen das transmembrane Hüllprotein gp36 und gegen Np9 hergestellt und charakterisiert. Das neu generierte Ziegeserum 26 wurde mit dem früher erstellten Ziegeserum 7 [Phelps 1997], welches unter anderem in der Studie von Muster et al. [2003] verwendet wurde, verglichen. Für beide Seren wurden die erkannten Epitope zum Vergleich mittels Pepspot kartiert. Interessanterweise liegt das erkannte Hauptepitop beider Ziegeseren in der Cysteinschleife (siehe Ergebnisse Seite 53). Die Daten stimmen mit Erfahrungen bei anderen retroviralen Infektionen (zBsp. HIV) überein. Die Cysteinschleife als immundominantes Epitop kann nach retroviralen Infektionen häufig nachgewiesen werden und wird zu diagnostischen Zwecken eingesetzt. Das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV enthält eine solche immundominante Cysteinschleife [Gnann et al. 1987], die von 99% der Seren infizierter Patienten erkannt wird [Denner et al. 1994]. Im Gegensatz dazu enthielten Seren von Ratten oder Ziegen, die mit dem transmembranen Hüllprotein vom porzinen endogenen Retrovirus (PERV) oder des felines Leukämievirus (FeLV) immunisiert wurden, keine Antikörper gegen die Cysteinschleife [Fiebig et al. 2003, Langhammer et al. 2005], ebenso wie Tiere, die mit HIV-gp41 immunisiert wurden [Fiebig in Vorbereitung]. Daher war es schon überraschend, eine derart starke Antwort gegen dieses immundominante Epitop zu erreichen.

Transkribierte HERV-K Proviren

Welche der ca. 30 HERV-K Loci im Genom aktiv transkribiert werden, wurde noch nicht untersucht. Aufgrund der hier verwendeten semiquantitativen PCR lässt sich sagen, dass in allen untersuchten Proben zumindest Proviren beider HERV-K Typen transkribiert werden. Eine Aussage über HERV-K im malignen Melanom im Vergleich zum Teratokarzinom lässt sich jedoch nur treffen, wenn ähnliche Proviren exprimiert werden. Um besser einschätzen zu können, welche Proviren in Melanom- und GH-Zellen transkribiert werden, wurden Vollängen- und *env*-Transkripte in GH-, SK-MEL-28- und 293-Zellen miteinander verglichen. Die Primer für den Nachweis der Vollängen-mRNA von HERV-K liegen in einem konservierten Bereich des gag-Gen. Das Alignment der exprimierten Sequenzen zeigt daher wie erwartet große Übereinstimmungen und nur Variationen in einzelnen Nukleotiden.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass ähnliche Proviren in allen drei Zelllinien transkribiert werden. Gleiches gilt für die gespleißten *env*-Transkripte aus GH- und SK-MEL-28-Zellen. Da da ähnliche Proviren transkribiert werden (siehe Ergebnisse Seite 59), wird die *env*-mRNA von dem Prototyp-Anteil der transkribierten Vollängensequenzen gespleißt. Zusätzlich treten in GH-Zellen noch weitere, deletierte *env*-Transkripte auf, die somit von einem weiteren transkribierten aber deletierten Provirus stammen. In SK-MEL-28-Zellen treten diese *env*-Transkripte nicht auf.

5.3 Expression von HERV-K im malignen Melanom

Die Expression von verschiedensten endogenen Retroviren ist meist vor dem Hintergrund einer Beteiligung oder als auslösende Ursache von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose oder Diabetes sowie verschiedener Tumorerkrankungen [Rasmussen et al. 1995, Andersson et al. 1998, Stauffer et al. 2001, Johnston et al. 2001, Forsman et al. 2005] untersucht worden. Die Unterscheidung zwischen Vollängen und gespleißter mRNA war dabei meist zweitrangig, das korrekte Spleißen der *env*-mRNA ist jedoch essentiell für die Expression des transmembranen Hüllproteins und somit dessen Präsenz und Zugänglichkeit auf der Zelloberfläche. Auch wenn einige HERVs im Genom exprimiert werden [Wilkinson et al. 1994, Löwer et al. 1996], stellt die Expression eines *env*-Gens eine Besonderheit dar, da die *env*-Sequenzen häufig defekt oder nicht mehr vorhanden sind. Die Proviren der HERV-K HML2 Familie besitzen jedoch offene Leserahmen für alle viralen Proteine. Zudem werden zusätzlich zur Polymerase, Protease sowie den Strukturproteinen Gag und Env zwei akzessorische Proteine, Rec und Np9, gebildet, für die tumorigenes Potential nachgewiesen wurde. Von HERV-K konnte zumindest ein anscheinend vollständig intaktes Provirus im Genom lokalisiert werden [Turner 2001]. Weitere Proviren mit offenen Leserastern für alle retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env* sind im Genom verteilt und werden exprimiert [Löwer et al. 1993, Tönjes et al. 1999]. Analysen zeigen, dass funktionelle Proteine gebildet werden [Mueller-Lantzsch et al. 1993], andere aufgrund inaktivierender Mutationen jedoch nicht mehr funktionell sind [Tönjes et al. 1999].

Vorangegangene Untersuchungen zeigen, dass durch UV B-Strahlung die Expression retroviraler Sequenzen, zu denen HERV-K, ERV-9 und HERV-L gehörten, in Keratinozyten aktiviert werden konnte [Hohenadl et al. 1999]. Weitere Hinweise auf die Expression eines HERV-K Provirus im Melanom gab es 2002, als beschrieben wurde, dass zytotoxische T-Zellen eines Melanompatienten ein Antigen erkennen, welches von einer HERV-K *env*-Sequenz gebildet wird. Die entsprechende Sequenz (HERV-K-MEL) gehört zu einem HERV-

K Provirus auf Chromosom 16 (Accnr. AC092357) und ist defekt in allen viralen Genen. Eine Analyse des antigenen Peptides ergab jedoch, dass es aufgrund der Mutationen in einem anderen Leseraster gebildet wird und somit mit HERV-K Env nicht übereinstimmt. Die quantitative Bestimmung der Expression von HERV-K-MEL in verschiedenen Geweben zeigte, dass es sowohl in Melanom-Primärtumoren, als auch Metastasen hoch exprimiert wird. In normaler Haut dagegen war die Expression nur in drei von fünf Proben nachzuweisen und 300fach geringer [Shiavetti et al. 2002]. Jedoch konnte hier nicht zwischen der Volllängen- und gespleißter RNA unterschieden werden. Obwohl die Expression der Volllängen-mRNA von HERV-K in den meisten humanen Geweben nachgewiesen werden kann [Phelps 1997, Sugimoto et al. 2001], wurde die Expression von gespleißter *env*- und *rec*-mRNA nur in Teratokarzinomen und Melanomen nachgewiesen [Löwer et al. 1993, Muster et al. 2003]. In der Brustkrebszelllinie T47 und in einigen Brustkrebsgewebeproben ließen sich ebenfalls gespleißte *env*-Transkripte, nicht aber *rec*-Transkripte detektieren [Etkind et al. 1997, Wang-Johannig et al. 2003].

Die Arbeitsgruppe um Muster et al [2003] konnte mit einer pol-spezifischen Sonde in 60-90% der untersuchten Zellen eine Expression des pol-Gens von HERV-K nachweisen, dies lässt jedoch zunächst keinen Schluss auf gespleißte Transkripte zu. Der verwendete Nachweis basiert auf einer fluoreszenzmarkierten Sonde und es liegt keine zusätzliche Ampifikation vorhandener Sequenzen vor. Daher ist diese Methode weniger sensitiv als das in dieser Arbeit verwendete RT-PCR System. Im Einklang mit Muster et al. [2003] konnte auch in dieser Arbeit die Volllängen-mRNA von HERV-K, welche für die Polymerase kodiert, in allen untersuchten humanen Proben einschließlich der Nicht-Melanomzelllinien und der normalen PBMCs nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse Tabelle 3 Seite 61). Zudem zeigen die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR, dass sich die Expression der Volllängen-mRNA in den Melanomen zum Teil erheblich unterscheidet, in den meisten Fällen jedoch mindestens um den Faktor 5 höher ist, als bei den Kontrollen wie 293-, C8166-Zellen und PBMCs (siehe Ergebnisse Seite 62f). Die Abweichungen, 60-90% bei Muster et al. [2003] und 100% in dieser Arbeit lässt sich mit der besseren Sensitivität der hier verwendeten Nachweismethode erklären. Ein weiterer Unterschied besteht in den untersuchten Proben (siehe Anhang Seite IV und V). In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Metastasen untersucht, jedoch keine Primärtumore. In der Arbeit von Muster et al. [2003] dagegen wurden Primärtumore und kutane Metastasen untersucht, dies könnte ebenfalls die Unterschiede in der HERV-K Expression erklären.

Gespleißte *env*, *rec* und *np9*-Transkripte von HERV-K

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der RT-PCR gespleißtes *env* und *rec* nur in 35% bzw. 39% der getesteten Metastasen-Gewebe nachgewiesen werden. Eine ähnliche Häufigkeit fand sich mit 36% bzw. 40% auch in den etablierten Melanomzelllinien (siehe Tabelle 3, Ergebnisse Seite 61). Der Anteil der Melanomgewebe und -zelllinien, die eine Expression von *np9*-Transkripten aufweisen, ist mit 29% bzw. 21% geringer als bei Melanomgeweben und -zelllinien mit *env*- oder *rec*-Transkripten. Von den kommerziellen Zelllinien, welche schon in der Melanomforschung etabliert sind, weisen lediglich SK-MEL-28 und MEWO und G-361 gespleißte *env*- und *rec*-mRNA auf, nicht aber SK-MEL-1 und GR-M. Die Expression von HERV-K Volllänge und gespleißter *env*- und *rec*-mRNA ähnelt somit der Expression in Teratokarzinomen. Dies geht konform mit den Daten von Muster et al. [2003], dort konnte nur in ca. 20% der Zellen Rec und in nur etwa 10% Env nachgewiesen werden. Es ist daher naheliegend, dass nicht alle Zellen eines Tumors Env und Rec gleichermaßen exprimieren.

Interessanterweise sind *rec*-Transkripte auch in normalen Melanozyten nachweisbar, nicht aber *env*-Transkripte (siehe Ergebnisse Seite 60). Zwar ist mit der quantitativen PCR eine basale *rec*-Expression auch in normalen Zellen nachzuweisen (siehe Ergebnisse Seite 62 f), jedoch sind *rec*-spezifische Banden in der semiquantitativen PCR sonst nur in Verbindung mit einer *env*-Expression zu detektieren. In der real-time RT-PCR ließ sich allerdings keine erhöhte Expression gegenüber dem Level in normalen Zellen nachweisen. Ob es eine Funktion des Rec-Proteins in normalen Zellen gibt, ist bis heute allerdings nicht geklärt.

In der Veröffentlichung von Muster et al. [2003], konnte zudem eine Proteinexpression in allen untersuchten Melanomgeweben (9/9 Primärtumore und 12/12 Metastasen) gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit die Expression von HERV-K gp36/TM in der Immunhistochemie nur in ca. der Hälfte der getesteten Primärtumore und Metastasen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 6, Ergebnisse Seite 72). Zusätzlich wurden die beiden akzessorischen Proteine Rec und Np9 in den Melanomen untersucht. Das Rec-Protein konnte nur in drei von 21 untersuchten Geweben detektiert werden, Np9 konnte gar nicht nachgewiesen werden. Diese geringe Anzahl bleibt unter dem Prozentsatz mit dem eine HERV-K mRNA Expression nachgewiesen werden konnte und deutet darauf hin, dass die Proteinexpression unter der Detektionsgrenze des Westernblots, der eine geringere Sensitivität als die RT-PCR hat, liegt.

Serumantikörper gegen HERV-K Proteine in Melanompatienten

Der Nachweis spezifischer Antikörper im Serum von Patienten ist eine gängige Diagnosemethode. Eine HIV-Diagnose zum Beispiel wird im Hauptteil über HIV-1-spezifische Antikörper gestellt. Die Anzahl der getesteten Seren von Melanompatienten, welche eine positive Reaktion mit dem rekombinanten transmembranen Hüllprotein von HERV-K zeigen, liegt mit 22% deutlich niedriger als die Anzahl der Patienten, welche eine Expression von HERV-K *env* aufweisen (siehe Ergebnisse Seite 72). Wie die Daten der Quantifizierung zeigen, liegt die Expression der *env*-mRNA in den Melanomproben nur bei ca. 10% im Vergleich zu den GH-Zellen. Daraus resultiert eine geringe Präsenz des Env-Proteines auf der Zelloberfläche und macht eine Anfärbung in der Immunfluoreszenz schwierig. Somit ist die Konzentration auf den Tumorzellen wahrscheinlich zu gering, um in allen Fällen eine Immunantwort gegen HERV-K Env auszulösen. Im Vergleich lassen sich dagegen bei 85% der Seren von Patienten mit Seminomen und anderen Keimzelltumoren diese Antikörper nachweisen [Sauter et al. 1996]. Dass auch in Seren von normalen Blutspendern keine Antikörper gegen HERV-K Env detektierbar sind [Denner et al. 1995], steht im Einklang mit der Beobachtung, dass eine HERV-K Expression in normalen Geweben nicht nachweisbar ist.

