

Regulation der Expression humaner endogener Retroviren in Melanomen

Dissertation zur Erlangung
des akademischen Grades des
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von
Sven Stengel
aus Jena

Berlin, Februar 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kurth
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau des humanen Genoms auf der Grundlage der DNA-Sequenz	1
1.2 Transposon-abgeleitete repetitive Elemente	2
1.3 Humane endogene Retroviren	5
1.3.1 Ursprung, Proliferation und Fixierung	5
1.3.2 Aufbau des retroviralen Genoms	7
1.3.3 Aufbau retroviraler Partikel	8
1.3.4 Biologische Bedeutung der humanen endogenen Retroviren	9
1.3.5 Die Familie HERV-K(HML-2)	13
1.4 Malignome und maligne Melanome	20
1.5 Epigenetische Genregulation	22
1.5.1 Histonmodifikationen	22
1.5.2 Methylierung von DNA	23
1.5.3 Epigenetische Regulation der Retroelemente	25
1.6 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material	29
2.1 Chemikalien	29
2.2 Enzyme	30
2.3 DNA- und Protein-Längenstandards	31
2.4 Antikörper	31

2.5	Software	31
2.6	Herstellerfirmen	32
3	Methoden	33
3.1	Mikrobiologische Methoden	33
3.1.1	Stammhaltung von Bakterien	33
3.1.2	Kultivierung von Bakterien	33
3.1.3	Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen	33
3.1.4	Herstellung kompetenter Bakterien	34
3.1.5	Transformation durch Hitzeschock	34
3.2	Methoden der Zellkultur	35
3.2.1	Kultivieren von Zellen	35
3.2.2	Zelllinien und Nährmedien	35
3.2.3	Passagieren von Zellen	35
3.2.4	Auftauen von Zellen	35
3.2.5	Einfrieren von Zellen	36
3.2.6	Transfektion humaner Zellen	36
3.2.7	Selektion von humanen Zellen mittels Geneticin	36
3.2.8	Behandlung humaner Zelllinien mit 5DC und TSA	37
3.2.9	Anfertigung mikroskopischer Präparate	38
3.3	Molekularbiologische Methoden	38
3.3.1	Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.3.2	Isopropanolfällung	39
3.3.3	Ethanol-fällung	39
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.3.5	Isolierung von Plasmid-DNA	40
3.3.6	Präparation genomischer DNA aus humanen Zellen	40
3.3.7	RNA-Isolation	41
3.3.8	Reverse Transkription	41
3.3.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.3.10	Aufreinigung von PCR-Produkten	43
3.3.11	Restriktion	43
3.3.12	Ligation	44
3.3.13	Gensynthese	44

3.3.14	Klonierung von DNA-Fragmenten	45
3.3.15	DNA-Sequenzierung	45
3.4	Quantitative Real-time PCR	46
3.4.1	Allgemeines	46
3.4.2	Prinzip der relativen Quantifizierung mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Pfaffl [2001]	46
3.4.3	Real-time PCR zur Detektion gespleißter HERV-K mRNA	48
3.4.4	EvaGreen Real-time PCR	49
3.5	Proteinbiochemische Methoden	49
3.5.1	Proteinisolierung mittels RIPA-Lyse	49
3.5.2	BCA-Protein Assay	50
3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
3.5.4	Coomassie-Färbung	51
3.5.5	Western Blot	51
3.6	Methoden zur Untersuchung der Genregulation	52
3.6.1	Dual-Luziferase-Reporterassay	52
3.6.2	Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)	53
3.6.3	<i>In vitro</i> DNA-Methylierung	54
3.6.4	Patch-Methylierung	55
3.6.5	Methylierungssensitive Restriktionsanalyse	55
3.6.6	Bisulfit Sequenzierung	56
4	Ergebnisse	59
4.1	Regulation der HERV-K(HML-2) Expression in humanen Melanomen	59
4.1.1	Ermittlung HERV-K exprimierender Melanomzelllinien	59
4.1.2	Bestimmung der HERV-K Promotoraktivität in humanen Zelllinien	60
4.1.3	Bestimmung der HERV-K Promotoraktivität in einem Panel zufällig ausgewählter Melanomzelllinien	61
4.1.4	Untersuchung der proviralen Promotornutzung	62
4.1.5	Untersuchungen der Methylierungsabhängigkeit des HERV-K(HML-2) 5'LTRs	64
4.1.6	Untersuchungen der Methylierungsabhängigkeit des HERV-K(HML-2) 5'LTRs mittels Patch-Methylierung	65

4.1.7	Bestimmung des Methylierungsgrades ausgewählter HERV-K(HML-2) 5'LTRs im humanen Genom	66
4.1.8	CpG-Methylierungsanalyse eines aktiven HERV-K(HML-2) 5'LTR	69
4.1.9	HERV-K(HML-2) Expression nach Behandlung mit 5DC und TSA	73
4.1.10	Bestimmung der Promotoraktivität von HERV-K(HML-2) nach 5DC-Behandlung	75
4.2	Auswirkung der Rec-Expression auf das Transkriptom humaner Zellen . . .	78
4.2.1	Evaluation der Rec-Expression	78
4.2.2	Optimierung der Transfektionseffizienz	80
4.2.3	Probengewinnung für die Affymetrix-Chip-Analyse	81
4.2.4	Datenanalyse - Bestimmung der Zielgene	81
4.2.5	Kontrolle der differentiellen Expression der Zielgene mittels Real-time PCR-Analyse	88
4.2.6	Analyse der Einflussnahme ausgewählter Rec-Zielgene auf die Expression von HERV-K(HML-2)	90
5	Diskussion	101
5.1	Regulation der humanen endogenen Retroviren K(HML-2) in Melanomen .	101
5.1.1	Etablierung von Melanom-Zelllinien für die Untersuchung der transkriptionellen Regulation von HERV-K(HML-2)	102
5.1.2	HERV-K(HML-2) exprimierende Zelllinien besitzen eine stark erhöhte LTR-Promotoraktivität	103
5.1.3	Hohe LTR-Promotoraktivitäten sind kein allgemeines Charakteristikum von Melanomzellen	104
5.1.4	Die Hauptregulation der HERV-K Transkription erfolgt über einen U3-Enhancerbereich	104
5.1.5	DNA-Methylierung inhibiert direkt die HERV-K Promotoraktivität	106
5.1.6	Erhöhte CpG-Demethylierung korreliert mit erhöhter HERV-K mRNA Expression in Melanomzelllinien	107
5.1.7	HERV-K108 besitzt ein differentielleres Methylierungsmuster im U5-Bereich und im 5'UTR	109
5.1.8	Die Expression von HERV-K(HML-2) kann in Melanomzellen durch das demethylierende Agens 5DC stimuliert werden	111

5.1.9	Die Expression von HERV-K(HML-2) kann in Melanomzellen nicht durch den HDAC-Inhibitor TSA stimuliert werden	112
5.1.10	5DC beeinflusst nicht das Level HERV-K-LTR-aktivierender Transkriptionsfaktoren	113
5.1.11	Zusammenfassung, klinische Bedeutung und Ausblick	113
5.2	Auswirkung der Rec-Expression auf das Transkriptom humaner Zellen	115
5.2.1	Etablierung eines Modellsystems für die Analyse der Auswirkung der Rec-Expression auf das Transkriptom humaner Zellen	116
5.2.2	Analyse der Affymetrix-Chipdaten	120
5.2.3	Biologische Funktion der Rec-vermittelten, differenziell regulierten Gene	122
5.2.4	Analyse der Einflussnahme ausgewählter Rec-Zielgene auf die Expression von HERV-K(HML-2)	130
5.2.5	Np9 zeigte eine invertierte Expression im Vergleich zu Rec	132
6	Zusammenfassung / Summary	133
6.1	Zusammenfassung	133
6.2	Summary	134
A	Literaturverzeichnis	XIII
B	Zelllinien und Zellkulturmedien	XXXV
C	Oligonukleotide	XXXVII
D	PCR-Protokolle	XLV
E	Liste differentiell Expremierter Gene Genchip1	XLIX
F	Publikationsliste	LI

Abkürzungsverzeichnis

5DC	5' Aza 2'Deoxyctidin	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ACTB	β -Aktin	DMSO	Dimethylsulfoxid
Ag	Antigen	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ak	Antikörper	DNase	Desoxyribonuklease
Amp	Ampicillin	dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
anti-	Antikörper gegen	ds	doppelsträngig
APS	Ammoniumpersulfat	DTT	Dithiothreitol
AS	Aminosäure	E. coli	Escherichia coli
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
BCA	bicinchonic acid	ELISA	Enzymgekoppelter Immuntest
bidest.	doppelt destilliert	g	Gravitationskonstante
bp	Basenpaare	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
BSA	Rinderserumalbumin	GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
bzw.	beziehungsweise	GUSB	β -Glucuronidase
°C	Grad Celsius	h	Stunde
ca.	circa	HDAC	Histon-Deacetylasen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
ChIP	Chromatin-Immunoprecipitation	HERV	Humanes endogenes Retrovirus
CpG	Cytosin Guanin Basenfolge	HIV	Humanes Immundefizienzvirus
CT	threshold cycle	Ig	Immunglobulin
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt	IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
Da	Dalton	kb	Kilobasenpaare
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat	kDa	Kilodalton
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat	LB	Luria Bertani
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	LTR	long terminal repeat
DEPC	Diethylpyrocarbonat	M	Molar (mol/Liter)
DLR	Dual Luziferase Reporter Assay	ml	Milliliter
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat	mA	Milliampere

Abkürzungsverzeichnis

min	Minute	SD	Spleißdonor
mol	6,3 x 10 ²³ Teilchen	sec	Sekunden
mRNA	messenger RN	ssDNA	einzelsträngige DNA
SDS	Natriumdodecylsulfat	SV40	Affenvirus 40
NCBI	National Center of Biotechnology Information	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
n.d.	nicht detektiert	Taq	Thermus aquaticus
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
ng	Nanogramm	TE	Tris-EDTA-Puffer
nt	Nukleotid	TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylendiamin
n.v.	nicht vorhanden	TF	Transkriptionsfaktor
OD	Optische Dichte	TKS	Transkriptionsstart
ORF	offener Leserahmen	Tris	Trishydromethylaminomethan
p	pico	tRNA	Transfer-RNA
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	TSA	Trichostatin A
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung	U	Einheit/Unit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	UE	Untereinheiten
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration	ü.N.	über Nacht
Pol	Polymerase	UV	ultraviolett
RLU	relative Luziferaseaktivität	V	Volt
RNA	Ribonukleinsäure	Vol.	Volumen
RNase	Ribonuklease	v/v	Volumen pro Volumen
rpm	Umdrehung pro Minute	W	Watt
RT	Reverse Transkriptase oder Raumtemperatur	w/v	Gewicht pro Volumen
SA	Spleißakzeptor	μ	micro

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau des humanen Genoms	2
1.2	Endogenisierung von Retroviren während der Primatenentwicklung	6
1.3	Aufbau des retroviralen Genom	8
1.4	Morphologie retroviraler Partikel	9
1.5	Genomischer Aufbau von HERV-K(HML-2)	16
4.1	Messung des mRNA-Niveaus der HERV-K(HML-2) Spleißvarianten <i>env</i> , <i>rec</i> und <i>np9</i>	60
4.2	HERV-K(HML-2) LTR-Aktivität in humanen Zelllinien	62
4.3	Promotoranalyse des HERV-K 5'LTR	63
4.4	Methylierungsabhängigkeit des HERV-K 5'LTR	64
4.5	Patch-Methylierung des HERV-K 5'LTR	66
4.6	Evaluation des Methylierungsassays	68
4.7	ChIP gegen die RNAP II	71
4.8	Bisulfit-Sequenzierung des HERV-K108 5'LTR	74
4.9	HERV-K-LTR-Aktivität nach 5DC-Behandlung	77
4.10	Rec-Expression nach transienter Transfektion	79
4.11	Rec-Expression im zeitlichen Verlauf	80
4.12	Rec-Expression im zeitlichen Verlauf $t > 72$ h	81
4.13	Quantität der Änderung der Genexpression nach Rec-Expression	83
4.14	Stärke der Änderung der Genexpression nach Rec-Expression	84
4.15	Überschneidungsmenge der Spots mit gleicher Genexpressionstendenz	84
4.16	Biologische Identität der Messpunkte mit differenziellen Signalstärken	85
4.17	Kontrolle der Expression der Spleißfaktoren	91
4.18	Einfluss der Spleißfaktoren SF-9G8/hnRNP-A1 auf das <i>env</i> -mRNA-Niveau	92
4.19	cLSM-Abbildung der exprimierten Spleißfaktor-mCherry-Fusionsproteine	93