Alle Seren wurden zudem auf spezifische Antikörper gegen HERV-K Rec und Np9 getestet, jedoch zeigte keines der Seren eine Reaktion gegen Rec oder Np9 (siehe Ergebnisse Seite 72 und Anhang Seite VII f). Im Gegensatz dazu können in 20% bis 47% der infizierten HIV-Patienten Antikörper gegen das verwandte Rev nachgewiesen werden [Devash et al. 1990, Reiss et al. 1990]. Allerdings ist der Nachweis von Rev im Vergleich mit anderen HIV-1 Proteinen relativ schwach. Rev und vermutlich auch Rec scheinen entweder gering exprimiert oder schlechte Antigene zu sein. Die fehlenden Antikörper gegen Rec und Np9, trotz einer nachweisbaren Expression von mRNA, legen den Schluss nahe, dass auch hier, wie schon bei dem transmembranen Hüllprotein, zu wenig Protein exprimiert wird, um eine Immunantwort auszulösen. Zudem besitzt Np9 *in vivo* eine sehr kurze Halbwertszeit [Armbrüster et al. 2004]. Zwar sind beide Proteine im Nukleus lokalisiert [Magin et al. 2000, Armbrüster et al. 2002] und somit dem Immunsystem nicht direkt zugänglich, aber durch die Haupthistokompatibilitätskomplexe Klasse I (major histo compatibility complex I, MHC-I) sollten ihre Peptide auf der Oberfläche HERV-K exprimierender Zellen präsentiert werden. Infektion von Zellen mit HERV-K.

Endogene Retroviren anderer Spezies, wie zum Beispiel PERVs oder MuLVs sind im Gegensatz zu humanen ERVs infektiös [Patience et al. 1997, Specke et al. 2001]. Auch wenn eine Partikelbildung für HERV-K gezeigt wurde [Boller et al. 1993, Löwer et al. 1993], konnte eine produktive Infektion mit HERV-K noch nicht nachgewiesen werden. Auch bei mehrfacher Infektion oder einer Kokultivierung mit virusproduzierenden Zellen, wenn Zell-Zell-Kontakte möglich sind und somit ein sehr effizienter Weg der Infektion möglich ist, kam es zu keiner Übertragung von HERV-K (siehe Ergebnisse Seite 74). Positive PCR-Nachweise infizierter Zellen verloren sich nach einigen Passagen wieder, so dass entweder die Ausverdünnung infizierter Zellen einer nicht produktiven Infektion unter der Detektionsgrenze stattgefunden hat oder die Signale aufgrund kontaminierender DNA der virusproduzierenden Zellen auftraten. Im Gegensatz hierzu konnte von Muster et al. [2003] die Infektion von bovinen Nierenzellen (MDBK) nach Behandlung mit virus-haltigem Überstand einer Melanomzelllinie gezeigt werden, jedoch fehlt ein Nachweis des integrierten und replizierenden Provirus in den bovinen MDBK-Zellen. Im Überstand von SK-MEL-28-Zellen konnten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie Strukturen, ähnlich den aus GH-Zellen isolierten HERV-K Partikeln [Boller et al. 1993], dargestellt werden. Allerdings erscheinen diese pleiomorph und defekt zu sein. Zum Teil kann dies auf mechanischen Stress bei der Aufreinigung zurückzuführen sein. Die defekten, nicht infektiösen Partikel erklären jedoch die negativen Ergebnissen der Infektion mit Überständen von GH- und SK-MEL-28-Zellen (siehe Ergebnisse Seite 74).

5.4 Mögliche biologische Funktionen von HERV-K

Es gibt verschiedene biologische Ursachen für die Expression retroviraler Proteine in Tumoren. Zunächst wäre es möglich, dass die Expression während der Transformation und dem Fortschreiten des Tumorwachstums eine Folge der vermehrt vorhandenen Transkriptions- oder anderer Faktoren ist, welche die Expression der retroviralen Sequenzen unspezifisch aktivieren. Zudem könnten sie aber auch aktiv an der malignen Transformation beteiligt sein. Normalerweise enthalten Retroviren keine Onkogene, eine Transformation kann jedoch über Insertionsmutationen induziert werden. Hierbei können virale Promotoren und/oder Enhancer der LTR zelluläre Onkogene aktivieren oder aber das offene Leseraster eines Tumor-Supressor Gens zerstören. Ein murines Retrovirus (MelARV) ist derart mit der Entstehung von Melanomen in C57Bl/6 Mäusen assoziiert. Die Sequenzierung der Integrationsorte des MelARV-Provirus zeigte, dass es in den 3'-Bereich des c-maf Proto-Onkogens inseriert ist und zu einer erhöhten Expression von c-maf in BL6 Melanomzellen

führt [Li et al. 1999]. HERV-K ist ein komplexeres Retrovirus als das murine Leukämievirus und kodiert für zwei zusätzliche Proteine: Rec und Np9. Beide Proteine sind mit onkogenen Eigenschaften in Verbindung gebracht worden. Rec ist ein regulatorisches Protein und funktional dem Rev- und Rex-Protein von HIV-1 und HTLV ähnlich [Löwer et al. 1995, Magin et al. 1999, Yang et al. 1999]. Seine Beteiligung an der Zelltransformation und die Induktion von Tumoren wurde in Nacktmäusen gezeigt. Nacktmäuse, welche Rec-exprimierende Zellen erhielten, entwickelten Tumore. Unterstützt wird dies durch den Umstand, dass auch drei Mäuse Tumore entwickelten, welche eigentlich mit Env transformierte Zellen erhielten aber eine Splicevariante von Rec anstelle des Env exprimierten [Boese et al. 2000]. Zudem zeigten Mäuse, die für HERV-K Rec transgen sind und dies exprimieren, eine gestörte Keimzellentwicklung und entwickelten Veränderungen, die an Vorläuferstadien von Seminomen erinnern [Galli et al. 2005]. Np9 ist ebenfalls im Nukleus lokalisiert, eine spezifische Expression in Tumorgewebe und transformierten Zelllinien konnte nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Daten ist eine Beteiligung der beiden Proteine an der Entwicklung von Melanomen denkbar und war Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.

Ein Grund für die Expression des transmembranen Hüllproteins auf der Oberfläche von Tumoren könnte ein selektiver Vorteil im Schutz gegenüber dem Immunsystem sein. Für die transmembranen Hüllproteine von MuLV [Mangeny und Heidmann 1998], des Mason-Pfizer Affenvirus [Blaise et al. 2001] und HERV-H [Mangeny et al. 2001] wurde tumorigenes Potential nachgewiesen. Zellen, die diese Proteine auf der Zelloberfläche exprimierten, bildeten in immunkompetenten Mäusen Tumore. Die Arbeitsgruppe um T. Heidmann [Mangeny et al. 2005] konnte zeigen, dass die Expression des *env*-Gens des MelARV-Provirus (siehe auch Seite 88) den Tumor vor der Erkennung des Immunsystems schützt. Zellen, deren retrovirales *env*-Gen experimentell ausgeschaltet wurde, waren nicht mehr in der Lage in immunkompetenten Mäusen Tumore zu bilden. Da dieser Effekt reversibel ist und die tumorigenen Eigenschaften *in vitro* sowie in immun-defizienten Mäusen erhalten blieben, ist es das retrovirale Env, welches hier den Schutz vor dem Immunsystem vermittelt [Mangeny et al. 2005].

Zudem konnte gezeigt werden, dass eine konservierte Domäne im transmembranen Hüllprotein von HIV-1 gp41 [Denner et al. 1996] und p15E von FeLV die Proliferation von Lymphozyten inhibiert und die Cytokinproduktion moduliert [Denner 1998, Tacke et al. 2000]. So wird das Verhältnis von Typ I zu Typ II Zytokinen verschoben, hierbei werden IL-2, IL-12, Interferon γ (IFN γ) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) herab-geregelt, IL-10 dagegen wird vermehrt exprimiert [Haraguchi et al. 1995 a und b, Denner 1998]. IL-10 ist als

Regulator der Immunsuppression bekannt [Seo et al. 2001, Steinbrink et al. 1999 und 2002]. Die Wächterlymphknoten (die Lymphknoten, die dem Primärtumor lokal am nächsten liegen) von Melanompatienten weisen ein verändertes Zytokinprofil auf. Diese Veränderungen werden möglicherweise vom Primärtumor vermittelt, da sie mit der vollständigen Entfernung des Melanoms reversibel sind [Lee et al. 2005]. Die Ursachen der Induktion dieser Veränderungen durch den Primärtumor sind noch unklar.

Bei einem Vergleich der klinischen Daten der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Melanompatienten mit der Expression von HERV-K waren keine eindeutigen Unterschiede auszumachen. Patienten, die eine HERV-K Expression aufwiesen, unterschieden sich in ihren klinischen Daten nicht von Melanompatienten ohne HERV-K Expression. Weder Tumorstadium oder Tumordicke, noch geschlechtsspezifische Unterschiede oder das Alter der Patienten bei der ersten Tumordiagnose ließen sich mit der Expression von gespleißtem HERV-K korrelieren. Ebenso ließ sich keine Verbindung zwischen der Expression von HERV-K *env*- oder *rec*-Transkripten und der Art der Metastase, kutan oder lymphoid, herstellen. Auch wenn vor dem Hintergrund der Daten von Lee et al. [2005] und vor allem von Magoney et al. [2005] ein Zusammenhang zwischen der Expression von HERV-Sequenzen, im besonderen von HERV-K TM und Rec und einem Schutz von (Melanom-) Tumoren vor dem Immunsystem oder einer beobachteten Immunsuppression denkbar sind, sind jedoch weitere Studien nötig, um zu entscheiden, ob die HERV-K Expression in einigen Formen der Melanomentwicklung eine Rolle spielt oder als diagnostischer Marker genutzt werden kann.

Auch wenn es denkbar ist, dass Rec oder Np9 an der Tumorentwicklung beteiligt sind und es Hinweise auf eine Beteiligung von HERV-K Env gibt, so ist HERV-K nicht in allen oder zumindest einem Großteil der Melanome exprimiert, wie es bei Teratokarzinomen der Fall ist. Jedoch ist die Melanomdiagnose eine Sichtdiagnose beruhend auf immunhistologischen Schnitten des Primärtumors. Eine immunologische Charakterisierung oder ein Expressionsprofil wird nicht erstellt. Es kann daher zwischen verschiedenen Entitäten nicht unterschieden werden und eine Korrelation der HERV-K Expression an einer bestimmten Form von malignen Melanom letztlich nicht ausgeschlossen werden. Dass ein klinisches Krankheitsbild ein breites Spektrum von Erscheinungsbildern aufgrund einer entsprechenden biologischen Heterogenität umfasst, ist für maligne Erkrankungen wie Leukämie oder Brustkrebs bekannt. Die molekulare Klassifikation von Brustkrebs basiert auf dem Expressionsprofil der verschiedenen Subtypen. Für die Subtypen gelten verschiedene Prognosen und es konnten fünf Gene identifiziert werden, die offensichtlich auf ein gutes

Ansprechen der Chemotherapie hindeuteten [Rouzier et al. 2005]. Ob Ähnliches für maligne Melanome gilt, ist noch zu klären.

5.5 HERV-K Expression in humanen embryonalen Stammzellen

Die Expression von HERVs, insbesondere HERV-K, wurde immer wieder im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen diskutiert. Da bis jetzt jedoch eine kausale Beteiligung nicht schlüssig gezeigt werden konnte, ist auch die Möglichkeit der Aktivierung als ein sekundärer Effekt diskutiert worden. Während der tumorigenen Transformation finden tiefgreifende Änderungen in Chromatinstruktur und Methylierung des Genoms statt. Dieser Kontrollverlust führt zur Fähigkeit der unlimitierten Teilung und beinhaltet eine teilweise Dedifferenzierung der betroffenen Zellen. Die ungehinderte Expression normalerweise reprimierter retroviraler Sequenzen könnte so eine Folge dieses Kontrollverlustes sein [Mager 1999]. Die Aktivierung einer retroviralen Sequenz konnte zum Beispiel in Individuen mit einer unzureichenden Methylierung der DNA gezeigt werden [O'Neill et al. 1998].

Vor dem Hintergrund dieser Vermutungen wurde in einem zweiten Teil dieser Arbeit, die Expression von HERVs in embryonalen Stammzellen untersucht. Eine erhöhte Expression von gespleißter HERV-K RNA konnte in den untersuchten Stammzelllinien festgestellt werden, zusätzlich konnte die Expression des transmembranen Hüllproteins gezeigt werden (siehe Ergebnisse Seite 78). Der Nachweis der Expression des transmembranen Hüllproteins von HERV-K ist von besonderer Bedeutung. Ähnlich wie schon bei der Expression in malignen Melanomen diskutiert, könnte es zu einem selektiven Schutz gegenüber dem Immunsystem und zur Bildung von Teratomen aus undifferenzierten Stammzellen beitragen. Bei allen bis heute durchgeführten Trans-plantationen von embryonalem Stammzellen, egal ob in einem syn- oder xenogenen Wirt, kam es zur Ausbildung von Teratomen und letztlich zur Zerstörung des behandelten Organs [Damjanov 1993, Brüstle et al. 1997, Erdo 2003, Wakitani 2003, Teramoto 2005, Fujikawa 2005]. Diese Studien zeigen, wie wichtig es ist, den Status der Differenzierung genau zu überwachen und sicherzustellen, dass keine undifferenzierten Zellen im Transplantat verbleiben.

Zum anderen könnte die HERV-K Expression aber auch als Marker für einen undifferenzierten Zustand fungieren. Bei humanen embryonalen Stammzellen sind einige Gene bekannt, die zur Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustands exprimiert werden. OCT4 ist aus dem Mausmodell bekannt. Dessen Expression ist auf pluripotente Zellen beschränkt. Zudem wurden drei weitere Gene identifiziert NANOG, STELLAR (auch developmental pluripotency associated -3, DPPA3) und GDF3 (growth and differentiation

factor 3), die ähnlich OCT4 in pluripotenten Zellen exprimiert werden und deren Expression während der Differenzierung herabgeregelt wird [Clark et al. 2004]. In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe konnte die Expression der Stammzellmarker in Keimzelltumoren und Brustkrebsgeweben nachgewiesen werden [Ezeh et al. 2005]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von gespleißten HERV-K Transkripten ähnlich verhält. Auch hier wird die Expression mit der Differenzierung in Embryoid Bodies, unabhängig von der später induzierten Differenzierung in neuronale Vorläuferzellen, herabgeregelt. Die Dedifferenzierung der Zellen in Tumoren, die ebenfalls ein erhöhtes Level an HERV-K Expression aufweisen, lässt so auf eine Aktivierung von HERV-K in undifferenzierten Zellen schließen. Ob die Expression von HERV-K im un- bzw. dedifferenzierten Zustand ein Nebeneffekt oder eine funktionelle Aktivierung ist, bleibt zu untersuchen.

5.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit entwickelten diagnostischen Methoden zur Bestimmung der Expression verschiedener mRNAs von HERV-K, vor allem die Möglichkeit die Expression zu quantifizieren sowie die entwickelten Antiseren gegen HERV-K Proteine, stellen eine gute Basis für weitergehende Versuche dar.

HERV-K scheint in den verschiedenen Entitäten des malignen Melanoms keine einheitliche Expression zu erfahren, wie dies von Teratokarzinomen bekannt ist. Die Frage ob HERV-K überhaupt eine Rolle im malignen Melanom spielt, ließ sich vor allem aufgrund der unzureichenden Datenlage seitens des malignen Melanoms nicht eindeutig klären. Analysen von Melanomen mit Hilfe von Mikroarray und die bessere Charakterisierung sind Voraussetzung für weitergehende Untersuchungen.

Oft sind Untersuchungen an endogenen Retroviren aufgrund der hohen Kopienzahl der einzelnen retroviralen Sequenzen schwierig, da sich die verschiedenen Loci meist durch einzelne Mutationen unterscheiden. Neuere Methoden wie die Mikroarrayanalysen werden hier die Untersuchungen vereinfachen und schnell einen Überblick über den Expressionsstatus verschiedener normaler und veränderter Gewebe geben. Dies ließe sich mit dem Expressionsstatus von HERVs zusammenbringen, um eventuelle Zusammenhänge zu erkennen und dann eine mögliche Funktion zuordnen zu können. Jedoch weisen die Studien von Lee et al. und Mangeney et al. auf eine Beteiligung eines retroviralen Env im malignen Melanom hin.

Zudem wäre interessant, ob sich die in Keimzelltumoren und Brustkrebsgewebe exprimierten Stammzellmarker auch in malignen Melanomen nachweisen lassen, und sich ihre Expression mit der gespleißter HERV-K Transkripte korrelieren lässt. Ob die Expression von HERV-K im un- bzw. dedifferenzierten Zustand jedoch ein Nebeneffekt oder eine funktionelle Aktivierung ist, bleibt zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

- Ali NN, Edgar AJ, Samadikuchaksaraei A, et al. (2002). "Derivation of type II alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells." *Tissue Eng* 8(4): 541-550.
- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." *Dev Biol* 227(2): 271-278.
- Amit M, Margulets V, Segev H, et al. (2003). "Human feeder layers for human embryonic stem cells." *Biol Reprod* 68(6): 2150-2156.
- Andersen MH, Fensterle J, Ugurel S, et al. (2004). "Immunogenicity of constitutively active V599EBRaf." *Cancer Res* 64(15): 5456-5460.
- Andersson AC, Svensson AC, Rolny C, et al. (1998). "Expression of human endogenous retrovirus ERV3 (HERV-R) mRNA in normal and neoplastic tissues." *Int J Oncol* 12(2):309-13.
- Andersson AC, Venables PJ, Tonjes RR, et al. (2002). "Developmental Expression of HERV-R (ERV3) and HERV-K in Human Tissue." *Virology* 297(2): 220-225.
- Armbruester V, Sauter M, Krautkrämer E, et al. (2002). "A novel gene from the human endogenous retrovirus k expressed in transformed cells." *Clin Cancer Res* 8(6): 1800-1807.
- Armbruester V, Sauter M, Römer K, et al. (2004). "Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X." *J Virol* 78(19): 10310-10319.
- Armstrong BK and Krickler A (1994). "Cutaneous melanoma." *Cancer Surv* 19-20: 219-240.
- Armstrong BK and Krickler A (1995). "Skin cancer." *Dermatol Clin* 13(3): 583-594.
- Balch CM (1992). "Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide." *Semin. Surg Oncol* 8(6): 400-414.
- Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, et al. (2000). "A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma." *Cancer* 88(6): 1484-1491.
- Balch CM, Soong SJ, Atkins MB, et al. (2004). "An evidence-based staging system for cutaneous melanoma." *CA Cancer J Clin* 54(3): 131-149.
- Bannert N and Kurth R (2004). "Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation." *Proc Natl Acad Sci USA* 101(Suppl 2): 14572-14579.
- Barbulescu M, Turner G, Seaman SI, et al. (1999). "Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans." *Curr Biol* 9(16): 861-868.
- Barna M, Hawe N, Niswander L, et al. (2000). "PLZF regulates limb and axial skeletal patterning." *Nat Genet* 25(2): 166-172.
- Bataille V (2003). "Genetic epidemiology of melanoma." *Eur J Cancer* 39(10): 1341-1347.
- Baylink DJ (1983). "Glucocorticoid-induced osteoporosis." *N Engl J Med* 309(5): 306-308.

- Berking C (2005). "[The role of ultraviolet irradiation in malignant melanoma.]" *Hautarzt* 56(7): 687-697.
- Best S, Le Tissier PR and Stoye JP (1997). "Endogenous retroviruses and the evolution of resistance to retroviral infection." *Trends Microbiol* 5(8): 313-318.
- Blaise S, Mangeney M and Heidmann T (2001). "The envelope of Mason-Pfizer monkey virus has immunosuppressive properties." *J Gen Virol* 82(Pt 7): 1597-1600.
- Blond J, Lavillette D, Cheynet V, et al. (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.
- Boeke JD and Stoye JP (1997). Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements. In: *Retroviruses*. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. NY, Cold Spring Harbour Lab. Press: 343-346.
- Boese A, Sauter M, Galli U, et al. (2000). "Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein." *Oncogene* 19(38): 4328-4336.
- Boese A, Sauter M and Müller-Lantzsch N (2000). "A rev-like NES mediates cytoplasmic localization of HERV-K cORF." *FEBS Lett* 468(1): 65-67.
- Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, et al. (2002). "Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes." *Circ Res* 91(3): 189-201.
- Boller K, Frank H, Löwer J, et al. (1983). "Structural organization of unique retrovirus-like particles budding from human teratocarcinoma cell lines." *J Gen Virol* 64(Pt 12): 2549-2559.
- Boller K., König H, Sauter M, et al. (1993). "Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV." *Virology* 196(1): 349-353.
- Botella-Estrada R, Dasi F, Ramos D, et al. (2005). "Cytokine expression and dendritic cell density in melanoma sentinel nodes." *Melanoma Res* 15(2): 99-106.
- Brustle O, Spiro AC, Karram K, et al. (1997). "In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development." *Proc Natl Acad Sci USA* 94(26): 14809-14814.
- Bustin SA (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *J Mol Endocrinol* 29(1): 23-39.
- Caricasole AD, Ward-van Oostwaard D, Mummery C, et al. (2000). "Bone morphogenetic proteins and retinoic acid induce human endogenous retrovirus HERV-K expression in NT2D1 human embryonal carcinoma cells." *Dev Growth Differ* 42(4): 407-411.
- Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, et al. (2002). "Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes." *Hepatology* 36(1): 22-29.
- Christensen T (2005). "Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses." *Rev Med Virol* 15(3): 179-211.

- Chudnovsky Y, Khavari PA and Adams AE (2005). "Melanoma genetics and the development of rational therapeutics." *J Clin Invest* 115(4): 813-824.
- Cianciolo GJ, Copeland TD, Oroszlan S, et al. (1985). "Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins." *Science* 230(4724): 453-455.
- Clark AT, Rodriguez RT, Bodnar S, et al. (2004). "Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma." *Stem Cells* 22(2): 169-179.
- Conrad B, Weissmahr RN, Trucco G, et al. (1997). "A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes." *Cell* 90(2): 303-313.
- Damjanov I (1993). "Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis." *Int J Dev Biol* 37(1): 39-46.
- Dani C, Smith AG, Dessolin D, et al. (1997). "Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro." *J Cell Sci* 110(Pt 11): 1279-1285.
- de Parseval, N and Heidmann T (1998). "Physiological knockout of the envelope gene of the single-copy ERV-3 human endogenous retrovirus in a fraction of the Caucasian population." *J Virol* 72(4): 3442-3445.
- Deininger PL and Batzer MA (2002). "Mammalian retroelements." *Genome Res* 12(10): 1455-1465.
- Denner J (1987). Immunosuppression by oncogenic retroviridae. In: Modulation of the immune responsiveness by infectious agents. Zschesche W. (ed.) Fischer Verlag, Jena pp140-201.
- Denner J, Norley S and Kurth R (1994). "The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients." *Aids* 8(8): 1063-1072.
- Denner J, Phelps RC et al. (1995). "Expression of the human endogenous retrovirus HERV-K in tumor and normal tissue and antibody response in pregnant women, tumor and AIDS patients against HERV-K Gag and Env peptides." *AIDS Research* 11 (Suppl.1) 103
- Denner J, Persin C, Vogel T, et al. (1996). "The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 12(5): 442-450.
- Denner J (1998). "Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation." *Ann NY Acad Sci* 862: 75-86.
- Devash Y, Reagan K, Wood D, et al. (1990). "Antibodies against AIDS proteins." *Nature* 345(6276): 581.
- Doetschman T, Maeda N and Smithies O (1988). "Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci USA* 85(22): 8583-8587.
- Eckhart L, Bach J, Ban J, et al. (2000). "Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity." *Biochem Biophys Res Commun* 271(3): 726-730.