Abbildungsverzeichnis

4.20 Np9-Expressionssystem - schematische Übersicht	94
4.21 Expression von Np9, GFP und Np9-GFP in HeLa-Zellen	96
4.22 cLSM-Abbildung der HERV-K Proteine Rec- und Np9-GFP	97
4.23 cLSM-Abbildung der Koexpression von Rec-GFP, Np9-GFP und SF-9G8- Cherry, hnRNP-A1-Cherry	99

Tabellenverzeichnis

3.1	Gelstärken Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2	Ligationsansatz für einen 5250 bp Vektor und ein 500 bp Fragment	44
4.1	Methylierung von HERV-K(HML-2) 5’LTRs in HERV-K exprimierenden Zelllinien	69
4.2	Methylierung von HERV-K(HML-2) 5’LTRs in HERV-K nicht-exprimierenden Zelllinien	70
4.3	Bestimmung der HERV-K-Expression nach Behandlung mit 5DC, TSA und 5DC/TSA	76
4.4	Differenziell exprimierte Gene Kombination Chip 1 und Chip 2	86
4.5	Bestimmung des Regulationsgrades der Rec-Zielgene mittels real-time PCR	89
B.1	Verwendete Zelllinien, Herkunft und Zellkulturmedien	XXXV
B.2	Zusammensetzung der Zellkulturmedien für die humanen Zelllinien	XXXVI
C.1	PCR-Primer real-time PCR HERV-K mRNA	XXXVII
C.2	PCR-Primer für Klonierungsarbeiten	XXXVIII
C.3	PCR-Primer Bestimmung Methylierungsgrad	XLI
C.4	PCR-Primer real-time PCR Chip-Gene	XLII
D.1	PCR-Ansatz Kolonie-PCR	XLV
D.2	PCR-Ansatz PfuUltra-PCR	XLV
D.3	PCR-Ansatz Analytische-PCR	XLVI
D.4	SYBR-Green real-time PCR-Ansatz	XLVI
D.5	EvaGreen real-time PCR-Ansatz	XLVII
D.6	Bisulfit-Sequenzierungs-PCR	XLVII
E.1	Differenziell exprimierte Gene Chip1	XLIX

1 Einleitung

1.1 Aufbau des humanen Genoms auf der Grundlage der DNA-Sequenz

Die Sequenzierung des humanen Genoms im Jahr 2001 bestätigte die bereits zuvor experimentell ermittelte Gesamtgröße von 3.200 Megabasen. Die nähere Charakterisierung der ermittelten DNA-Sequenz zeigte, dass lediglich 1,5% der humanen DNA für Proteine kodieren. Der weitaus größere Teil des humanen Genoms besteht aus Transposon-abgeleiteten repetitiven Elementen (1.400 Mb; 43,75%) und genverwandten Sequenzen (1.152 Mb; 36%), wie beispielsweise Pseudogenen, Genfragmenten, Introns und untranslatierten Regionen. Weitere 600 Mb (18,75%) entfallen auf sonstige intergenischen Sequenzen, wie zum Beispiel Mikrosatelliten (Abbildung 1.1).

Die Zahl der proteinkodierenden humanen Gene wurde auf 30.000-40.000 eingegrenzt. Dies entspricht lediglich der doppelten Anzahl der Gene des deutlich weniger komplexen Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Dennoch zeigt sich das humane Proteom vielschichtiger als die Proteome der Invertebraten. Verantwortlich hierfür ist in erster Linie die gesteigerte Komplexität des Aufbaus der Gene, beispielsweise durch Mechanismen des alternativen Spleißens. Mindestens 35% aller humanen Gene weisen alternative Spleißvarianten auf, wohingegen im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* lediglich 22% der Gene alternative Spleißprodukte besitzen. Des Weiteren ergibt sich die erhöhte Komplexität des humanen Proteoms aus der Verwendung evolutionär junger, vertebratenspezifischer Proteindomänen und einer gesteigerten Anzahl und Kombination verschiedener Proteindomänenfamilien innerhalb der Proteine.

Die Anordnung der Gene im humanen Genom ist sehr unterschiedlich. Im Vergleich zum Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* sind die humanen Gene über deutlich größere Sequenzabschnitte verteilt. Im Durchschnitt können elf Gene pro Megabase gefunden werden. Ab-

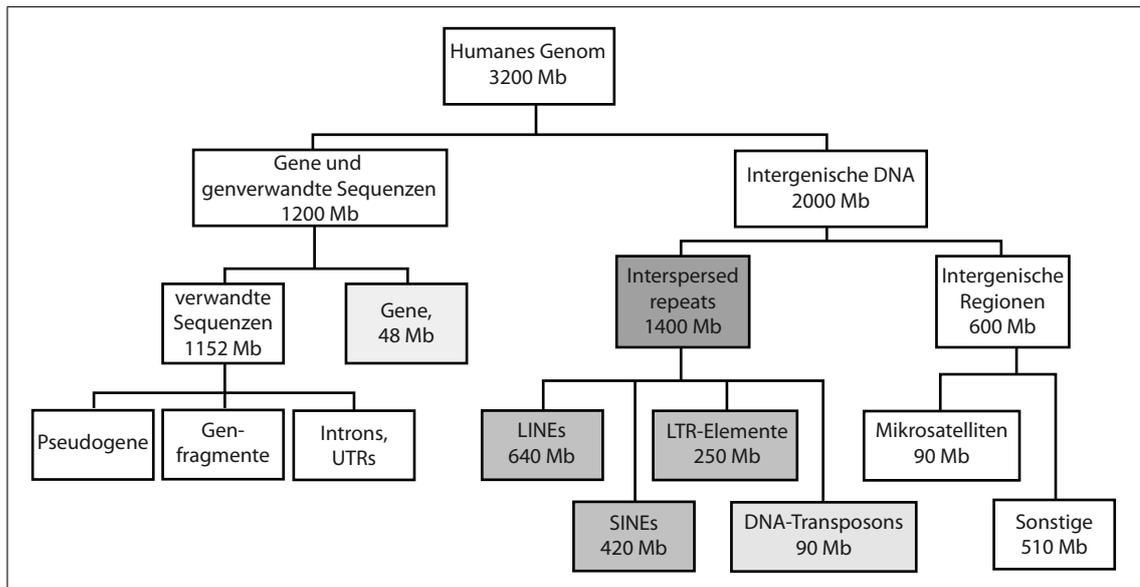


Abbildung 1.1: Klassifizierung der Bestandteile der humanen Genomsequenz und deren Anteil am Gesamtgenom (verändert aus Brown [2006], basierend auf Venter et al. [2001]).

schnitte großer Gendichte korrelieren dabei mit einem hohen GC-Gehalt der Sequenz und Abschnitte geringer Gendichte mit einem niedrigen GC-Gehalt.

Auch die Verteilung der Transposon-abgeleiteten repetitiven Elemente im humanen Genom zeigt eine Abhängigkeit bezüglich des GC-Gehaltes und/oder der Gendichte. Long interspersed elements (LINEs) findet man dabei viermal häufiger in AT-reichen Regionen des Genoms, wohingegen short interspersed elements (SINEs) (MIR, Alu) bis zu 13-mal häufiger in GC-reichen Regionen gefunden werden. LTR-Elemente und DNA-Transposons sind relativ unabhängig vom GC-Gehalt des Genoms lokalisiert. Tendenziell finden sich aber weniger LTR-Elemente in Bereichen mit einem sehr hohen GC-Gehalt [Lander et al., 2001; Venter et al., 2001].

1.2 Transposon-abgeleitete repetitive Elemente

Die Transposon-abgeleiteten repetitiven Elemente stellen mit ca. 1.400 Mb (43,75%) den größten Teil des humanen Genoms dar. Die Unterteilung dieser transponierbaren Elemente kann auf der Grundlage ihrer Mobilitätsstrategie (als DNA- oder RNA-Intermediat) und auf der Basis ihrer genomischen Organisation erfolgen. Im menschlichen Genom unterscheidet

man vier Gruppen transponierbarer, repetitiver Elemente: DNA-Transposons, LINEs, SINEs und LTR-Elemente.

DNA-Transposons DNA-Transposons sind 2-3 kb große DNA-Elemente, die die für die Mobilität des Elements notwendige Transposase selbst kodieren. Umrahmt wird die Transposasesequenz von zwei invertierten Wiederholungselementen, den Inverted Repeats (IR). Beim Prozess des Springens des Elements bindet die Transposase in der Nähe der IR, schneidet das Element aus der DNA heraus und fügt es an einer anderen Stelle im Genom wieder ein. Die Mobilität des Elements erfolgt somit über ein DNA-Intermediat. Im humanen Genom können sieben Klassen von DNA-Transposons unterschieden werden [Smit, 1996]. Neben intakten, autonomen DNA-Transposons findet man auch eine große Anzahl nicht-autonomer Transposons mit einer Größe von 80-3.000 bp. Diese Elemente sind gekennzeichnet durch Deletionen des Transposase-Gens. Aufgrund des Vorhandenseins der beiden IR-Elemente ist ein Springen nicht-autonomer Transposons mit Hilfe der Transposase autonomer Elemente dennoch möglich. DNA-Transposons repräsentieren mit 90 Mb 2,8 Prozent des humanen Genoms [Lander et al., 2001].

LINEs Long interspersed elements sind durch das Vorhandensein zweier offener Leserahmen gekennzeichnet, welche für eine Endonuklease und eine Reverse Transkriptase kodieren. Die Transkription erfolgt über einen internen RNA-Polymerase II Promotor. Nach der Translation binden beide Proteine an die LINE-RNA und werden anschließend in den Zellkern transportiert. Dort erfolgt nach einem DNA-Einzelstrangbruch der genomischen DNA die reverse Transkription der LINE-RNA und die Vollendung des Einbaus in die DNA des Wirtes. Die Vermehrung dieser Elemente geschieht somit über ein RNA-Intermediat und über einen Kopieren/Einfügen-Mechanismus [Furano, 2000]. Die Gruppe der LINEs wird in drei Familien untergliedert: LINE1, LINE2 und LINE3, wovon lediglich die Familie der LINE1-Elemente noch Aktivität besitzt. LINE1 Elementen sind hauptverantwortlich für eine Großzahl der reversen Transkriptionsereignisse im humanen Genom, beispielsweise für die Entstehung von Pseudogenen und die Retrotransposition der nicht-autonomen SINEs [Esnault et al., 2000; Wei et al., 2001]. Mit 640 Mb (20% des Gesamtgenoms) stellen LINEs den größten Teil der transponierbaren Elemente im humanen Genom dar.

SINEs Short interspersed elements sind nicht-autonome transponierbare Elemente. Sie sind zwischen 100 und 400 bp lang und besitzen einen internen RNA-Polymerase III Promotor, welcher auf humane tRNA-Promotorsequenzen zurückgeführt werden kann. Die Mobilität dieser Elemente ist nur mit Hilfe der LINE-Maschinerie möglich. Eine Ausnahme davon stellt eine 7SL-abgeleitete SINE-Familie dar. Diese Familie besitzt im Gegensatz zu allen anderen SINEs einen 7SL-RNA-Polymerase III Promotor und kein von Long interspersed Elementen abgeleitetes 3'Ende. Die bedeutendsten Vertreter dieser Familie sind die Alu-Elemente, welche die einzig aktiven SINEs im humanen Genom darstellen. Drei monophyletische SINE-Familien können im humanen Genom unterschieden werden: Alu-Elemente, MIR und Ther2/MIR3 [Rogozin et al., 2000]. 420 Mb (13%) der humanen Genomsequenz können auf SINEs zurückgeführt werden.