- Erdo F, Buhle C, Blunk J, et al. (2003). "Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke." *J Cereb Blood Flow Metab* 23(7): 780-785.
- Etkind PR, Lumb K, Du J, et al. (1997). "Type 1 HERV-K genome is spliced into subgenomic transcripts in the human breast tumor cell line T47D." *Virology* 234(2): 304-308.
- Evans MJ and Kaufman MH (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." *Nature* 292(5819): 154-156.
- Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA, et al. (2005). "Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma." *Cancer* 104(10): 2255-2265.
- Fiebig U, Stephan O, Kurth R, et al. (2003). "Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation?" *Virology* 307(2): 406-413.
- Forsman A, Yun Z, Hu L, et al. (2005). "Development of broadly targeted human endogenous gammaretroviral pol-based real-time PCRs Quantitation of RNA expression in human tissues." *J Virol Methods* 129(1): 16-30.
- Franklin GC, Chretien S, Hanson IM, et al. (1988). "Expression of human sequences related to those of mouse mammary tumor virus." *J Virol* 62(4): 1203-1210.
- Fujikawa T, Oh SH, Pi L, et al. (2005). "Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells." *Am J Pathol* 166(6): 1781-1791.
- Gage FH (2000). "Mammalian neural stem cells." *Science* 287(5457): 1433-1438.
- Galli UM., Sauter M, Lecher B, et al. (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):3223-3228.
- Gallo RC (1986). "HTLV: the family of human T-lymphotropic retroviruses and their role in leukemia and AIDS." *Med Oncol Tumor Pharmacother* 3(3-4): 265-267.
- Giambernardi TA, Rodeck U and Klebe RJ (1998). "Bovine serum albumin reverses inhibition of RT-PCR by melanin." *Biotechniques* 25(4): 564-566.
- Gnann JW Jr., Nelson JA and Oldstone MB (1987). "Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus." *J Virol* 61(8): 2639-2641.
- Graves KH and Moreadith RW (1993). "Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos." *Mol Reprod Dev* 36(4): 424-433.
- Griffiths DJ (2001). "Endogenous retroviruses in the human genome sequence." *Genome Biol* 2(6): REVIEWS1017.
- Hall PA. and Watt FM (1989). "Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity." *Development* 106(4): 619-633.

- Haraguchi S, Good RA and Day NK (1995a). "Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns." *Immunol Today* 16(12): 595-603.
- Haraguchi S, Good RA, James-Yarish M, et al. (1995b). "Induction of intracellular cAMP by a synthetic retroviral envelope peptide: a possible mechanism of immunopathogenesis in retroviral infections." *Proc Natl Acad Sci USA* 92(12): 5568-5571.
- Herbst H, Sauter M, Kuhler-Obbarius C, et al. (1998). "Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in germ cell and trophoblastic tumours." *Apmis* 106(1): 216-220.
- Herlyn M, Berking C, Li G, et al. (2000). "Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation." *Melanoma Res* 10(4): 303-312.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, et al. (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." *Biotechnology (NY)* 10(4): 413-417.
- Hohenadl C, Germaier H, Walchner M, et al. (1999). "Transcriptional activation of endogenous retroviral sequences in human epidermal keratinocytes by UVB irradiation." *J Invest Dermatol* 113(4): 587-594.
- Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, et al. (2003). "A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells." *Hum Reprod* 18(7): 1404-1409.
- Hussein MR (2005). "Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms." *J Cutan Pathol* 32(3): 191-205.
- Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, et al. (1994). "Germline p16 mutations in familial melanoma." *Nat Genet* 8(1): 15-21.
- Iannaccone PM, Taborn GU, Garton RL, et al. (1994). "Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras." *Dev Biol* 163(1): 288-292.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. (1997). "Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro." *J Cell Biochem* 64(2): 295-312.
- Johansen T, Holm T, Bjorklid E, et al. (1989). "Members of the RTVL-H family of human endogenous retrovirus-like elements are expressed in placenta." *Gene* 79(2): 259-267.
- Johnston JB, Silva C, Holden J, et al. (2001). "Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implications for inflammatory brain diseases." *Ann Neurol* 50(4): 434-442.
- Kim D, Gu Y, Ishii M, et al. (2003). "In vivo functioning and transplantable mature pancreatic islet-like cell clusters differentiated from embryonic stem cell." *Pancreas* 27(2): 34-41.
- Kitamura Y, Ayukawa T, Ishikawa T, et al. (1996). "Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase." *J Virol* 70(5): 3302-3306.
- Kramer J, Hegert C, Guan K, et al. (2000). "Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4." *Mech Dev* 92(2): 193-205.

- Kuai XL, Cong XQ, Li XL, et al. (2003). "Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells." *Liver Transpl* 9(10): 1094-1099.
- Laemmli UK, Beguin F and Gujer-Kellenberger G (1970). "A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation." *J Mol Biol* 47(1): 69-85.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* 409(6822): 860-921.
- Langhammer S, Fiebig U, Kurth R, et al. (2005). "Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV)." *Vaccine* 23(25): 3341-348.
- Larsson E, Andersson AC and Nilsson BO (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(2): 113-120.
- Laslett AL, Filipczyk AA, and Pera MF (2003). "Characterization and culture of human embryonic stem cells." *Trends Cardiovasc Med* 13(7): 295-301.
- Lee LG, Connell CR, and Bloch W (1993). "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes." *Nucleic Acids Res* 21(16): 3761-3766.
- Lee JH, Torisu-Itakara H, Cochran AJ, et al. (2005). "Quantitative analysis of melanoma-induced cytokine-mediated immunosuppression in melanoma sentinel nodes." *Clin Cancer Res* 11(1): 107-112.
- Li M, Huang X, Zhu Z, et al. (1999). "Sequence and insertion sites of murine melanoma-associated retrovirus." *J Virol* 73(11): 9178-9186.
- Livak K (1997). *Relative Quantification of Gene Expression. Stratagene User Bulletin #2. Stratagene.*
- Lower R, Lower J, Frank H, et al. (1984). "Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses." *J Gen Virol* 65(Pt 5): 887-898.
- Lower R, Boller K, Tondera-Koch C, et al. (1993). "Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation." *Proc Natl Acad Sci USA* 90(10): 4480-4484.
- Lower R, Tonjes RR, Korbmayer C, et al. (1995). "Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K." *J Virol* 69(1): 141-149.
- Lower R, Lower J and Kurth R (1996). "The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences." *Proc Natl Acad Sci USA* 93(11): 5177-5184.
- Lower R, Tonjes RR, Boller K, et al. (1998). "Development of insulin-dependent diabetes mellitus does not depend on specific expression of the human endogenous retrovirus HERV-K." *Cell* 95(1): 11-14.
- Lower R (1999). "The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies." *Trends Microbiol* 7(9): 350-356.

- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, et al. (2001). "Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets." *Science* 292(5520): 1389-1394.
- Mager DL (1999). "Human endogenous retroviruses and pathogenicity: genomic considerations." *Trends Microbiol* 7(11): 431
- Magin C, Lower R and Lower J (1999). "cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K." *J Virol* 73(11): 9496-9507.
- Magin C, Hesse J, Lower J, et al. (2000). "Corf, the Rev/Rex homologue of HTDV/HERV-K, encodes an arginine-rich nuclear localization signal that exerts a trans-dominant phenotype when mutated." *Virology* 274(1): 11-16.
- Mangency M and Heidmann T (1998). "Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo." *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25): 14920-14925.
- Mangency M, de Parseval N, Thomas G, et al. (2001). "The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties." *J Gen Virol* 82(Pt 10): 2515-2518.
- Mangency M, Pothlichet J, Renard M, et al. (2005). "Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo." *Cancer Res* 65(7): 2588-2591.
- Martin GR (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." *Proc Natl Acad Sci USA* 78(12): 7634-7638.
- Mayer J, Sauter M, Racz A, et al. (1999). "An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7." *Nat Genet* 21(3): 257-258.
- Medstrand P and Blomberg J (1993). "Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues." *J. Virol.* 67:6778-6787
- Medstrand P and Mager DL (1998). "Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family." *J Virol* 72(12): 9782-9787.
- Medstrand P, van de Lagemaat LN and Mager DL (2002). "Retroelement distributions in the human genome: variations associated with age and proximity to genes." *Genome Res* 12(10): 148314-95.
- Mi S, Lee X, Li X, et al. (2000). "Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis." *Nature* 403(6771): 785-789.
- Mitalipova M, Calhoun J, Shin S, et al. (2003). "Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos." *Stem Cells* 21(5): 521-526.
- Modrow S, Falke D and Truyen U (2003). In: *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin.
- Moyes DL, Martin A, Sawcer S, et al. (2005). "The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease." *Genomics* 86(3): 337-341.

- Mueller-Lantzsch N, Sauter M, Weiskircher A, et al. (1993). "Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease." *AIDS Res Hum Retroviruses* 9(4): 343-350.
- Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, et al. (2003). "An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells." *Cancer Res* 63(24): 8735-8741.
- Nakagawa K and Harrison LC (1996). "The potential roles of endogenous retroviruses in autoimmunity." *Immunol Rev* 152: 193-236.
- O'Connell C, O'Brien S, Nash WG, et al. (1984). "ERV3, a full-length human endogenous provirus: chromosomal localization and evolutionary relationships." *Virology* 138(2): 225-235.
- Ogasawara H, Naito T, Kaneko H, et al. (2001). "Quantitative analyses of messenger RNA of human endogenous retrovirus in patients with systemic lupus erythematosus." *J Rheumatol* 28(3): 533-538.
- O'Neill RJ, O'Neill MJ and Graves JA (1998). "Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid." *Nature* 393(6680): 68-72.
- Ono M, Yasunaga T, Miyata T, et al. (1986). "Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome." *J Virol* 60(2): 589-598.
- Ono M, Kawakami M and 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(6): 2059-2062.
- Oostendorp RA, Meijer CJ and Scheper RJ (1993). "Immunosuppression by retroviral-envelope-related proteins, and their role in non-retroviral human disease." *Crit Rev Oncol Hematol* 14(3): 189-206.
- Ozel M, Pauli G and Gelderblom HR (1988). "The organization of the envelope projections on the surface of HIV." *Arch Virol* 100(3-4): 255-266.
- Pahwa S, Pahwa R, Saxinger C, et al. (1985). "Influence of the human T-lymphotropic virus/lymphadenopathy-associated virus on functions of human lymphocytes: evidence for immunosuppressive effects and polyclonal B-cell activation by banded viral preparations." *Proc Natl Acad Sci USA* 82(23): 8198-8202.
- Patience C, Takeuchi Y and Weiss RA (1997). "Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs." *Nat Med* 3(3): 282-286.
- Patzke S, Lindeskog M, Munthe E, et al. (2002). "Characterization of a novel human endogenous retrovirus, HERV-H/F, expressed in human leukemia cell lines." *Virology* 303(1): 164-173.
- Pera MF, Reubinoff B and Trounson A (2000). "Human embryonic stem cells." *J Cell Sci* 113(Pt 1): 5-10.
- Perez RP, Zhang P, Bosserhof AK, et al. (2000). "Expression of melanoma inhibitory activity in melanoma and nonmelanoma tissue specimens." *Hum Pathol* 31(11): 1381-1388.

- Phelps, RC (1997). "Nachweis der mRNA- und Proteinexpression des humanen endogenen Retrovirus HERV-K in menschlichen Geweben und Zelllinien." Dissertation.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284(5411): 143-147.
- Polsky D and Cordon-Cardo C (2003). "Oncogenes in melanoma." *Oncogene* 22(20): 3087-3091.
- Posnett DN and Yarilina AA (2001). "Sleeping with the enemy-endogenous superantigens in humans." *Immunity* 15(4): 503-506.
- Price K and Linge C (1999). "The presence of melanin in genomic DNA isolated from pigmented cell lines interferes with successful polymerase chain reaction: a solution." *Melanoma Res* 9(1): 5-9.
- Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, et al. (2003). "Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells." *Cell Transplant* 12(1): 1-11.
- Rasmussen HB, Geny C, Deforges L, et al. (1995). "Expression of endogenous retroviruses in blood mononuclear cells and brain tissue from multiple sclerosis patients." *MultScler* 1(2): 82-87.
- Rath T, Koller R, Deutinger M, et al. (2004). *MALIGNES MELANOM DER HAUT, Österreichische Gesellschaft für Chirurgische Onkologie.*
- Reiss P, Lange JM, de Ronde A, et al. (1990). "Speed of progression to AIDS and degree of antibody response to accessory gene products of HIV-1." *J Med Virol* 30(3): 163-168.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. (2000). "Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro." *Nat Biotechnol* 18(4): 399-404.
- Richards M, Fong CY, Chan K, et al. (2002). "Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* 20(9): 933-936.
- Richards M, Tan S, Fong CY, et al. (2003). "Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells." *Stem Cells* 21(5): 546-556.
- Rippon HJ and Bishop AE (2004). "Embryonic stem cells." *Cell Prolif* 37(1): 23-34.
- Rote NS, Chakrabarti S and Stetzer BP (2004). "The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development." *Placenta* 25(8-9): 673-683.
- Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. (2005). "Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy." *Clin Cancer Res* 11(16): 5678-5685.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12): 5463-5467.
- Sauter MM, Pelchen-Matthews A, Bron R, et al. (1996). "An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface." *J Cell Biol* 132(5): 795-811.