LTR-Transposons Das Hauptcharakteristikum der LTR-Transposons sind zwei 5' und 3' gelegene, gleichgerichtete Wiederholungseinheiten (Long terminal repeats (LTR)). Die LTR-Sequenzen besitzen sowohl Promotoraktivität als auch Signale für die Termination der Transkription. Im menschlichen Genom unterscheidet man autonome von nicht-autonomen Elementen. Autonome LTR-Transposons besitzen offene Leserahmen für die Gruppenspezifischen Antigene (Gag) und die Reverse-Transkriptase (Pol) und sind zwischen 6 und 11 kb groß. Die Mobilität der Elemente erfolgt über RNA-Intermediate mittels eines Kopieren/Einfügen-Mechanismus. Die Umschreibung der RNA in DNA wird mit Hilfe des selbst-kodierten Proteins Reverse-Transkriptase katalysiert, wobei die Reaktion über eine humane tRNA initiiert wird. Dem Großteil der LTR-Transposons im humanen Genom fehlen offene Leserahmen für die Proteine Gag und/oder Pol. Diese Elemente sind nicht mehr selbstständig transponierbar und werden daher als nicht-autonome LTR-Transposons bezeichnet. 85% der humanen LTR-Transposons bestehen aufgrund von homologen Rekombinationsereignissen zwischen den flankierenden LTRs nur noch aus einer langen terminalen Wiederholungseinheit (solo LTRs). Die einzig aktiven LTR-Transposons im humanen Genom sind die vertebratenspezifischen endogenen Retroviren (ERVs). LTR-Transposons repräsentieren 250 Mb (7,8%) des humanen Genoms [Bannert and Kurth, 2006; Lander et al., 2001].

1.3 Humane endogene Retroviren

Die endogenen Retroviren des Menschen werden in 31 monophyletische Familien und drei Klassen unterteilt. Klasse I besteht dabei aus 17 Familien mit ungefähr 2.700 proviralen Elementen und 15.800 solo-LTRs. Phylogenetisch gehören die in dieser Klasse zusammengefassten retroviralen Familien dem Genus der Gammaretroviren an. Die wichtigsten Vertreter dieser Klasse sind die Familien HERV-W und HERV-FRD. Die von ihnen kodierten Env-Proteine (Syncytin-1 und Syncytin-2) besitzen eine plazentaspezifische Expression und zellfusionierende Eigenschaften. Ihnen werden Funktionen während der Plazentaentwicklung zugeschrieben. Die humanen endogenen Retroviren der Klasse II können phylogenetisch dem Genus der Betaretroviren zugeordnet werden. Hierzu zählen elf Familien mit 563 proviralen Elementen und 6.350 solo LTRs. Die Familie der humanen endogenen Retroviren K(HML-2) stellt dabei die jüngste und intakteste Familie im menschlichen Genom dar. Die dritte Klasse der humanen endogenen Retroviren besteht aus den drei Familien HERV16, HERV-L und HERV-S mit 15, 580 und 50 proviralen Elementen und 25, 6.000 und 150 solo-LTRs. Phylogenetisch werden die endogenen Retroviren dieser Klasse dem Genus der Spumaviren zugeordnet.

1.3.1 Ursprung, Proliferation und Fixierung der humanen endogenen Retroviren

Endogenisierung

Der Ursprung der humanen endogenen Retrovirusfamilien ist auf Keimbahninfektionen exogener Retroviren vor und während der Primatenentwicklung zurückzuführen (Übersicht siehe Abbildung 1.2). Retroviren infizieren in der Regel somatische Zellen. Nach dem Eintritt des Virus in die Zelle erfolgt das Umschreiben der viralen RNA in doppelsträngige DNA und der Einbau in das Wirtsgenom. In Folge einer Replikation der genomischen DNA während des Zellzyklus einer infizierten Wirtszelle erfolgt die Duplikation der viralen DNA und die Weitergabe der genetischen Information an die Tochterzellen. Für den Regelfall der Beschränkung der viralen Infektion auf somatische Zellen geht mit dem Tod des Wirts die genetische Information des Virus verloren. Demgegenüber besitzt das Provirus im Fall einer Infektion von Keimbahnzellen das Potential der Weitergabe seiner genetischen Information an die nachfolgende Wirtsgeneration (vertikaler Gentransfer). Nach der Vereinigung der

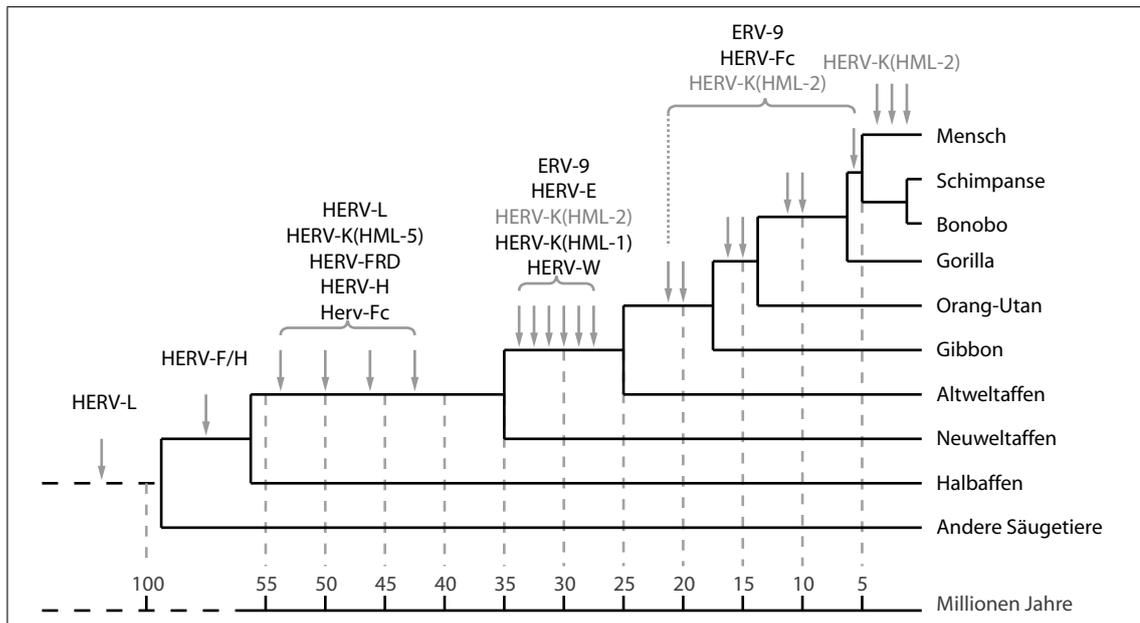


Abbildung 1.2: Endogenisierung von Retroviren während der Primatenentwicklung (verändert aus Bannert and Kurth [2006]).

Gameten (mindestens ein Gamet ist Träger des Provirus), kann das Provirus in allen Zellen der F1-Generation gefunden werden. Die Weitergabe der viralen, genetischen Information an die Nachfolgenerationen erfolgt anschließend nach den Mendelschen Vererbungsge-
setzen.

Proliferation

Endogenisierte Retroviren sind in der Lage, sich über die Bildung infektiöser Partikel innerhalb der Wirtspopulation auszubreiten (horizontale Verbreitung). Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Erhöhung der viralen Kopienzahl innerhalb der Keimbahnzellen über Mechanismen der Reinfektion, Retrotransposition und der transkomplementierten Reinfektion bzw. Retrotransposition. Innerhalb der Wirtspopulation ist eine Erhöhung der alleli-
schen Frequenz des Provirus nur bei einer neutralen bzw. vorteilhaften Auswirkung der viralen Integration auf die Fitness des Wirts wahrscheinlich. Eine Anreicherung der alleli-
schen Frequenz ist zudem durch eine drastische Reduktion der Populationsgröße und einem zufallsbedingten Überleben provirustragender Individuen möglich (Gendrift).

Fixierung

Die proliferative Phase endogenisierter Proviren kann, in Abhängigkeit von äußerer Faktoren und in Abhängigkeit der Einflussnahme des Provirus auf die Fitness des Wirtes, unterschiedlich lange Zeiträume einnehmen. Im Falle des Fehlens eines positiven Selektionsdruckes auf die proviralen Sequenzen im Wirtsgenom kommt es zu zufallsbedingten Anreicherungen von Mutationen und Deletionen und der sukzessiven Inaktivierung der retroviralen Elemente. Zudem besteht die Möglichkeit der Provirusinaktivierung über ein transkriptionelles Abschalten der Viruspromotoren mittels zellulärer Mechanismen, wie beispielsweise der DNA-Methylierung und/oder Histonmodifikationen. Bei Vorliegen einer Inaktivierung aller Proviren einer endogenen retroviralen Familie innerhalb eines Organismus spricht man von einer vollständigen Fixierung. Der Großteil der im humanen Genom vorhandenen endogenen Retroviren besitzt aufgrund von Mutationen, Deletionen und Rekombinationen keine offenen Leserahmen für virale Proteine. Intakte retrovirale Elemente werden zudem im Laufe der Blastozystendifferenzierung *de novo* methyliert und somit transkriptionell stillgelegt [Yoder et al., 1997]. Infektiöse humane endogene Retroviren sind nicht bekannt und die Expression retroviraler Proteine beschränkt sich auf sehr wenige Gewebe und Tumorzellen.

1.3.2 Aufbau des retroviralen Genoms

Das Genom des Virus besteht aus zwei einzelsträngigen, positiv orientierten RNA-Molekülen, welche eine 5'Cap-Struktur und einen 3'Poly(A)-Schwanz aufweisen. Die Größe eines RNA-Moleküls beträgt je nach Retrovirusfamilie zwischen 7 und 11 Kilobasen. In 5'-3' Orientierung können dabei die Sequenzmotive R- und U5-Bereich, die Gene *gag*, *prot*, *pol* und *env* und die Bereiche U3 und R unterschieden werden. Über den Prozess der reversen Transkription erfolgt die Umschreibung der viralen RNA in doppelsträngige DNA und eine damit verbundene Veränderung der 5' und 3' terminalen Bereiche (auf DNA-Ebene - Bildung der 5' und 3' LTR). Die Synthese der langen terminalen Wiederholungen ist sowohl ein essentieller Bestandteil der reversen Transkription als auch des viralen Replikationszyklus, da diese Bereiche nach der Integration in das Wirtsgenom Transkriptionsinitiations- und Transkriptionsterminationsfunktionen übernehmen. Des Weiteren befinden sich stromauf- und stromabwärts zum Integrationsort des Provirus Sequenzwiederholungen, welche auf den Integrationsmechanismus zurückzuführen sind. Stromabwärts zum U5-Bereich des 5'LTR

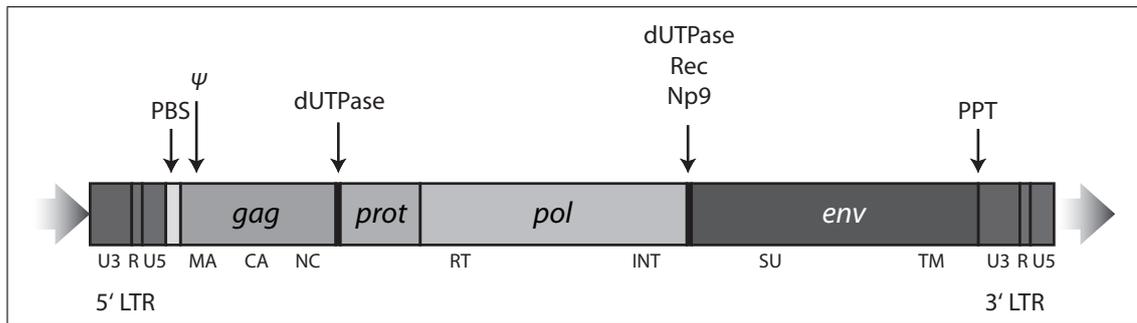


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des proviralen Genoms von Retroviren (verändert aus Bannert and Kurth [2006]). Erklärung siehe Text Kapitel 1.3.2. Abkürzungen siehe Kapitel 1.3.3.

befindet sich die Primer-Bindungsstelle, welche die Hybridisierung der für die reverse Transkription als Primer verwendeten tRNA an die virale RNA ermöglicht. Weiter stromabwärts befinden sich der Leserahmen für das Gen des Gruppenspezifischen Antigens (*gag*) mit dem Verpackungssignal Ψ , das Gen für die Protease (*prot*), das Gen für die Reverse Transkriptase/Integrase (*pol*) und das Gen für die retroviralen Oberflächenproteine SU und TM (*env*). Am 3' Ende des *env*-Gens befindet sich der Polypurintrakt (PPT), welcher ebenfalls eine essentielle Funktion im Prozess der reversen Transkription besitzt. Im Anschluss an den PPT folgt der 3' LTR, bestehend aus U3-, R- und U5-Bereich (Abbildung 1.3).

1.3.3 Aufbau retroviraler Partikel

Die Bildung retroviraler Partikel konnte für humane endogene Retroviren bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur für die Familie HERV-K beobachtet werden [Boller et al., 2008]. Die Morphologie der freigesetzten Partikel entsprach dabei dem typischen Erscheinungsbild exogener Vertreter des Genus der Betaretroviridae (Abbildung 1.4). Der Durchmesser retroviraler Partikel beträgt ca. 100-120 nm. Die Virushülle, eine von der Wirtsmembran abgeleitete Lipiddoppelschicht, ist sowohl der Träger der viralen Hüllproteine „surface subunit“ (SU) und „transmembrane subunit“ (TM), als auch der Träger wirtseigener Oberflächenproteine. Zudem sind an der Innenseite der Virusmembran die Matrixproteine (MA) angelagert. Innerhalb der Lipidmembran befindet sich das virale Kapsid, welches aus Kapsidproteinen (CA) aufgebaut ist und in Abhängigkeit des retroviralen Genus eine konische (Lentiviren) oder sphärisch-ikosaedrische Form (Alpha-, Beta-, Gamma-, Deltaretroviren) aufweisen kann. Im Inneren des Kapsids befindet sich das virale Genom: zwei gleichartige, einzelsträngige RNA-Moleküle, welche als RNA-Nukleokapsidprotein-Komplexe vor-

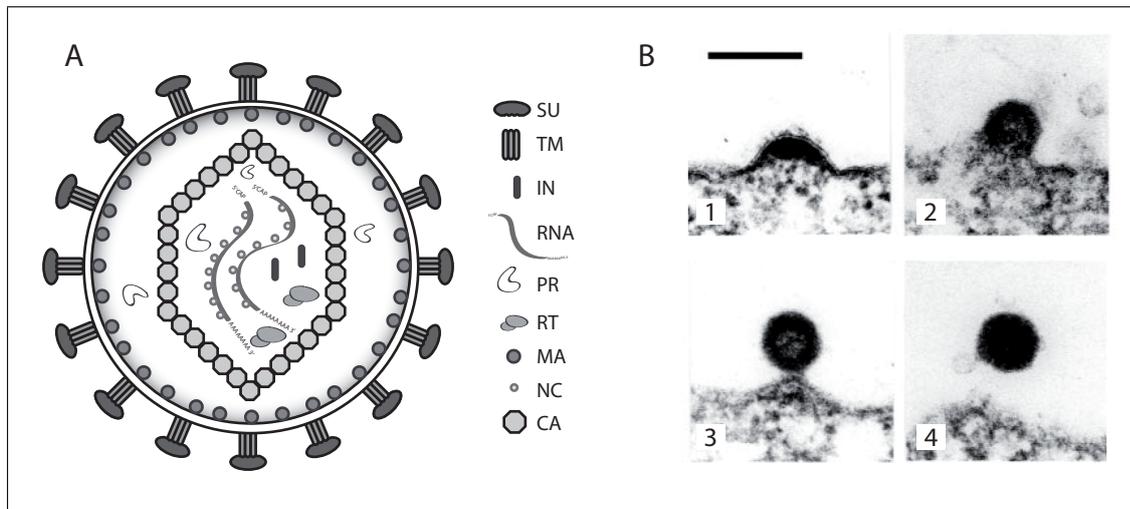


Abbildung 1.4: Morphologie retroviraler Partikel. A) Schematische Darstellung des Aufbaus eines Retrovirus. SU: surface unit, TM: Transmembranprotein, IN: Integrase, PR: Protease, RT: reverse Transkriptase, MA: Matrixproteine, NC: Nukleokapsid, CA: Kapsidproteine B) Knospungs- und Ablösungsprozess von HERV-K113 Viruspartikeln von der Wirtsmembran (Längenmarker entspricht 150 nm, aus Boller et al. [2008])

liegen. Zusätzlich sind im Kapsid die viralen Enzyme Protease (PR), Integrase (IN) und die Reverse Transkriptase (RT) eingelagert.

1.3.4 Biologische Bedeutung der humanen endogenen Retroviren

Retroelemente können aufgrund ihrer noch immer funktionalen genetischen Regulationselemente und der hohen Anzahl sowie der relativ homogenen Verteilung im humanen Genom einen Effekt auf das Wirtstranskriptom ausüben. Ferner besitzen einige der retroviralen Elemente offene Leserahmen für virale Proteine, wodurch auch die direkte Einflussnahme der viralen Genprodukte auf zelluläre Prozesse des Wirtes möglich ist. In den anschließenden Kapiteln werden einige Konsequenzen der retroviralen Integrationen für die Wirtszelle erläutert.

Auswirkungen von LTR-Sequenzen auf Nachbargene

Die Hauptfunktionen der retroviralen LTR-Elemente liegen in der Initiation der Transkription und der Transkriptionstermination. LTR-Elemente besitzen hierbei alle notwendigen

Sequenzmotive für die Assemblierung der basalen Transkriptionsfaktoren und der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II. Innerhalb der LTR-Sequenzen lassen sich Enhancer-Elemente nachweisen, welche eine deutliche Erhöhung der Transkription und eine Gewebsspezifität der Expression erzwingen können [Knössl et al., 1999; Ono et al., 1987]. Neben der Promotorfunktion besitzen LTR-Elemente Polyadenylierungssignale, die den Übergang der Transkriptionselongation in die Transkriptionstermination einleiten [Mager et al., 1999]. Sowohl von solo-LTRs als auch von proviralen 5' und 3' LTRs kann die Transkription von benachbarten Genen eingeleitet werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit des Einbringens neuer Spleißstellen, was zu differenziellen Genprodukten führen kann [Kowalski et al., 1999]. Die gewebsspezifische Änderung der Transkription zellulärer Gene durch LTR-Elemente wurde für das Amylasegencluster beschrieben. So verursachte die Integration von HERV-E Elementen in die Promotorregion des Amylasegens eine Amylaseexpression in der Speicheldrüse, wohingegen die Expression des Gens ohne die retrovirale Insertion nur im Pankreas nachgewiesen werden konnte [Ting et al., 1992]. Für die Gene HHLA2 und HHLA3 ließ sich eine HERV-H vermittelte Transkriptionstermination über das LTR-Polyadenylierungssignal identifizieren [Mager et al., 1999].

Versklavung von Proteinfunktionen

Im menschlichen Genom wurden 16 HERV-Proviren mit funktionellen offenen Leserahmen für das Env-Protein nachgewiesen [Bénil et al., 2001]. Besonderes Interesse gilt den Env-Proteinen von HERV-W (Syncytin-1) und HERV-FRD (Syncytin-2). Syncytin-1 spielt eine essentielle Rolle in der Bildung und Funktion des Syncytiotrophoblasten [Mi et al., 2000]. Die Entstehung des Syncytiotrophoblasten kann dabei auf die zellfusionierenden Eigenschaften von Syncytin-1 zurückgeführt werden. Die Funktion dieses multinuklearen Zellverbandes besteht im maternal-fetalen Stoffaustausch und der immunologischen Abschirmung von Mutter und Fötus. Syncytin-2 besitzt ebenfalls zellfusionierende Eigenschaften und eine plazentaspezifische Expression [Blaise et al., 2003]. Darüber hinaus konnten für Syncytin-2 im Gegensatz zu Syncytin-1 immunsuppressive Eigenschaften festgestellt werden [Mangey et al., 2007]. Des Weiteren ließen sich zwei HERV Envelope-Proteine identifizieren, die eine mögliche Rolle während der Plazentadifferenzierung spielen [Blaise et al., 2005]. Das Ausschalten des Syncytin-A Gens führte in Mäusen zu einem Absterben des Embryos nach 11,5 bis 13,5 Tagen nach dem Beginn der Schwangerschaft. Die Plazenta dieser Mäuse zeigte eine Fehlbildung des Syncytiotrophoblasten [Dupressoir et al., 2009].

Schutz vor retroviralen Infektionen

Das Offenhalten von retroviralen Leserahmen und die Expression viraler Proteine wird mit einer Resistenz gegenüber einer Infektion mit pathogenen, exogenen Retroviren in Verbindung gebracht. Dies ließ sich am Beispiel des endogenen Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus (JSRV) und seines exogenen Gegenspielers veranschaulichen. Über eine Rezeptor-Interferenz des endogenen Env-Proteins wird dabei die Infektion des exogenen Virus unterbunden [Palmarini et al., 2000]. Zudem können auch Gag-Proteine von endogenen Retroviren den Replikationszyklus von exogenen Retroviren unterbinden [Best et al., 1996].

LTR-Elemente als evolutionärer Katalysator

Die Endogenisierung und anschließende Proliferation von Retroviren innerhalb der Keimbahnzellen des Wirtes kann über eine Einflussnahme auf die Transkription benachbarter Gene [Mager et al., 1999] oder über das Einbringen neuer Proteinfunktionen [Denne et al., 2007; Dupressoir et al., 2009] zu Veränderungen des zellulären Geschehens führen und somit einen Einfluss auf die Fitness des Wirtes nehmen. Zudem stellen LTR-Elemente aufgrund ihres repetitiven Charakters „hotspots“ für Rekombinationsereignisse und chromosomale Rearrangements dar und erhöhen damit die Plastizität und genetische Variabilität des Genoms [Hughes and Coffin, 2001].

HERVs und Krankheit

Inflammatorische Krankheiten und Krebs sind die Hauptuntersuchungsschwerpunkte zur Pathogenese humaner endogener Retroviren. Die Ursachen hierfür liegen in den Krankheitsbildern humanpathogener exogene Retroviren. Inflammatorische Erkrankungen aufgrund einer Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) [Itescu and Winchester, 1992; Kaye, 1989] oder dem humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1) [Nishioka et al., 1996] sind hinreichend bekannt. Tumorerkrankungen beim Menschen aufgrund retroviraler Infektionen sind ebenfalls für HTLV-1 und HIV 1 beschrieben. HTLV-1 kodiert dabei für ein eigenes Onkogen (Tax-Protein), welches Zellproliferation induziert [Grassmann et al., 2005]. Die tumorfördernde Wirkung von HIV ist indirekter Natur, da eine über das HI-Virus induzierte Immunsuppression eine effektive Bekämpfung entarteter Zellen durch das Immunsystem verhindert [Bower et al., 2006]. Ferner birgt die Integration der viralen

Erbinformation in das Wirtsgenom die Gefahr der Destruktion oder Deregulation zellulärer Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene durch viruseigene Promotoren, Polyadenylierungssignale und Spleißstellen [Fan, 1994].