- Schagger H, Aquila H and Von Jagow G (1988). "Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis." *Anal Biochem* 173(1): 201-205.
- Schiavetti F, Thonnard J, Colau D, et al. (2002). "A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes." *Cancer Res* 62(19): 5510-5516.
- Schommer S, Sauter M, Krausslich HG, et al. (1996). "Characterization of the human endogenous retrovirus K proteinase." *J Gen Virol* 77(Pt 2): 375-379.
- Seifarth W, Baust C, Murr A, et al. (1998). "Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles." *J Virol* 72(10): 8384-8391.
- Seo N, Hayakawa S, Takigawa M, et al. (2001). "Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity." *Immunology* 103(4): 449-457.
- Shaknovich R, Yeyati PL, Ivins S, et al. (1998). "The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis." *Mol Cell Biol* 18(9):5533-5545.
- Shiroma T, Sugimoto J, Oda T, et al. (2001). "Search for active endogenous retroviruses: identification and characterization of a HERV-E gene that is expressed in the pancreas and thyroid." *J Hum Genet* 46(11): 619-625.
- Sibata M, Ikeda H, Katumata K, et al. (1997). "Human endogenous retroviruses: expression in various organs in vivo and its regulation in vitro." *Leukemia* 11(Suppl 3): 145-146.
- Simpson GR, Patience C, Lower R, et al. (1996). "Endogenous D-type (HERV-K) related sequences are packaged into retroviral particles in the placenta and possess open reading frames for reverse transcriptase." *Virology* 222(2): 451-456.
- Smith EP, Sadler TW, D'Ercole AJ, et al. (1987). "Somatomedins/insulin-like growth factors, their receptors and binding proteins are present during mouse embryogenesis." *Development* 101(1): 73-82.
- Soukas A, Socci ND, Saatkamp AD, et al. (2001). "Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro." *J Biol Chem* 276(36): 34167-34174.
- Specke V, Rubant S And Denner J (2001). "Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses." *Virology* 285(2): 177-180.
- Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, et al. (2004). "Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification." *Clin Chem* 50(3): 509-515.
- Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, et al. (2001). "Interferon-alpha-induced endogenous superantigen. a model linking environment and autoimmunity." *Immunity* 15(4): 591-601.
- Stauffer Y, Theiler G, Sperisen P, et al. (2004). "Digital expression profiles of human endogenous retroviral families in normal and cancerous tissues." *Cancer Immunol* 4: 2.

- Stavridis MP and Smith AG (2003). "Neural differentiation of mouse embryonic stem cells." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1): 45-49.
- Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, et al. (1999). "Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells." *Blood* 93(5): 1634-1642.
- Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, et al. (2002). "CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity." *Blood* 99(7): 2468-2476.
- Stoye JP and Coffin JM (1985). Endogenous Retroviruses. In: RNA tumor viruses. R. Weiss, N. Teich, H. E. Varmus and J. M. Coffin. NY, Cold Spring Harbour Lab. Press: pp357-404.
- Sugimoto J, Matsuura N, Kinja Y, et al. (2001). "Transcriptionally active HERV-K genes: identification, isolation, and chromosomal mapping." *Genomics* 72(2): 137-144.
- Tacke SJ, Kurth R and Denner J (2000). "Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation?" *Virology* 268(1): 87-93.
- Takahashi A, Day NK, Luangwedchakarn V, et al. (2001). "A retroviral-derived immunosuppressive peptide activates mitogen-activated protein kinases." *J Immunol* 166(11): 6771-6775.
- Teramoto K, Hara Y, Kumashiro Y, et al. (2005). "Teratoma formation and hepatocyte differentiation in mouse liver transplanted with mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies." *Transplant Proc* 37(1): 285-286.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos G, et al. (1996). "Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts." *Biol Reprod* 55(2): 254-259.
- Thomson JA, Marshall VS and Tronjanowski JQ (1998a). "Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells." *Apmis* 106(1): 149-156.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. (1998b). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* 282(5391): 1145-1147.
- Tonjes RR, Lower R, Boller K, et al. (1996). "HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13(Suppl 1): S261-267.
- Tonjes RR, Czauderna F and Kurth R (1999). "Genome-wide screening, cloning, chromosomal assignment, and expression of full-length human endogenous retrovirus type K." *J Virol* 73(11): 9187-9195.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, et al. (2002). "Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies." *Anal Biochem* 309(2): 293-300.
- Turner G, Barbulescu M, Su M, et al. (2001). "Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans." *Curr Biol* 11(19): 1531-1535.
- Urnovitz HB and Murphy WH (1996). "Human endogenous retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human disease." *Clin Microbiol Rev* 9(1): 72-99.

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. (2001). "The sequence of the human genome." *Science* 291(5507): 1304-1351.
- Vogt PK (1997a). Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses. In: *Retroviruses*. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. NY, Cold Spring Harbour Lab. Press: pp1-26.
- Vogt VM (1997b). Retroviral Virions and Genomes. In: *Retroviruses*. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. NY, Cold Spring Harbour Lab. Press: pp27-70.
- Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, et al. (2003). "Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint." *Rheumatology (Oxford)* 42(1): 162-165.
- Wang-Johanning F, Frost AR, Johanning GL, et al. (2001). "Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer." *Clin Cancer Res* 7(6): 1553-60.
- Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, et al. (2003). "Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer." *Oncogene* 22(10): 1528-1535.
- Weinstock, M. A. (1998). "Issues in the epidemiology of melanoma." *Hematol Oncol Clin North Am* 12(4): 681-968.
- Whiteman DC, Whiteman CA and Green AC (2001). "Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies." *Cancer Causes Control* 12(1): 69-82.
- Wilkinson DA, Mager DL and Leong JA (1994). Endogenous Human Retroviruses. In: *The Retroviridae*. J. A. Levy. NY, USA, Plenum Press: pp465-535.
- Wobus AM, Guan K and Pich U (2001). "In vitro differentiation of embryonic stem cells and analysis of cellular phenotypes." *Methods Mol Biol* 158: 263-286.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. (2000). "Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors." *Nature* 408(6808): 92-96.
- Yang J, Bogerd HP, Peng S, et al. (1999). "An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein." *Proc Natl Acad Sci USA* 96(23): 13404-13408.
- Yi JM, Kim HM, Lee WH, et al. (2002). "Molecular cloning and phylogenetic analysis of new human endogenous retrovirus HERV-W family in cancer cells." *Curr Microbiol* 44(3):216-220.
- Zuo L, Weger J, Yang Q, et al. (1996). "Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma." *Nat Genet* 12(1): 97-99.

Anhang

I. Primer und Sonden

Primer und Sonde: Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland

Tabelle 1: verwendete Primer und Sonden

Bezeichnung	Lokalisation	Sequenz 5'→3'	
GAPDH for	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase	5'CTCAGTGTAGCCCAGGA	60°C
GAPDH rev		TGC	
hsGAPDH for	humane Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase	5'GGCGATGCTGGCGCTG	60°C
hsGAPDH rev		AGTAC	
MART-1 for	Melanona Antigen recognized by T-Cell -1	5'ACTGCTCATCGGCTGTT	58°C
MART-1 rev		GGTATTG	
HERV-H for	HERV-H <i>gag</i>	5'CTTTTATTACCCAATCTG	50°C
HERV-H rev		CTCCCGAYAT ¹	
HERV-R for	HERV-R <i>env</i>	5'TTTAGTGGTGGACAGTC	50°C
HERV-R rev		TCTTTTCCARTG ²	
HERV-W for	HERV-W <i>pol</i>	5'CCATGGGAAGCAAGGG	50°C
HERV-W rev		AACT	
rekTM for	HERV-K <i>env</i> (gp36)	5'CTTCCCCAGCGAGCAA	55°C
rekTM rev		TAC	
np9-G	HERV-K <i>np9</i> aus Armbrüster 2004	5'GGCCAGGCATCAGCCC	58°C
np9-H		AAGACTTG	
		5'CGCGGGATCCATGAACCCAT	
		CGGAGATGCAA ^{3,4}	
		5'CGCGGGATCCACAGAATCTC	
		AAGGCAGAAG ^{3,4}	

P1	HERV-K LTR (U5)	5'GAGGCTGGCGGGATCC TC	
P2	HERV-K LTR (leader)	5'GAAGGTACGCTCGAGC GTAATCATTGAG	
P3	HERV-K <i>gag</i>	5'GAGCCATTACCGGCTCT GCTACATATTCG	
P4	HERV-K <i>pol</i>	5'GTACCACTCCTCAGATG CAACTTAATCTAGC	60°C
P5	HERV-K <i>env</i> (SU)	5'GTGACATCCCGCTTACC ATGTGATAAGTG	
P6	HERV-K <i>env</i> (gp36)	5'CGTCTAACCATGTCCCA GTGATGC	
P7	HERV-K <i>env</i> (gp36)	5'ACAAAGCTTCCTACGTC ATCATGGCCCCG	
np9 for	HERV-K <i>np9</i> aus Armbrüster 2004	5'ATGAACCCATCGGAGAT GCAA	58°C
np9 rev		5'ACAGAATCTCAAGGCAG AAG	
HERV-K Sonde	HERV-K	FAM-5'AGGTACGCTCG AGCGTGGTCATTGAGG	67°C
Pfor	HERV-K LTR (leader)	5'CCAACGTGGAGGCTTTT CTCTAG	
PrevVL	HERV-K VL	5'CCTGCTTGTTT*TAGTTT CCTTACCA	
PrevENV	HERV-K env	5'AGGGAGACTTACCACCA TTGATAC	54°C
PrevREC	HERV-K rec	5'GGGTATACCTGCAGAC ACCATTG	
PrevNP9	HERV-K np9	5'GTACACCTGCAGTCTCC GTCTCC	

1 Y=Pyrimidin Base: C oder T , 2 R=Purin Base: G oder A, 3 a,c,g oder t nicht komplementäre Basen, 4 BamHI Schnittstelle ist fett dargestellt, 5 HindIII Schnittstelle ist fett dargestellt, 6 Stop Codon ist doppelt unterstrichen

kommerzielle Primer für die Sequenzierung			
malE	MBP-Region in pMAL	5'GGTCGTCAGACTGTCTGA TGAAGCC	60°C
T7 Promotor	T7-Promotor pCALn	5'TAATACGACTCACTATA GGG	50°C
T7 Terminator	T7-Terminator pCALn	5'GCTAGTTAT'TGCTCAGC GG	50°C
M13 reverse	M13 reverse priming site in pCR4-TOPO	5'CAGGAAACAGCTATGAC	55°C
M13 forward	M13 forward priming site in pCR4-TOPO	5'GTAAAACGACGGCCAG	55°C
T3	T3 priming site in pCR4-TOPO	5'ATTAACCCTCACTAAAG GGA	55°C
T7	T7 priming site in pCR4-TOPO	5'TAATACGACTCACTATA GGG	55°C

II. Melanomgewebe und -zellen

Tabelle 2: Expression in Melanomgeweben und -zellen

Gewebe	DNA	MART-1	Expression von HERV-K				Expression HERVs			klinische Daten				
			VL	env	rec	np9	H	R	W	Alter ¹	Geschlecht	Tumor- dicke ²	Stadium ³	Typ ⁴
1	VH	-	+	-	-	+	+	+	-	81	m	n.b	n.b	l
2	OL	-	+	+	-	-	+	+	-	41	m	n.b	n.b	n.b
3	WR	-	+	+	-	-	+	+	-	72	m	n.b	IV	k
4	BC5													
5	PV	-	+	+	-	-	+	+	-	81	w	n.b	III	k
6	SV5													
7	SE	-	+	+	+	+				86	w	n.b	IV	k
8	KLM	-	+	+	+	+	+	+	-	50	m	n.b	III	l
9	LG	-	+	+	-	-	+	+	-	75	m	n.b	III	l
10	HK	-	+	+	-	-	+	+	-	42	w	n.b	IV	k
11	SC	-	+	+	+	(hel)	-	+	+	64	m	n.b	III	l
12	SR	-	+	+	-	-	+	+	-	60	m	n.b	n.b	l
13	LH7	-	+	+	-	-	-	+	+	71	w	n.b	n.b	n.b
14	KH	-	+	+	-	-	-	+	+	64	w	n.b	III	k
15	LA	-	+	+	-	-	-	+	+	44	m	n.b	IV	k
16	JA	-	+	+	+/-	-	+	+	-					
17	HÖK5													
18	HI	-	+	+	-	+	-			67	w	n.b	IV	brain
19	SG5													
20	WD	-	+	+	-	-	-	+	+	59	m	n.b	IV	l
21	TB	-	+	+	+	(hel)	+	+	+	58	w	n.b	IV	l
22	FM	-	+	+	+	+	+/-	+	+	28	w	n.b	IV	lung
23	KOH5													
24	BN	-	+	+	-	-	-	+	+	44	m	n.b	III	l
25	SD5													
26	GW	-	+	+/-	-	-	-	+	+					
27	LU	-	+	+	-	-	-	+	+	69	w	n.b	III	k
28	MA	-	+	+	+	(hel)	-	+	+	58	w	n.b	IV	l
29	FE	-	+	+	+	(hel)	/-	+	+	80	w	n.b	III	l
30	LAN	-	+	+	-	+/-	-	+	+	65	m	n.b	III	l
31	GB	-	+/-	+	-	-	-	+	+	42	w	n.b	IV	lung
32	AA	-	+	+	+	+	+	-	+	62	m	n.b	IV	l
33	AB	-	+	+	+/-	+/-	-	-	+	68	m	1,1	IV	k
34	AC	-	+	+	+	+/-	-	+	+	69	w	n.b	IV	k
35	AD	-	+	+	-	-	-	-	+	55	w	n.b	III	l
36	AE	-	+	+	-	-	-	+	+	56	w	n.b	IV	k
37	AF	-	+	+	+/-	+	(hel)	-	-	39	m	1	IV	n.b
38	AG	-	+	+	-	+	-	-	+/-	80	w	0,64	IV	k
39	AH	-	+	+	+	+	-	-	+	44	w	n.b	IV	k
40	AI	-	+	+	-	-	-	-	+	47	m	n.b	IV	l
41	Aj	-	+	+	-	-	-	+	+	46	m	10	IV	k
42	AK	-	+	+	-	-	-	+/-	+	63	m	5	IV	l
43	AL	-	+	+	-	-	+	+	+					
44	AM	-	+	+	-	-	-	+	+					
45	AN	-	+	+	-	-	+	+	+					
46	AO	-	+	+	+	+	+	+	+					
47	AP	-	+	+	-	-	-	+	+					
48	AQ	-	+	+	+	+	+	+	+					
49	AR	-	+	+	-	-	-	+	+					
50	AS	-	+	+	+	+/-	-	+	+					
51	AT	-	+	+	+	+	+	+	+					
52	AU	-	+	+	-	-	+	+	+					
53	AV	-	+	+	-	-	-	+	+					
54	AW	-	+	+	-	-	-	-	+/-					
55	AX	-	+	+	-	-	-	+	+					