Inflammatorische Erkrankungen Autoimmunkrankheiten haben ihre Ursache in selbst-reaktiven T- und B-Zellen, die trotz der Selektion im Thymus in geringen Konzentrationen im Körper vorkommen [Kamradt and Mitchison, 2001]. Aufgrund einer Virusinfektion und der Exposition viraler Proteine mit Epitopähnlichkeiten zu denen der selbst-reaktiven T- und B-Zellen („*molecular mimicry*“) ist eine Aktivierung dieser Immunzellen und damit der Beginn der Autoimmunpathogenese möglich [Fujinami et al., 2006]. Auch für humane endogene Retroviren wurden Proteine identifiziert, die Ähnlichkeiten zu potentiellen Autoantigenen exogener Retroviren besitzen [Colmegna and Garry, 2006; Urnovitz and Murphy, 1996]. Zudem wurden T-Zell- und Antikörperantworten des Immunsystems gegen diese Proteine gefunden. Jedoch konnte bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein HERV-Autoantigen direkt mit einer Krankheit assoziiert werden. Autoimmunkrankheiten können des Weiteren über eine direkte Aktivierung von T-Lymphozyten durch einen nicht-antigenspezifischen Mechanismus ausgelöst werden. Hervorgerufen wird diese T-Zell-Aktivierung über Superantigene (SAGs), die von Bakterien und Viren gebildet werden können und direkt an die beta-Kette des T-Zell-Rezeptors binden [Choi et al., 1991]. Für das Retrovirus Maus-Mammatumovirus (MMTV) ist ein solches SAG bekannt [Choi et al., 1991]. Andere Retroviren, wie beispielsweise HIV oder das humane Herpesvirus Epstein-Barr Virus (EBV), stehen unter Verdacht SAGs zu besitzen [Woodland, 2002]. Für das humane endogene Retrovirus K wurde ein im 5' Bereich des *env*-Gens kodiertes Protein als SAG identifiziert, welches über die systemische Aktivierung von autoaktiven T-Zellen zu einer Zerstörung von beta-Zellen führt [Conrad et al., 1997]. Diese Daten konnten jedoch in weiterführenden Experimenten nicht bestätigt werden [Löwer et al., 1998].

Tumorerkrankungen Die wichtigsten Erkenntnisse zum tumorfördernden Potential humaner endogener Retroviren beziehen sich auf die immunsuppressiven Eigenschaften der Env-Proteine und der Interaktionen akzessorischer Proteine mit zellulären Transkriptionsfaktoren. Beispielsweise besitzt das Env-Protein von HERV-H immunsuppressive Eigenschaften. Die Expression des Proteins in Tumorzellen verhindert eine immunologische Zerstörung der Zellen und erlaubt daher ein Auswachsen des Tumors [Mangenev et al., 2001].

Besonderes Interesse gilt den akzessorischen Proteinen Rec und Np9 der HERV-K(HML-2) Proviren. Beide Proteine werden nur in Tumorzellen exprimiert und stehen unter Verdacht, ein tumorförderndes Potential zu besitzen [Denne et al., 2007; Galli et al., 2005] (detaillierte Beschreibung siehe Kapitel 1.3.5).

1.3.5 Die Familie HERV-K(HML-2)

Erste Insertionen exogener Vertreter der Familie HERV-K(HML-2) in das Genom von Primaten erfolgten nach der Trennung der Altweltaffen von den Neuweltaffen vor ca. 35 Millionen Jahren (HERV-K(OLD)) [Reus et al., 2001]. Während der weiteren Primatenentwicklung gab es immer wieder neue Keimbahn-Infektionen von Vertretern dieser Familie. Die jüngsten Infektionen fanden nach der phylogenetischen Abspaltung des Menschen vom Schimpanse vor weniger als 6 Millionen Jahren statt. Im menschlichen Genom lassen sich 15-18 humanspezifische HERV-K(HML-2) Proviren mit annähernd vollständigen Sequenzen identifizieren [Macfarlane and Simmonds, 2004]. Die bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt jüngste HERV-K(HML-2) Infektion wurde für das polymorphe Provirus K113 gefunden (Alter ca. 100.000-450.000 Jahre). Dieses Provirus kommt mit einer Prävalenz von ca. 30% in der humanen Population vor. Zudem ist dieses Provirus im Besitz aller viralen Leserahmen und zur Partikelbildung befähigt [Boller et al., 2008; Turner et al., 2001]. Im menschlichen Genom werden zwei Typen von HERV-K(HML-2)-Proviren unterschieden. Typ 1 ist gekennzeichnet durch eine 292 bp Deletion im *env*-Bereich und kodiert für das akzessorische Proteine Np9, jedoch nicht für das Env-Vorläuferprotein [Armbruster et al., 2002]. Typ 2 Proviren besitzen im Gegensatz dazu eine intakte *env*-Sequenz und kodieren sowohl für das akzessorische Protein Rec als auch für das Env-Vorläuferprotein [Löwer et al., 1993, 1995] (Abbildung 1.5). Ungefähr 44% der humanen endogenen Retroviren K(HML-2) zählen zu den Typ1 Proviren, jedoch können für die ältesten Elemente dieser Familie (HERV-K(OLD)) keine Typ1 Proviren im humanen Genom gefunden werden. Zudem ist die Gruppe der Typ1 Proviren nicht monophyletisch, was auf ein wiederholtes Auftreten des Deletionsprozesses schließen lässt [Macfarlane and Simmonds, 2004]. Acht bis elf der humanspezifischen HERV-K(HML-2) Proviren sind insertional polymorph. Diese besonders jungen Elemente können in verschiedenen Individuen als leere Integrationsstelle, solo-LTRs, intakte Proviren oder als Duplikation (Tandem-Repeat) vorliegen [Macfarlane and Simmonds, 2004; Mamedov et al., 2004].

Genomaufbau und Genprodukte von HERV-K(HML-2)

Der allgemeine Genomaufbau von HERV-K(HML-2) wird hier am Beispiel der Konsensussequenz HERV-K_{CON} [Lee and Bieniasz, 2007] beschrieben. HERV-K_{CON} entspricht einem Typ2-Provirus, welches durch eine vollständige *env*-Sequenz charakterisiert ist (siehe Seite 13). Die genetischen Elemente der Typ1-Proviren (Spleißdonor 2 und *np9*) werden in Relation zur Sequenz von HERV-K_{CON} angegeben.

HERV-K(HML-2) Proviren besitzen eine Größe von 9.472 bp und zeigen einen typisch retroviralen Aufbau (siehe Kapitel 1.3.2). Die terminalen LTRs haben eine Größe von jeweils 968 bp und untergliedern sich in die Bereiche U3, R und U5. Eine detaillierte Studie zum Aufbau der HERV-K LTRs findet sich in Kraft [2004]. Der Transkriptionsstartpunkt ist demnach an Position +794 bp lokalisiert (Sequenzangaben in Relation zum Startpunkt des Provirus an Position +1). Die Assemblierung der RNA-Polymerase II erfolgt über ein INR-Element (+792 - +798). Die Polyadenylierungsstelle im 5'LTR (hier nicht funktionell) befindet sich an den Basenpaaren +878 - +879. Somit ergibt sich eine Größe von 793 bp für den U3-Bereich, 85 bp für R und 90 bp für den U5-Bereich. Der sich anschließende 5'UTR besitzt eine Länge von 143 bp und beinhaltet den ersten Spleißdonor (SD1 +1.076 bp). Stromabwärts zum 5'UTR befindet sich der Leserahmen für das Gag-Pro-Pol-Vorläuferprotein mit 5639 bp. Dabei entfallen auf Gag 2.001 bp (660 AS), auf Pro 1.005 bp (334 AS) und auf Pol 2.871 bp (956 AS). Die Entstehung des Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteins kann dabei nur über eine Leserahmenverschiebung durch ein *Zurückrutschen* des Ribosoms während der Translation um -1 bp erfolgen. Das Versetzen des Ribosoms erfolgt an festgelegten, adeninreichen Sequenzen (*slippery site*), welche für HERV-K_{CON} an den Positionen +2.912 - +2.916 bp und +3.877 - +3.880 bp gefunden werden können. Das Verrutschen des Ribosoms ist dabei ein seltenes Ereignis. Für den Fall des Erhaltes des Leserahmens an *slippery site 1* kommt es zum Translationsstopp an Basenpaar +3.112, wodurch nur einzelne Gag-Proteine gebildet werden. Für den Fall des Verrutschens an *slippery site 1* und des Nicht-Verrutschens an *slippery site 2* erfolgt ein Translationsstopp an Basenpaar 3.918 und die Bildung eines Gag-Pro-Vorläuferproteins. Nur durch zweimaliges Verrutschen des Ribosoms an *slippery site 1* und *slippery site 2* erfolgt die Bildung des Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteins und damit die Synthese der Reversen Transkriptase.

Im Pol-Leserahmen befindet sich zudem der Spleißakzeptor 1 (Basenpaar +6.434). Dieser ist für die Bildung der *env*-mRNA notwendig. Der Leserahmen von Env beginnt an

Basenpaar +6.451 und endet im 3'LTR an Position +8.550 bp. Damit beträgt die Größe des Env-Vorläuferproteins 699 AS. Im *env*-kodierenden Bereich befindet sich zudem ein weiterer Spleißdonor (SD2 +6.711 bp) und ein weiterer Spleißakzeptor (SA2 +8.411 bp). Der Leserahmen der daraus resultierenden doppelt gespleißten *rec*-mRNA endet vor dem 3'LTR an Position +8.467 bp.

Typ1 Proviren weisen im Bereich von +6.502 bis 6.793 bp eine 292 bp große Deletion auf, wodurch sie nicht im Besitz von SD2 sind und somit keine *rec*-mRNA bilden können. Ferner besitzen sie im Env-Leserahmen an Position +6.496 bp ein Stop-Codon, wodurch diese Proviren kein intaktes Env bilden. Stromaufwärts zu diesem Stop-Codon (+6.494 bp) zeigen Proviren vom Typ1 einen zusätzlichen Spleißdonor SD2_{Np9}, welcher in Typ2-Providiren nicht vorhanden ist und mit dem SA2 zur Bildung der doppelt gespleißten *np9*-mRNA führt. Der Np9-Leserahmen endet stromabwärts vom Env-Leserahmen an Position +8.591 bp.

Das Signal für die Transkriptionstermination und Polyadenylierung der mRNA befindet sich nach Kraft [2004] an Position +9.382 bp.

Die akzessorischen Proteine Rec und Np9

Die akzessorischen Proteine Rec und Np9 werden von doppelt gespleißten mRNA Spezies der HERV-K(HML-2) Typ2- respektive Typ1-Providiren gebildet (siehe Kapitel 1.3.5). Beide mRNA-Varianten bestehen aus drei Exons und unterscheiden sich hauptsächlich in der Länge des zweiten Exons. Der Translationsstart der viralen messenger RNAs liegt ebenfalls im zweiten Exon, wodurch beide Proteine den gleichen N-Terminus (ersten 14 AS) aufweisen. Aufgrund der unterschiedlichen zweiten Spleißdonorstellen kommt es trotz der Benutzung des gleichen Spleißakzeptors zu einer Leserahmen-Verschiebung und der Bildung unterschiedlicher C-Termini.