Zelllinien	DNA	MART-1	Expression HERV-K				Expression HERVs			klinische Daten				
			VL	env	rec	np9	H	R	W	Alter ¹	Geschlecht	Tumor- dicke ²	Stadium ³	Typ ⁴
1 BA	-	+	+	+	+(hel)	-	-	+	+	41	w	4	III	k
2 GL	-	+	+	-	-	-	-	+	+					
3 KU	-	+	+	-	-	-	+	+	+	61	m	5	IV	k
4 LAU	-	+	+	+	+(hel)	-	-	+	+	52	m	n.b	III	k
5 MA6	-	+	+	-	-	-	-	+	+	59	w	n.b	n.b	n.b
6 POS	-	+	+	-	-	-	-	+	+					
7 RA	-	+	+	-	-	-	-	+	+	84	w	3,7	IV	k
8 SCHM	-	+	+	+	+	+	-	+	+	55	w	2	IV	k
9 SCHW	-	+	+	+	+	+	-	+	+	42	w	4	IV	k
10 SO	-	+	+	-	-	-	-	+	+	59	m	5	IV	l
11 TR	-	+	+	+	+	+				69	w	n.b	IV	l
12 ZD	-	+	+	-	-	-	-	+	+	55	m	5	IV	k
13 ZO	-	+	+	+	+(hel)	-	-	+	+	64	w	2,55	III	k
32 AA	-	+	+	+	+	-	-	-	-	62	m	n.b	IV	l
33 AB	-	+	+	-	-	-	-	+/-	-	68	m	1,1	IV	k
34 AC	-	+	+	+	+	-	+	+	+	69	w	n.b	IV	k
35 AD	-	+	+	-	-	-	+	+	-	55	w	n.b	III	l
36 AE	-	+	+	-	-	-	+	+	+/-	56	w	n.b	IV	k
37 AF	-	+/-	+	-	-	-	+	+	+/-	39	m	1	IV	n.b
38 AG	-	+	+	-	-	-	+/-	+	+/-	80	w	0,64	IV	k
39 AH	-	+	+	+	+	-	+	+	-	44	w	n.b	IV	k
40 AI	-	+/-	+	-	-	-	+/-	+	-	47	m	n.b	IV	l
41 AJ	-	+	+	-	-	-	+	+	+	46	m	10	IV	k
42 AK	-	+/-	+	-	-	-	+	+	+	63	m	5	IV	l
43 AL	-	+	+	-	-	-	+/-	+	-					
44 AM	-	+	+	-	-	-	+/-	+	+					
45 AN	-	+	+	+	+	+	+	+	+					
46 AO	-	+	+	+	+	-	+	+	+					
47 AP	-	+	+	+	+	+	+	+	+					
48 AQ	-	+	+	-	-	-	+	+	+/-					
49 AR	-	+	+	-	-	-	+	+	-					
50 AS	-	+	+	-	+/-	+	+	+	+					
51 AT	-	+	+	+	+	+	+	+	+					
52 AU	-	+	+	-	-	-	+	+	-					
53 AV	-	+	+	-	-	-	+	+	+					
54 AW	-	-	+	-	-	-	+	+	+					
55 AX	-	+	+	-	-	-	+	+	+					

+ Expression, +/- schwache Expression, - keine Expression, n.b. nicht bestimmt,
1 Alter bei der ersten Tumordiagnose, 2 Tumordicke in mm, 3 Stadium nach American Joint Committee on Cancer 2001 (siehe Einleitung Seite 18), 4 k – kutane Metastase 1 - Lymphknotenmetastase, 5 PCR ist durch Melanin inhibiert, 6 Brustkarzinom, 7 Merkelzellkarzinom, hel 1,5kB Fragment zusätzlich zu rec vorhanden

Kontrollzellen	DNA	MART-1	Expression von HERV-K				Expression HERVs		
			VL	env	rec	np9	H	R	W
56 Jurkat	-	-	+	-	-	-	+	+	+
57 A 27/80	-	-	+	-	-	-	+	+	+/-
58 HL60	-	-	+	-	-	-	+	+	+
59 U 87	-	-	+	-	-	-	+	+	-
60 SW 620	-	-	+	-	-	-	+	+	+
61 7774	-	-	+	-	-	-	+	+	+/-
62 SW 480	-	-	+	-	-	-	+	+	+/-
63 Hacat	-	-	+	-	-	-	+	+	+
64 120/87	-	-	+	+/-	-	-	+	+	+
65 257/85	-	-	+	-	-	-	+	+	+
66 K 562	-	-	+	-	-	-	+	+	+
67 Namalwa	-	-	+	-	-	-	+	+	+
68 SK70V3	-	-	+	+/-	-	-	+	+	+/-
69 D 181/80	-	-	+	-	-	-	+	+	+/-
70 EA 14	-	-	+	-	-	-	+	+	+/-
71 A 431	-	-	+	-	-	-	-	+	+

III. verwendete Seren und Antikörper

Tabelle 3: verwendete Antikörper

Bezeichnung	spezifisch für	Verdünnung	Herkunft
Ziege 7	HERV-K TM	1:500	
Ziege 26	HERV-K TM	1:500	
Kaninchen 3	HERV-K Rec	1:100	Dr. Löwer
Kaninchen 4	HERV-K Rec	1:450	Dr. Löwer
Ziege 29	HERV-K Np9	1:100	
GAPDH	humanes GAPDH	1:100	abcam
β -Aktin	β -Aktin	1:100	Sigma
HMB45	humanes gp100	1:50	DAKO
Tyrosinase	humane Tyrosinase	1:50	Novocastra
α - Ziege	Ziegen IgGs	1:2000	DAKO
α - Kaninchen	Kaninchen IgGs	1:2000	DAKO
α - Maus	Maus IgGs	1:2000	DAKO
LSAB-Kit	Kaninchen, Ziege und Maus Ig's	1:500	DAKO
α - Human	humane IgGs, IgA, IgM	1:2000	Sigma
α - Ziege IF	Ziegen IgGs	1:200	Sigma

Tabelle 4: verwendete Patientenseren

Patient	HERV-K TM	HERV-K Np9	Klinische Daten			
	Antikörper	Antikörper	Alter ¹	Geschlecht	Tumordicke ²	Stadium ³
1	+	-	72	w	2,7	III
2	+	-	36	w	19	IV
3	+	-	65	m	4,5	I
4	+	-	51	w	2	IV
5	+	-	31	m	n.b.	IV
6	+	-	82	w	6,5	III
7	+	-	70	m	1,24	III
8	+	-	60	m	3	I
9	+	-	39	w	1,1	I
10	+	-	79	m	13	II
11	+	-	59	m	2	II
12	+	-	40	w	n.b.	III
13	+	-	80	w	1,35	III
14	+/-	-	20	m	1,8	II
15	+/-	-	68	m	1,1	III
16	+/-	-	29	w	1,3	III
17	+/-	-	77	w	1,45	II
18	+/-	-	55	m	2,16	III
19	+/-	-	53	m	1,51	III
20	+/-	-	80	m	0,22	I
21	+/-	-	69	m	1,38	I
22	+/-	-	83	w	n.b.	I
23	-	-	62	w	2,5	II
24	-	-	71	m	1	I
25	-	-	49	w	3,2	III
26	-	-	65	m	0,26	III
27	-	-	40	m	1,2	III
28	-	-	52	m	0,95	I
29	-	-	47	m	n.b.	IV
30	-	-	52	m	0,99	III
31	-	-	40	m	0,96	III
32	-	-	62	m	2,4	I
33	-	-	62	w	2,86	II
34	-	-	90	w	0,65	II
35	-	-	49	w	3,2	IV
36	-	-	64	m	n.b.	IV
37	-	-	61	m	n.b.	IV
38	-	-	16	m	n.b.	III
39	-	-	67	m	3,5	III
40	-	-	68	m	1,8	IV
41	-	-	43	m	n.b.	IV
42	-	-	38	m	1,25	II
43	-	-	43	w	1,84	III
44	-	-	44	w	n.b.	II
45	-	-	45	m	0,5	III
46	-	-	51	m	2,79	IV
47	-	-	74	m	7	III
48	-	-	76	m	4	III
49	-	-	49	m	0,64	I
50	-	-	60	m	1,25	I
51	-	-	73	w	0,59	I
20	-	-	60	w	1,25	II
53	-	-	62	m	0,9	III
54	-	-	56	w	0,43	III
55	-	-	40	m	2,1	III
56	-	-	84	w	3,7	III
57	-	-	56	w	0,8	IV
58	-	-	63	m	0,62	I
59	-	-	60	m	4,22	III
60	-	-	83	w	n.b.	III
61	-	-				
62	-	-				
63	-	-				
64	-	-				
65	-	-				
66	-	-				

67	-	-					
68	-	-					
69	-	-					
70	-	-					
71	-	-					
72	-	-					
73	-	-					
74	-	-					
75	-	-					
76	-	-					
78	-	-					
79	-	-					
80 bis 100	negativ Kontrollen, Allopezicpatienten						
101	AA	-	-	62	m	n.b	IV
102	AB	+	-	68	m	1,1	IV
103	AC	-	-	69	w	n.b	IV
104	AD	-	-	55	w	n.b	III
105	AF	-	-	56	w	n.b	IV
106	AG	-	-	39	m	1	IV
107	AH	-	-	80	w	0,64	IV
108	AI	-	-	44	w	n.b	IV
109	AJ	-	-	47	m	n.b	IV
110	AK	+	-	46	m	10	IV
111	AL	+	-	63	m	5	IV
112	AM	-	-				
113	AN	-	-				
114	AO	-	-				
116	AQ	+	-				
117	AR	-	-				
118	AS	-	-				
119	AT	-	-				
120	AU	-	-				
121	AV	-	-				
122	AW	-	-				
123	AX	-	-				

25 Seren normaler negativ Kontrollen
Blurspender

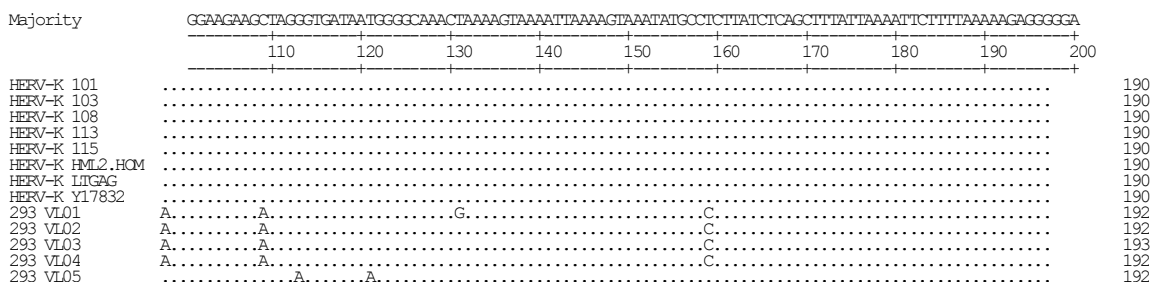
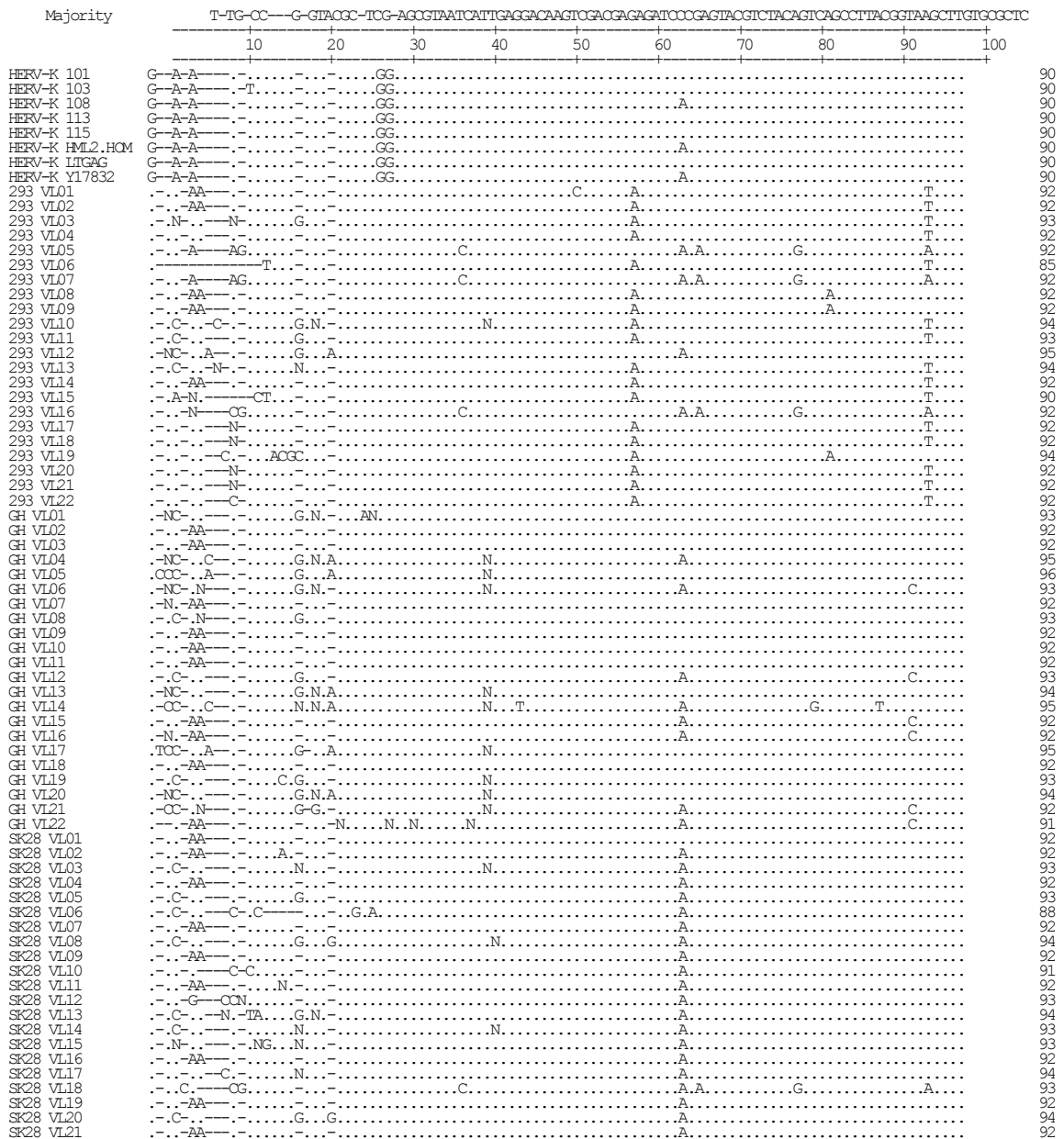
+ positive Reaktion, +/- schwache Reaktion, - keine Reaktion, n.b. nicht bestimmt,

1 Alter bei der ersten Tumordiagnose, 2 Tumordicke in mm, 3 Stadium nach AJCC 2001 (siehe Einleitung Seite 18)

IV. Alignment der sequenzierten PCR-Transkripte von HERV-K

A Volllängen Transkripte

Verwendete HERV-K aus der NCBI DatenBank: HERV-K 101, 103, 113 und 115 (Accnrns. AF164609, AF164611, AY037928 und AY037929), HERV-K HML2.HQM (Accnr. AF074086), HERKLTGAG (Accnr. Y08032) und HERV-K C7 (Accnrns. Y17832).



GH env23	-----CC.TTGAA-.GT.C-C-----TT-.G-.G.-----.-.CTTG.G.N.....N.GN-N.G.N.....G.....N.	67
GH env24	-----NC.T-T-AA.GT------TC-.GN-----N--C-T.G.....N.N--N.....N.....A.	61
GH env03	-----COOCTGAGGTACGCTCAGAGGTA.TCA.TGAGGAC.AGTC.ACGAGAGATCCCGAGTAC.TCT.CAGTC.GCCTTAC.GAGAAATCAGC.T.C.	96
GH env13	TTGG.....C.....A.....	100
GH env17	TTGG.....C.....A.....	100
GH env18	TTGG.....C.....A.....	99
GH env02	TTGG.....CN.....A.....	83
GH env04	TTGG.....NC.....A.....	83
GH env07	TTGG.....NC.....A.....	83
GH env15	TTGG.....C.....A.....	83

	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200	
HERV-K113	C.ACA.TC.G..TTAC.....A.....CA.....GC.GAGAC.G.GACAACCGCAATGAGCAC	155
HERV-K MERVA.....	69
HERV-K EnvA.....T.....	161
SK28 env01	N.....N.....A.....	158
SK28 env02	T.....N.....A.....	160
SK28 env03	T.....N.....A.....N.....	165
SK28 env04	T-N.....N.....-N-N.....A.....N.....N.....	136
SK28 env05	N.....N.....N.....A.....	158
SK28 env06A.....	163
SK28 env07	N.....N.....N.....A.....N.....	159
SK28 env08	T.....N.....N.....N.....A.....N.....	160
SK28 env09A.....	165
SK28 env10	T.....-.....T.....A.....C.....	159
SK28 env11A.....	163
SK28 env12A.....	164
SK28 env13A.....	164
SK28 env14	T.....N.....-G.N.N..N.....A.....	155
SK28 env15A.....	164
SK28 env16A.....	162
SK28 env17	N.....-.....N.N.....N.....A.....	160
SK28 env18A.....	164
SK28 env19A.....	164
SK28 env20A.....	164
SK28 env21A.....	164
GH env01	T.N.....N.....T.N.....N.....A.....N.....	158
GH env05	T.....N.....C.....A.....	161
GH env08	T.....N.....N.....-G.N..C..N.....A.....N.....	153
GH env09A.....	164
GH env10	T-NCCAN.....G.N.N.-.....T.N.C.-.....N.A.....N.....-.....T.....C.....	141
GH env11	N.....N.....A.....	162
GH env12A.....	165
GH env16	T.....N.....A.....N.....	163
GH env14	T.....N.....N.....N.N.....N..N.A.....	155
GH env20A.....	164
GH env21	T.....N.....-G.N.....N.....A.....N.....N.....	141
GH env23	T.....N.N.....N..N..N..N.A.....	165
GH env24	T.....N.....N.N.....N..N.A.....	159

GH env03	G.TTG.AT.C..ACTA.....GG.....ACG.AGATG.T.ACA-----	180
GH env13	-----	184
GH env17	-----	184
GH env18	-----	183
GH env02	-----C.....C.....	150
GH env04	-----	150
GH env07	-----	150
GH env15	-----	149

	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300	
HERV-K113	CGTTGACTCACA-GATGACA-AAATGTTGACGTGAGAGACAGATGAGTTGCCATCCACCAAGAGGGCAGAGCCCGGACTTTGGCCCAACTAAG	253
HERV-K MERVG.....A.....	167
HERV-K ENVA.....	259
SK28 env01A.....	256
SK28 env02A.....	258
SK28 env03A.....	263
SK28 env04A.....	234
SK28 env05A.....	256
SK28 env06A.....	261
SK28 env07A.....	257
SK28 env08	N.....A.....	258
SK28 env09A.....	263
SK28 env10A.....	257
SK28 env11A.....	261
SK28 env12A.....	262
SK28 env13A.....	262
SK28 env14A.....	253
SK28 env15A.....	262
SK28 env16A.....A.....	260
SK28 env17A.....	258
SK28 env18A.....	262
SK28 env19A.....	262
SK28 env20A.....	262
SK28 env21A.....	262
GH env01A.....	256
GH env05A.....	259
GH env08A.....	251
GH env09A.....	262
GH env10A.....	239
GH env11A.....	260
GH env12A.....	263
GH env16A.....	261
GH env14	N.....A.....	253
GH env20A.....	262
GH env21A.....	239
GH env23	A.....C.....	264
GH env24A.....	257

GH env03	-----	180
GH env13	-----	184
GH env17	-----	184
GH env18	-----	183
GH env02	-----	150
GH env04	-----	150
GH env07	-----	150
GH env15	-----	149

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
HERV-K113	AAGCTGACGCAGTTAGCTACAAAATATCTAGAGAAACAAGGTGACACAAACCCAGAGAGTATGCTTGCTTGOAGCCTTGATGATTGATCAATGGTGG										353
HERV-K MERV										367
HERV-K ENV										359
SK28 env01										356
SK28 env02										358
SK28 env03										363
SK28 env04										334
SK28 env05										356
SK28 env06										361
SK28 env07										357
SK28 env08										358
SK28 env09										363
SK28 env10										357
SK28 env11										361
SK28 env12										362
SK28 env13										362
SK28 env14										353
SK28 env15										362
SK28 env16										360
SK28 env17										358
SK28 env18										362
SK28 env19										362
SK28 env20										362
SK28 env21										362
GH env01										356
GH env05										359
GH env08										351
GH env09										362
GH env10										339
GH env11										360
GH env12										363
GH env16										361
GH env14										353
GH env20										362
GH env21										339
GH env23										364
GH env24										357
GH env03	=====										180
GH env13	=====										184
GH env17	=====										184
GH env18	=====										183
GH env02	=====										150
GH env04	=====										150
GH env07	=====										150
GH env15	=====										149

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
HERV-K113	TAAGTCTCCCTATGCTGAGGAGCAGCTGCAGCTAACATACTACTGGGGCTATGTCCTTTTCCCGCCCTTAATTCGGG.....										453
HERV-K MERV										367
HERV-K ENV										459
SK28 env01										456
SK28 env02										458
SK28 env03										463
SK28 env04										434
SK28 env05										456
SK28 env06										461
SK28 env07										457
SK28 env08										458
SK28 env09										463
SK28 env10										457
SK28 env11										461
SK28 env12										462
SK28 env13										462
SK28 env14										453
SK28 env15										462
SK28 env16										460
SK28 env17										458
SK28 env18										462
SK28 env19										462
SK28 env20										462
SK28 env21										462
GH env01										456
GH env05										459
GH env08										451
GH env09										462
GH env10										439
GH env11										460
GH env12										463
GH env16										461
GH env14										453
GH env20										462
GH env21										439
GH env23										464
GH env24										457
GH env03	=====C.....										200
GH env13	=====										204
GH env17	=====										204
GH env18	=====										203
GH env02	=====										170
GH env04	=====										170
GH env07	=====										170
GH env15	=====										169

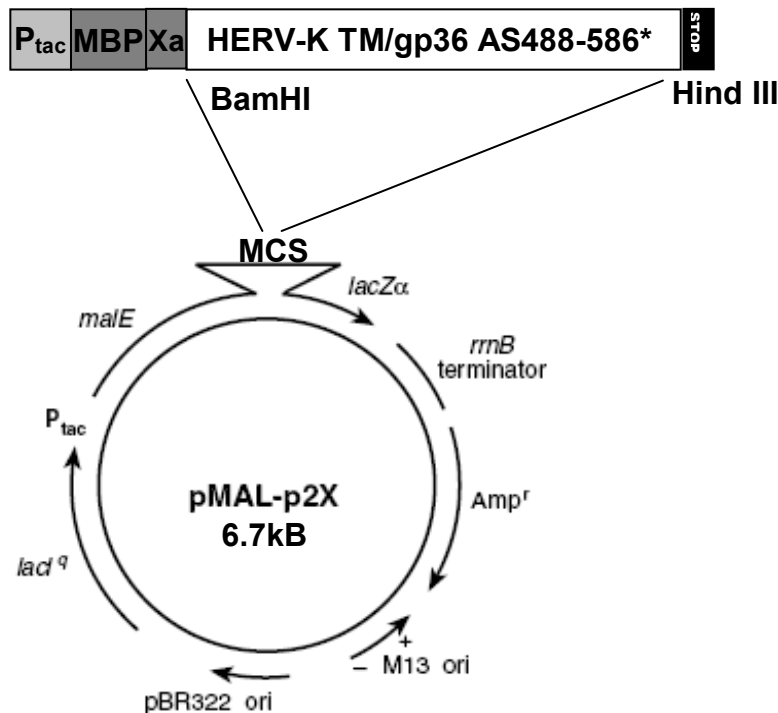
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
HERV-K113A.....T.T.....T.....										553
HERV-K MERVC.....T.....										467
HERV-K ENVC.....T.....										559
SK28 env01C.....T.....										556
SK28 env02C.....T.....										558
SK28 env03C.....T.....										563
SK28 env04C.....T.....										534
SK28 env05C.....T.....										556
SK28 env06C.....T.....										561
SK28 env07C.....T.....										557
SK28 env08C.....T.....										558
SK28 env09C.....T.....										563
SK28 env10C.....T.....										557
SK28 env11C.....T.....										561
SK28 env12C.....T.....										562