Rec Das Rec-Protein (regulator of expression encoded by cORF) besitzt 105 AS und eine Größe von 14,7 kDa. Die Hauptfunktion des Proteins liegt im Transport nicht- oder unvollständig gespleißter viraler RNA aus dem Kern ins Zytoplasma. Die Erkennung der Ziel-RNAs erfolgt dabei über eine spezielle virale RNA-Sekundärstruktur - dem Rec-Responsive Element (RcRE) [Boese et al., 2000b; Magin et al., 1999]. Nach der Bindung des Rec-Proteins an das Rec-Responsive Element kommt es zur Interaktion des Rec-eigenen nukleären Exportsignals (NES) mit dem zellulären Exportrezeptor Crm1 und zum aktiven Trans-

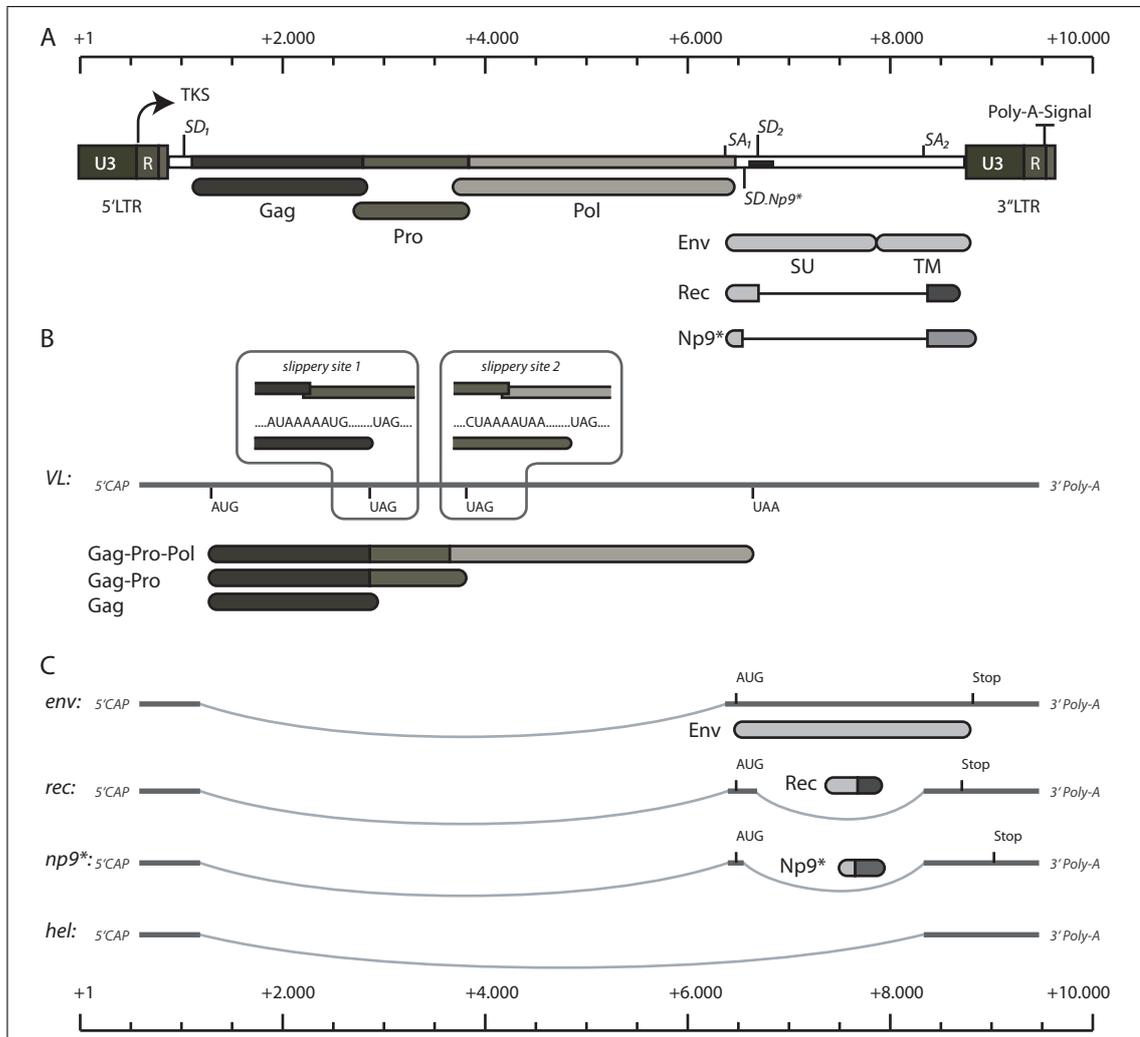


Abbildung 1.5: Genomische Organisation der HERV-K(HML-2) Proviren. A) Aufbau von HERV-K(HML-2) Typ2. Diese Provirusform ist gekennzeichnet durch ein intaktes *env*-Gen, welches für die Oberflächenproteine SU und TM kodiert. Zudem besitzt dieser Typ die doppelt gespleißte mRNA Variante *rec*, welche das akzessorische Protein Rec kodiert. Des Weiteren ist die für HERV-K(HML-2) Typ1 Proviren charakteristische 292 bp Deletion im *Env*-Leserahmen durch einen schwarzen Balken vermerkt und die Np9 spezifische Spleißdonorstelle (SD.Np9) eingezeichnet (die für Typ1-Proviren spezifischen genetischen Elemente sind mit einem Stern gekennzeichnet). B) Schematische Darstellung der ungespleißten Vollängen mRNA und der Proteinsynthese der Gag-Vorläuferproteine durch die Verwendung von *slippery sites*. C) Durch Spleißen hervorgehende HERV-K(HML-2) mRNA-Varianten und die daraus resultierenden Proteine.

port des Crm1-Rec-RNA Komplexes aus dem Kern ins Zytoplasma. Im Zytoplasma erfolgt die Auflösung des RNA-Protein-Komplexes und Rec und Crm1 translozieren zurück in den Kern [Boese et al., 2000b]. Rec ermöglicht somit durch das Ausschleusen der nicht- bzw. unvollständig gespleißten RNA die Bildung der Strukturproteine Gag, Pro, Pol und Env. Dieses Funktionsprinzip wohnt auch den homologen Proteinen Rev von HIV und Rex von HTLV inne.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Rec mit dem zellulären Transkriptionsfaktor promyelozytisches Leukämie Zinkfinger Protein (PLZF) interagiert und zur Zelltransformation beiträgt [Boese et al., 2000a]. Zudem kommt es in *rec*-transgenen Mäusen zu einer gestörten Keimzellentwicklung und zur Ausbildung von *in situ* Karzinomen, einem frühen Marker für testikulären Krebs [Galli et al., 2005]. Die Arbeit von Denne et al. [2007] zeigte des Weiteren, dass Rec den transkriptionshemmenden Einfluss von PLZF aufheben und damit die PLZF-vermittelte Inhibition des *MYC* Promotors herabsetzen kann.

Np9 Das Protein Np9 wurde erstmals von Armbruster et al. [2002] beschrieben. Das aus 74 AS bestehende und 8,7 kDa große Protein besitzt eine putative Caseinkinase-II-Phosphorylierungsstelle und drei nukleare Lokalisierungsdomänen (NLS1, 2 und 3). Die Kerngängigkeit des Proteins wird durch die NLS1 gewährleistet, wohingegen die NLS3 für die punktförmige subnukleare Lokalisation des Proteins zuständig ist. Np9 ist durch eine sehr kurze Halbwertszeit charakterisiert, wobei diese in Abhängigkeit von der zellulären Lokalisation variiert (zytoplasmatisches Np9 ist deutlich stabiler als kernlokalisiertes Np9). Der Abbau des Proteins erfolgt proteasomvermittelt und kann durch den Proteasominhibitor MG132 stabilisiert werden. Np9 ist ferner in der Lage, mit der RING-Typ E3 Ubiquitin-Ligase LNX zu interagieren. Dabei konnte weder für LNX noch für Np9 eine spezifische Interaktionsdomäne identifiziert werden. Beide Proteine besitzen wahrscheinlich mehrere Bindungsdomänen innerhalb der Moleküle. Koexpressionsexperimente mit Np9- und LNX-Fluoreszenzproteinen zeigten eine Np9-abhängige Veränderung der LNX-Lokalisation hin zu den subnuklearen Bereichen von Np9. Zudem wurde nachgewiesen, dass Np9 durch das LNX-Zielprotein Numb stabilisiert wird, aber Np9 keinen Einfluss auf das Proteinlevel von Numb nimmt. Dennoch ist ein Einfluss von Np9 auf den LNX → NUMB → Notch1 Signalweg und damit eine Funktion in embryonalen Entwicklungsvorgängen denkbar [Armbruster et al., 2004].

Des Weiteren ließ sich nachweisen, dass auch Np9 mit PLZF interagieren und die transin-

hibierende Wirkung von PLZF auf den Promotor des Onkogens *MYC* aufheben kann [Denne et al., 2007]. Auch die Expression des Proteins weist auf einen Zusammenhang in Prozessen der Zelltransformation hin. *np9*-mRNA konnte dabei in über 90% aller untersuchten Tumorzelllinien und in Biopsien von Primärtumoren, Seminomen, Mammakarzinomen und Lymphozyten von Leukämiepatienten nachgewiesen werden. Entsprechende Vergleichsproben aus gesunden Geweben (Darm, Magen und Plazenta), Fibroblasten und Lymphozyten zeigten keine *np9*-Expression. Demgegenüber konnten dem Protein Np9 im Zellproliferations- und Koloniebildungsassay keine wachstumsverstärkenden bzw. zelltransformierenden Eigenschaften nachgewiesen werden [Armbruster et al., 2002]. Der mögliche Einfluss von Np9 in Prozessen der Transformation bzw. Tumorprogression bedarf zur Zeit weiteren intensiven Untersuchungen.

HERV-K(HML-2)-Expression und Regulation

Expression von HERV-K(HML-2) Die Expression der HERV-K(HML-2) mRNAs und Proteine ist auf eine nur geringe Anzahl von Geweben und Tumoren respektive Tumorzelllinien beschränkt. So findet man eine starke Expression in Keimzelltumoren [Herbst et al., 1998; Löwer et al., 1984; Phelps, 1997], in Melanomen [Büscher et al., 2006, 2005; Muster et al., 2003], in humanen Brusttumoren [Wang-Johanning et al., 2003], in Nierenkarzinomen, testikulären Tumoren und ovariellen Tumoren [Herbst et al., 1998; Phelps, 1997]. Untersuchungen zur Expression der Voll-längen-mRNA von HERV-K mit Hilfe von dot blot Hybridisierung unter Verwendung von Sonden im *gag*-Bereich zeigten hohe Expressionen in Testis, Ovar, Niere und Leber [Phelps, 1997].

Besonderes Interesse gilt der Expression von HERV-K in humanen Melanomen. So konnte in einer verblindeten Studie an 312 Seren von Melanompatienten gezeigt werden, dass die HERV-K-Expression wie auch die Expression von etablierten Melanom-Markern mit dem Grad der Erkrankung nach den Vorgaben der AJCC korreliert. Weiterhin zeigten Patienten mit Anti-HERV-K-Antikörpern eine verringerte krankheitsspezifische Gesamtüberlebensrate. Die serologische HERV-K Reaktivität konnte somit als ein Marker für eine reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit in Melanompatienten der Erkrankungsstufe (I,II und III) identifiziert werden [Hahn et al., 2008]. Andere Autoren konnten jedoch keine Korrelation zwischen einer HERV-K spezifischen Antikörperantwort und klinischen Parametern der Patienten beobachten [Büscher, 2006].

Transkriptionelle Regulation von HERV-K(HML-2) Über die Regulation der Expression von HERV-K(HML-2)-Proviren in Tumoren gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur wenige Untersuchungen. Arbeiten von Ono et al. [1987] zeigten eine gesteigerte Expression von HERV-K(HML-2) durch Progesteron nach Estradiol-Behandlung. Die Arbeitsgruppe von Akopov et al. [1998] konnte mittels UV-Crosslinking und Mobility Shift Assays zeigen, dass drei noch unbestimmte Proteine spezifisch einen 28 bp großen Bereich 5' der U3-Region des LTR binden. Des Weiteren ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor YY1 eine Enhancer-region in der U3-Region des proviralen LTR bindet und dadurch die HERV-K-Expression erhöhen kann [Knöschl et al., 1999]. Ferner ließ sich der Nachweis führen, dass eine HSV-1 bedingte Hochregulation der HERV-K-Expression nach Infektion stattfinden kann. Ursache für diese Hochregulation ist das HSV-1 immediate early protein (ICP0), welches im frühen Stadium der HSV-1 Infektion zu einer Erhöhung des Proteinlevels des Transkriptionsfaktors AP-1 führt und vermutlich über eine AP-1-Bindestelle im HERV-K LTR zu einer gesteigerten HERV-K-Expression beiträgt [Kwun et al., 2002]. Untersuchungen des U5-Bereichs des HERV-K(HML-2)LTR enthüllten des Weiteren ein regulatorisches Element, welches einen negativen Einfluss auf die Transkriptionsleistung des Promotors ausübt [Domansky et al., 2000].