SK28 env13C.....T.....N.....	562
SK28 env14C.....T.....	553
SK28 env15C.....T.....	562
SK28 env16C.....T.....	560
SK28 env17C.....T.....	558
SK28 env18C.....T.....	562
SK28 env19C.....T.....	562
SK28 env20C.....T.....	562
SK28 env21C.....T.....	562
GH env01C.....T.....	556
GH env05C.....T.....	559
GH env08C.....T.....	551
GH env09C.....T.....	562
GH env10C.....T.....	539
GH env11C.....T.....	560
GH env12C.....T.....	563
GH env16C.....T.....	561
GH env14C.....T.....	553
GH env20C.....T.....	562
GH env21C.....T.....	539
GH env23C.....T.....	564
GH env24C.....T.....	557
GH env03G.....C.A.....C.....	300
GH env13A.....T.....	304
GH env17A.....T.....	304
GH env18A.....T.....	303
GH env02A.....T.....	270
GH env04A.....T.....	270
GH env07A.....T.....	270
GH env15A.....T.....	269

	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700	
HERV-K113C.....G.....T.C.....	649
HERV-K MERVA.....G.....	563
HERV-K ENVA.....	655
SK28 env01A.....	652
SK28 env02A.....	654
SK28 env03A.....	659
SK28 env04A.....	630
SK28 env05A.....	652
SK28 env06A.....	657
SK28 env07A.....	653
SK28 env08A.....	654
SK28 env09A.....N.....T.....G.N.....	661
SK28 env10A.....	653
SK28 env11A.....	657
SK28 env12A.....	659
SK28 env13A.....N.....G.N.....A.....G.....N.....N.....	658
SK28 env14A.....	649
SK28 env15A.....NA.....G.G.....N.....	660
SK28 env16A.....	656
SK28 env17A.....	654
SK28 env18A.....N.....G.N.....	658
SK28 env19A.....	657
SK28 env20A.....	658
SK28 env21A.....	658
GH env01A.....	652
GH env05A.....	655
GH env08C.A.....	647
GH env09A.T.....N.....N.....N.N.....N.....	658
GH env10A.....	635
GH env11A.....	656
GH env12A.....AN.....N.....N.....N.....N.....N.....	659
GH env16A.....	657
GH env14A.....	649
GH env20A.....NA.....	659
GH env21A.....	635
GH env23A.....	660
GH env24A.....	653
GH env03T.....C.....C.T.....	396
GH env13	400
GH env17T.....	400
GH env18	399
GH env02A.....	366
GH env04A.....	366
GH env07	366
GH env15	365

V. Plasmidkarten

pMAL HERV-K TM/gp36



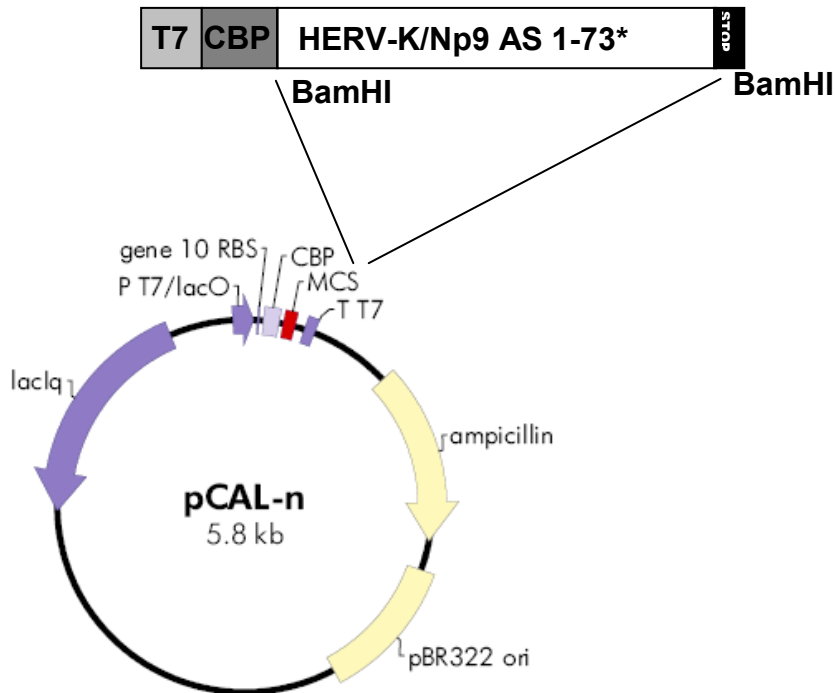
Aminosäuresequenz des translatierten Fusionsproteins:

NH₂MKIKTGARILALSALTMMFSASALAKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKF
 EKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPD
 KAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSILYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKE
 LKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDIKDVGVNDNAGAKAG
 LTFVLVLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTV
 LPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAV
 ALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTV
 DEALKDAQTNSSSNNNNNNNNNNNLGIEGRISEFGSTSNRQCAGIRLGSVALHSS
 VQSVNFVNDWQKNSTRLWNSQSSIDQKLANQINDLRQTVIWMGDRLMSLEHRFQ
 LQCDWNTSDFCITPQIYNESEHHDWVRHHLQGREDNLTLDISNLKEQIFEASKPI
 LNLVPGTEAIAAGVADGLANLNPVTWVKTIGSTT-COOH

* bezogen auf HERV-K HML2.HOM; Accnr.Q69384

Die Klonierung erfolgte mit den Primern rekTM-forward und rekTM-reverse; Seite I
 pMAL c2X: New England Biolabs

pCALn HERV-K/Np9

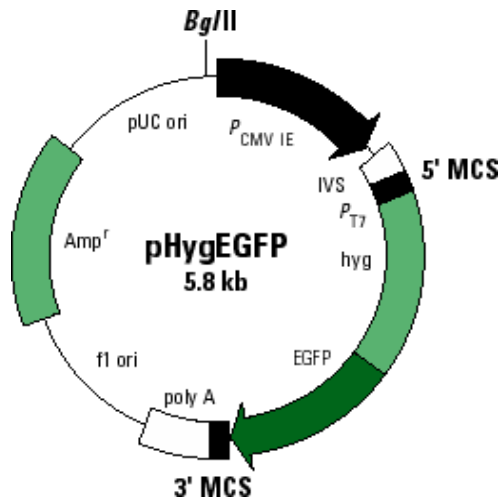


Aminosäuresequenz des translatierten Fusionsproteins:
 NH₂MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGSMNPSEMQRKGPPRRCLQVYP
 TAPKRQRPSRTGHDDDDGGFVEKKRGKCGEKQERSDCYCVVERSRRHRLHFVMC-
 COOH

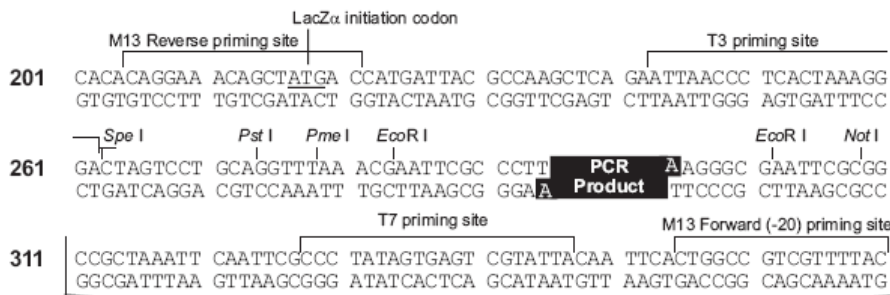
* bezogen auf HERV-K; Armbrüster et al. (2002)

Die Klonierung erfolgte mit den Primern np9-G und np9-H; Seite I
 pCALn: Stratagene

pHygEGFP (BD Bioscience, Palo Alto, CA, USA)



pCR4®-TOPO® (Invitrogen)



Danksagung

„But in the end, what is a friend
if not some one, to help pretend “

Für die fachliche und finanzielle Unterstützung danke ich Prof. Dr. Reinhardt Kurth.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Detlev Krüger für die externe Betreuung der
Dissertationsarbeit.

Für die Betreuung der praktischen Arbeit und die stetige Diskussionsbereitschaft danke ich
Dr. Joachim Denner.

Bei meiner gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Uwe, Britta, Stefan, Alex, Markus und
Mirko möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die stets hilfreichen Diskussionen
bedanken. Gleiches gilt für die Arbeitsgruppe P12, hier besonders Steve Norley für die
Durchsicht der englischen Texte. Allen anderen Freunden und Kollegen vom Fach gilt der
Dank für den Austausch von Reagenzien und Erfahrung.

Bei Alexander Jaschke, Astrid Enkelmann und Micha Schröter möchte ich mich für ihren
Einsatz bei Diplomarbeit und Praktikum bedanken.

Mein großer Dank gilt meiner Familie für die finanzielle und moralische Unterstützung
während des gesamten Studiums und speziell der letzten drei Jahre. Besonders Alexander, der
mich immer in allem unterstützt hat und für alles was im Leben (sonst noch) wichtig ist.

Dank gilt folgenden Kooperationspartnern:

Frau Dr. Maja Hofmann und Herrn Dr. Uwe Tefzer von der Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie an der Berliner Charité und Frau Petra Siegel für die
unermüdliche Färbung der Immunhistologien.

Frau Stefanie Terstegge und Herrn Dr. Oliver Brüstle vom Institut für Rekonstruktive
Neurobiology, LIFE & BRAIN GmbH Cellomics Unit in Bonn.

Frau Silvia Hahn und Frau Dr. Löwer vom Paul Ehrlich Institut in Langen.

Dr. Muhesin Özel und Frau Gudrun Holland für die Anfertigung der REM- und TEM-
Aufnahmen, und Herrn Madela für die Unterstützung bei der Immunfluoreszenz.

Publikationen

Veröffentlichungen
akzeptiert

„Expression of the Human Endogenous Retrovirus HERV-K Transmembrane Envelope, Rec and Np9 Proteins in Melanomas and Melanoma Cell Lines.”

Buscher K, Hahn S, Hofmann M, Trefzer U, Özel M, Sterry W, Löwer J, Löwer R, Kurth R and Denner J

Melanoma Research accepted

06/2005

„No Evidence for Infection of Human Embryonic Stem - Cells by Feeder Cell-derived Murine Leukemia Viruses (MuLV)”

Amit M, Winkler ME, Menke S, Bruning E, Buscher K, Denner J, Haverich A, Itskovitz-Eldor J, Martin U.

Stem Cells 2005 23(6):761-71.

05/2005

„Expression of the Human Endogenous Retrovirus HERV-K in Melanomas and Melanoma Cell Lines”

Buscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J.

Cancer Research 2005 65(10):4172-4180.

02/2002

„Porcine mesenchymal stem cell - Induction of distinct mesenchymal cell lineages”

Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Haupl T, Sittinger M

Cell Tissue Res 2002 307(3):321–327

Posterpräsentationen

07/2005

„Expression of human endogenous retrovirus HERV-K in melanomas and other human tumors”

Buscher K, Hofman M, Trefzer U, Sterry W, Kurth R, Denner J

XXII. Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, Heidelberg

03/2005

„Expression of Human Endogenous Retrovirus HERV-K and other HERVs in Melanomas and Melanoma Cell Lines”

Buscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J

Tagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen

- 10/2004 „Expression von HERV-K und anderen HERVs in Melanomen und Melanomzellen“
Buscher K
Virologisches Seminar am Robert Koch-Institut
- 03/2004 „Expression of Human Endogenous Retrovirus HERV-K in Tumor Tissues and Cell Lines”

Buscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J

Tagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover
- 10/2001 Beitrag zu Posterpräsentationen:
„Pluripotency of Human Mesenchymal Stem Cells”
und
„Isolation, Cultivation and Multilineage Potential of Porcine Mesenchymal Stem and Precursor Cells”

1st Biennial Meeting of the European Tissue Engineering Society.
Abstracts erschienen in Tissue Engineering Oct 2001, Vol. 7, No. 5: 635-674.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Kristina Büscher, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.