Neben der Regulation der Transkription von HERV-K mittels Transkriptionsfaktoren (TF) und TF-Bindestellen im LTR des Provirus ist die epigenetische Regulation der HERV-K-Expression mittels DNA-Methylierung bekannt. Die Behandlung der Zelllinie Tera-1 mit dem demethylierenden Agens 5DC führt zu einer erhöhten Gag-Expression [Götzinger et al., 1996]. Hypomethylierung von HERV-K LTRs wurde weiterhin bei transformierten urothelialen Zellen beobachtet, wohingegen diese Elemente in normalen Gewebe signifikant methyliert waren [Flörl et al., 1999]. Untersuchungen zur HERV-K-Methylierung in fetalem Gehirn, der fetalen Leber, der Plazenta und in adulten peripheren Leukozyten zeigten ebenfalls eine starke DNA-Methylierung [Mei Shen et al., 2006]. Die Analyse des Methylierungsgrades des U3-Bereichs verschiedener HERV-K(HML-2) 5'LTRs in Tera-1 Zellen durch Lavie et al. [2005] verdeutlichte eine Korrelation zwischen CpG-Methylierung und transkriptioneller Inaktivität des speziellen Locus. Weiterhin wurde gezeigt, dass nach einer *in vitro* Methylierung von LTR-Reportergenplasmiden, die Transkriptionsleistung der LTR in Tera-1 Zellen herabgesetzt war [Lavie et al., 2005].

1.4 Malignome und maligne Melanome

Krebs ist nach Herzkrankheiten die zweithäufigste Todesursache weltweit [Garcia et al., 2007]. Krebs ist dabei der Sammelbegriff für über 100 verschiedene Krankheiten mit unterschiedlichen Risikofaktoren, Verbreitungen und zellulärer Herkunft. Die Hauptcharakteristika dieser Krankheiten sind eine relativ uneingeschränkte Proliferation von Zellen und die Möglichkeit der Metastatisierung [Stratton et al., 2009]. Die Ursache der Krebsentstehung liegt überwiegend in aufeinanderfolgenden Mutationen von Genen, welche zelluläre Prozesse, wie beispielsweise Apoptose, Zellwachstum, Angiogenese, Zellalterung, Zellwachstumsarrest und Zellkontakte regulieren [Hanahan and Weinberg, 2000]. Die Krebsentwicklung kann dabei als evolutionärer Prozess in Analogie zu den Darwinschen Regeln verstanden werden. Wenige Zellen eines Zellverbandes, welche durch zufällige Mutationen einen Wachstumsvorteil gegenüber unveränderten oder weniger veränderten Zellen erfahren haben, können auswachsen und einen neuen klonalen Zellverband bilden. Durch die Ansammlung weiterer Veränderungen erhalten wiederum einige wenige Zellen dieses klonalen Verbandes einen Wachstumsvorteil gegenüber ihren Nachbarzellen und bilden einen neuen Zellverband mit erhöhter Proliferation. Maligne Erkrankungen sind dabei das Resultat einer Vielzahl verschiedener Genveränderungen über unterschiedlich lange Zeiträume und somit zum überwiegenden Teil Alterserkrankungen [Fearon, 1999].

Maligne Melanome sind das Ergebnis veränderter, proliferationsaktivierter Melanozyten. Melanozyten sind die pigmentbildenden Zellen der Haut. Durch die Produktion von Melanin und die Sezernierung des Farbstoffes an die Keratinozyten der Epidermis besitzen sie eine zentrale Schutzfunktion der Haut vor UV-Strahlung. Melanozyten sind in der Basalmembran der Epidermis lokalisiert und haben ihren embryonalen Ursprung im neuralen Ektoderm [Chudnovsky et al., 2005]. Melanome gehören zu den malignen Erkrankungen mit den geringsten Überlebenswahrscheinlichkeiten, da sie eine hohe Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Therapeutika und ein starkes Metastatisierungsvermögen aufweisen [Riker et al., 2007]. Demgegenüber stehen aber sehr gute Behandlungsmöglichkeiten mit hohen Überlebenswahrscheinlichkeiten bei einer Früherkennung der Krankheit (keine Metastatisierung) [Riker et al., 2007]. Die Klassifizierung des Grades der Erkrankung erfolgt nach den Vorgaben des „*American Joint Committee on Cancer (AJCC)*“:

Stadium I-II Patient ohne regionale und distale Metastasen

Stadium III Patient mit Metastasen in regionalen Lymphknoten oder Lymphgefäßen

Stadium IV Patient mit Metastasen in entfernten Geweben/Organen

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten von Stadium I-II Patienten sind am höchsten und zeigen Abhängigkeiten von der Melanomgröße und der Geschwulstausbildung (Stadium I Überlebenswahrscheinlichkeit: 94% 5 Jahre und 86% 10 Jahre; Stadium II Überlebenswahrscheinlichkeit: 53% 5 Jahre und 41% 10 Jahre). Der Therapieerfolg von Stadium III Patienten ist von der Anzahl der metastasenträgenden Lymphknoten und der Zellzahl der Metastasen abhängig (Überlebenswahrscheinlichkeit: 67-28% 5 Jahre). Die Überlebenswahrscheinlichkeit von Stadium IV Patienten zeigt eine Abhängigkeit von den Lokalisationen der Metastasen und dem Lactat-Dehydrogenaselevels und liegt bei 57-41% für ein Jahr [Zbytek et al., 2008].

Aufgrund der schlechten Prognose von Stadium III und Stadium IV Patienten besteht ein großer Bedarf an neuen Agenzien mit geringen Nebenwirkungen für kombinierte Therapiestrategien und zuverlässige, sensitive Tumormarker für eine frühe Diagnose der Krankheit bzw. eine zeitnahe Detektion eines Rezidives [Riker et al., 2007].

Der genetische Hintergrund der Erkrankung ist in 10% der Fälle familiär bedingt. Diese Patienten weisen häufig genetische Fehler in Tumorsuppressor-Signalwegen, wie beispielsweise $p16^{INK4a} \rightarrow$ Cyclin abhängige Kinasen 4 und 6 (CDK4,6) \rightarrow Retinoblastoma Protein (pRb) oder $p14^{ARF} \rightarrow$ human double minute 2(HMD2) \rightarrow p53 auf. Diese Fehler liegen bei 25-50% der Patienten mit einer genetischen Prädisposition in dem für die Proteine $p16^{INK4a}$ und $p14^{ARF}$ kodierenden Locus CDKN2A auf Chromosome 9p31. Dies hat zur Folge, dass die Zellen aus dem G1-Zyklus heraus in die Synthesephase des Zellzyklus überführt werden und somit stärker proliferieren [Chudnovsky et al., 2005]. In 10-20% der humanen Melanome finden sich aktivierende Mutationen im RAS-Onkogen und in 30-70% der Fälle die aktivierende Mutation V599E des BRAF-Proteins. Zudem kann in 30-50% der Melanompatienten eine inaktivierende Mutation des PI3K-Inhibitors PTEN festgestellt werden. Alle drei Mutationen führen zu einer Aktivierung des Raf \rightarrow MEK \rightarrow ERK und \rightarrow Akt Signalweges, was zu einer erhöhten Zellproliferation und einer verringerten Apoptose beiträgt [Chudnovsky et al., 2005].

Die Expression von HERV-K(HML-2) in Melanompatienten korreliert mit dem Status der Krankheit nach AJCC und ist mit einer schlechten Prognose verknüpft [Hahn et al., 2008]. Des Weiteren zeigte die Arbeit von Serafino et al. [2009] eine Beteiligung von HERV-K am Prozess der Tumorprogression. Hierbei wurde bei Melanomzellen ein HERV-K abhängiger

Übergang von adhären wachsenden Zellen zu nicht-adhären wachsenden Zellen beobachtet, welcher mit einem erhöhten Proliferationspotential einhergeht.

1.5 Epigenetische Genregulation

Die Epigenetik beschäftigt sich mit den Mechanismen der vererbaren Regulation der Genexpression, welche nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz zurückzuführen sind. Dabei stellen die Mechanismen der DNA-Methylierung und der Histonmodifikationen die wichtigsten Aspekte der epigenetischen Transkriptionsregulation beim Menschen dar. Beide Arten der Genregulation spielen entscheidende Rollen in Prozessen wie der X-Chromosom-Inaktivierung, Imprinting, Differenzierung, Embryonalentwicklung, Alterungsprozessen, Stilllegung von repetitiven Elementen und der Entstehung maligner Erkrankungen [Monk, 1995].

1.5.1 Histonmodifikationen

Je zwei Moleküle der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden als Oktamer das Nukleosom. 147 Basenpaare der chromosomalen DNA winden sich in 1,65 Schleifen mit 14 Kontaktpunkten um ein Histonoktamer. Die Bindung der DNA an das Nukleosom gehört zu den stärksten DNA-Protein Wechselwirkungen in eukaryotischen Zellen. Dennoch ist diese Bindung der DNA an die Histone nicht von statischer Natur, sondern über komplexe Regulationsmechanismen sehr dynamisch und veränderbar. Neben der strukturgebenden Funktion der Nukleosomen (Verpackung der DNA) nehmen die Histone über Modifikationen der nichtglobulären N-terminalen Enden einen direkten und indirekten Einfluss auf die Transkriptionsstärke der umwickelten DNA-Sequenzen. Mögliche Modifikationen sind hierbei die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, Sumoylierung, Prolinisomerisierung und die Poly(ADP)-Ribosylierung von Histonen [Kouzarides, 2007]. Eine einfache Unterscheidung der Histonmodifikationen erfolgt hierbei nach euchromatischen Veränderungen, wie beispielsweise der transkriptionsverstärkenden H3 und H4 Acetylierung oder der Trimethylierung von Histon 3 an Lysin 4. Heterochromatische Veränderungen sind zum Beispiel die Methylierung von Histon 3 an Lysin 9 (H3K9me) oder die Methylierung von Lysin 27 an Histon 3. Diese Einteilung ist aber häufig zu einfach gefasst, da neben der Art der Modifikation auch der Ort des modifizierten Histons innerhalb der Gensequenz

von Bedeutung ist. Beispielsweise wirkt eine H3K9me stromaufwärts vom Transkriptionsstart (TKS) transkriptionsinaktivierend, wohingegen eine H3K9me stromabwärts vom TKS transkriptionsaktivierend wirkt [Li et al., 2007].

Die bestuntersuchte Histonmodifikation ist die Acetylierung von Lysinen, welche zu meist im Promotorbereich von Genen zu finden ist und mit Transkriptionsaktivität korreliert [Kouzarides, 2007]. Die transkriptionsaktivierende Wirkung der Acetylierung erfolgt über eine Veränderung der Gesamtladung der Histone (Neutralisierung der positiven Ladung durch negative Acetylreste) und einer dadurch vermittelten Auflockerung der DNA-Proteinwechselwirkung. Dies ermöglicht eine bessere Assemblierung von Transkriptionsfaktoren und/oder der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II. Des Weiteren fungieren acetylierte Histone als Plattform für Transaktivatoren und Chromatin-Remodeling-Komplexe, welche den Prozess der Transkriptionsinitiation fördern [Lee et al., 1993].

Die Acetylierung erfolgt dabei mittels Histon-Acetyl-Transferasen (HAT). Einige Vertreter der HAT besitzen selbst die Fähigkeit, acetylierte Histone zu erkennen und zu binden. Dies impliziert einen möglichen Mechanismus der Aufrechterhaltung der Histonacetylierung nach der Zellteilung [Berger, 2002].

Die Gegenspieler der HAT sind die Histon-Deacetylasen (HDAC), welche die Deacetylierung von Histonen katalysieren. Die Hypoacetylierung von Histonen korreliert dabei mit geschlossenen Promotorstrukturen und geringer Transkriptionsstärke. HDACs können durch chemische Agenzien wie Trichostatin A (TSA) gehemmt werden, was mit fortschreitenden DNA-Replikationsrunden zu einer Hyperacetylierung von Histonen führt [Yoshida et al., 1990]. Der Verlust der Modifikationsfunktionen der HAT und HDAC wird mit der Ausbildung einer Vielzahl von malignen Erkrankungen assoziiert [Esteller, 2007].

1.5.2 Methylierung von DNA

DNA-Methylierung bezeichnet den epigenetischen Vorgang, bei dem eine Methylgruppe an das Cytosin eines CpG-Dinukleotides (auch CpG-Dublette genannt) angefügt wird [Robertson and Jones, 2000]. Im Vertebratengenom liegt die Mehrzahl der CpG-Dubletten im methylierten Zustand vor. CpG-Dinukleotide sind mit einem prozentualen Anteil von ca. 1% im Genom deutlich unterrepräsentiert (1/5 des theoretischen Wertes). Sie finden sich nicht homogen über die gesamte genomische DNA verteilt, sondern liegen in Form von Clustern in den 5' regulatorischen Sequenzen von Genen vor [Smet et al., 1996]. Diese

Cluster werden als CpG-Inseln bezeichnet und weisen typischerweise einen C+G Gehalt von mehr als 50% auf, sind 200-5.000 bp groß und haben ein Verhältnis von gemessenen zu erwarteten CpG-Dinukleotiden von $>0,6$ [Jones, 1999]. Veränderungen der Transkriptionsstärke von Genen mit CpG-Inseln werden häufig assoziiert mit einem Wechsel des Methylierungsstatus dieser CpG-Inseln [Jones, 1999]. Methylierte CpG-Regionen im Genom stellen beispielsweise Zielsequenzen für Methyl-Bindeproteine dar, welche nach der Bindung an die DNA-Sequenz Histon-Deacetylasen assemblieren. In Folge dessen erfolgt eine Deacetylierung von Histonen und eine Stilllegung der chromosomalen Region (siehe Kapitel 1.5.1). DNA-Methylierung innerhalb von Transkriptionsfaktor-Bindestellen kann zudem direkt die Bindung der Transaktivatoren oder Transinhibitoren an die DNA verhindern und somit einen Einfluss auf die Promotorleistung nehmen. Beispiele hierfür sind die Transkriptionsfaktoren AP-2 und YY1 [Attwood et al., 2002; Kim et al., 2003].

Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden erfolgt mit Hilfe der DNA-Methyltransferasen (DNMT), welche die Methylgruppe des Substrates S-Adenosylmethionin (SAM) auf die C5-Position eines Cytosins übertragen [Brero et al., 2006]. Fünf humane DNMTs sind bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt identifiziert: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L. DNMT1 erkennt hemimethylierte DNA und vervollständigt die Methylierung. Die Hauptfunktion dieses Enzyms liegt in der Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus der Zelle nach der DNA-Replikation. Die Enzyme DNMT3A und DNMT3B sind besonders stark während der Embryonalentwicklung exprimiert und ihre Hauptaufgabe liegt in der *de novo* Methylierung von unmethylierter DNA. DNMT3L besitzt nur eine schwache Methyltransferaseaktivität. Das Enzym dient als Kofaktor von DNMT3A. DNMT2 ist katalytisch inaktiv. Seine epigenetische Rolle ist unbekannt [Brenner and Fuks, 2006].

Die Existenz der funktionalen Gegenspieler der DNMTs, die DNA-Demethylasen, ist bei Säugetieren sehr umstritten. Bei Pflanzen ist der Prozess der aktiven DNA-Demethylierung dagegen sehr gut charakterisiert. Hier erfolgt eine Abspaltung des methylierten Cytosins über eine Hydrolyse der glykosidischen Bindung, katalysiert durch die Enzyme DEMETER (DME), DEMETER-LIKE 2 und DEMETER-LIKE 3 (DML-2, DML-3) und REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1). Anschließend erfolgt eine Basenaustauschreparatur (BER), wodurch ein unmethyliertes Cytosin eingefügt wird [Ooi and Bestor, 2008]. Bei Säugetieren wurden immer wieder DNA-Demethylasen postuliert, jedoch konnte bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine ausreichend demethylierende Aktivität dieser Enzyme nachgewiesen werden. Die Demethylierung von Säuger-DNA ist nach gegenwärtiger Meinung eher auf

einen passiven Verlust von CpG-Methylierung im Zuge der DNA-Replikation und einer ausbleibenden Methylierung des Tochterstranges zurückzuführen. Dieser Prozess unterliegt dennoch regulativen Mechanismen. Beispielsweise kann durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an hemimethylierte DNA das Vervollständigen des Methylierungsmusters unterbunden werden [Ooi and Bestor, 2008].

Die DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle bei Prozessen wie Chromatin-Remodeling, X-Chromosom-Inaktivierung, Imprinting und DNA-Reparatur. In Tumoren werden zwei grundlegende Prozesse unterschieden, bei denen Methylierung einen entscheidenden Einfluss auf den Transformationsprozess der Zelle nimmt. Zum einen ist dies die Hypermethylierung von CpG-reichen Regionen in Promotoren von Tumor-Suppressorgenen, die zu deren Inaktivierung führt und als primärer Schritt in der Tumorgenese angesehen wird [Robertson and Jones, 2000]. Zum anderen tritt in Tumoren häufig das Phänomen der genomweiten Hypomethylierung auf (bis zu 60% weniger Methylierung als in normalen Zellen), was als Ursache von chromosomaler Instabilität, Verlust von Imprinting und irregulärer Transkriptionsaktivierung angesehen wird [Esteller, 2003].

1.5.3 Epigenetische Regulation der Retroelemente

Die epigenetischen Regulationsmechanismen der Retroelemente beinhalten DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und die RNAi vermittelte Stilllegung von transponierbaren Elementen [Slotkin and Martienssen, 2007]. Eine besondere Bedeutung kommt der DNA-Methylierung zu. Ungefähr 60% der CpG-Dinukleotide des humanen Genoms liegen in methyliertem Zustand vor. Der überwiegende Teil dieser methylierten CpG-Dubletten kann in Retroelementen gefunden werden. CpG-Inseln in Promotorbereichen von humanen Genen liegen dagegen häufig unmethyliert vor. Die Methylierung der repetitiven Retroelemente hat zwei essentielle Auswirkungen auf das Genom des Wirtes. Zum einen verhindert die CpG-Methylierung die transkriptionelle Aktivität und damit die Möglichkeit der Proliferation intakter Elemente und zum anderen fördert die CpG-Methylierung den Zerstörungsprozess der transponierbaren Sequenzen, da Methylcytosine häufig durch spontane Desaminierung zu Uracil umgewandelt werden [Yoder et al., 1997]. Hypomethylierung von Retrotransposons, beispielsweise durch eine Inaktivierung der DNMT1, führt zu chromosomalen Rearrangements und genomischer Instabilität [Daskalos et al., 2009].

Der Anstieg der Gesamt-DNA-Methylierung des menschlichen Genoms während der Dif-

ferenzierung der Blastozyste zum Embryo, ist zum überwiegenden Teil auf *de novo* Methylierung der transponierbaren Elemente zurückzuführen. Dabei unterscheidet sich aber der Methylierungsgrad dieser Elemente hinsichtlich ihrer geschlechtlichen Herkunft und der Art des Elements. Beispielsweise liegen L1 und IAP-Retrotransposons im Spermium methyliert vor (Aufmethylierung während der Spermatogenese), wohingegen in Eizellen keine Methylierung dieser Elemente zu verzeichnen ist. Alu-Elemente hingegen zeigen eine starke Methylierung in den Eizellen und eine Demethylierung in den Spermien [Yoder et al., 1997]. Nach der Befruchtung erfolgt im Zuge der Blastozystendifferenzierung die *de novo* Methylierung aller transponierbaren Elemente.

Neben der DNA-Methylierung, zeigen Retroposons auch heterochromatische Modifikationen der Histonmoleküle [Slotkin and Martienssen, 2007]. Ein sehr interessanter Mechanismus der Transposonstilllegung ist zudem aus Pflanzen bekannt. Hier führt die Transkription von DNA-Transposons durch ein Überlesen der terminalen invertierten Wiederholungseinheiten zur Bildung komplementärer, doppelsträngiger RNA-Moleküle, welche über eine Dicer-vermittelte Spaltung in siRNA-Moleküle umgewandelt werden. Diese siRNAs besitzen die Fähigkeit, über einen RITS-vermittelten Mechanismus an die gerade transkribierte Transposon-RNA zu binden und die Histone in unmittelbarer Umgebung durch die Assemblierung von HDAC in einen inaktiven Zustand zu versetzen [Slotkin and Martienssen, 2007]. Der Mechanismus der RNAi-vermittelten epigenetischen Stilllegung von aktiv transkribierten Transposons ist bei Säugetieren wenig erforscht.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die endogenen Retroviren der Familie K(HML-2) zählen zu den jüngsten und intaktesten Proviren im humanen Genom und besitzen zum Teil noch offene Leserahmen für virale Proteine. Die Expression dieser Elemente konnte in verschiedenen humanen Tumorarten gefunden werden. Ein tumorförderndes Potential wurde für die Proteine Rec und Np9 beschrieben [Boese et al., 2000a; Denne et al., 2007; Galli et al., 2005].

Von besonderem Interesse ist die Expression der humanen endogenen Retroviren in Melanomzellen. Die klinische Bedeutung als potentieller neuer Tumormarker für humane Melanome qualifiziert HERV-K zu einem wichtigen Untersuchungsobjekt.

Für die Analyse der tumorspezifischen Expression der humanen endogenen Retroviren

K(HML-2) in Melanomen sollte daher die molekulare Ursache der transkriptionellen Regulation dieser Elemente ermittelt werden. Hierfür galt es, neue Melanom-Modellzelllinien zu etablieren und diese hinsichtlich ihrer HERV-K mRNA-Expression mittels real-time PCR zu untersuchen. Darauf aufbauend sollte die genetische und epigenetische HERV-K-Regulation in Vergleichsuntersuchungen zwischen HERV-K exprimierenden und HERV-K nicht-exprimierenden Zelllinien charakterisiert werden. Für die Untersuchung der Promotoraktivität von HERV-K galt es einen LTR-Reportergen-Assay zu etablieren, den CpG-Methylierungsgrad von HERV-K 5'LTRs zu ermitteln und die methylierungsabhängige Regulation dieser retroviralen Elemente mittels molekulargenetischer Methoden zu charakterisieren. Aus den ermittelten Daten sollte ferner ein allgemeines Modell der HERV-K-Aktivierung in Melanomen abgeleitet werden.

Da bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur wenige Informationen über die Auswirkung der HERV-K Expression auf das Transkriptom humaner Zellen bekannt sind, sollte in dieser Arbeit des Weiteren der Einfluss des akzessorischen Proteins Rec auf den zellulären Transkriptionsapparat untersucht werden. Hierfür galt es ein geeignetes Modellsystem für die Expression des Proteins Rec zu etablieren und Gene mit einer differenziellen Regulation nach Rec-Expression mittels einer Affymetrix-Genchip-Analyse zu identifizieren. Potentielle Rec-Zielgene sollten ferner hinsichtlich ihrer biologischen Funktion charakterisiert werden, um damit ein Wirkprinzip des Proteins auf das zelluläre Geschehen abzuleiten.

2 Material

Die verwendeten kommerziellen Kits, Puffer und Lösungen sind im Methodenteil im Zusammenhang mit den entsprechenden Protokollen aufgeführt. Die Zelllinien und Zellkulturmedien können der Tabelle B.1 auf Seite XXXV entnommen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel C (Seite XXXVII) aufgeführt.

2.1 Chemikalien

5-Aza-2'-Deoxycytidin	Sigma
Agarose	Sigma
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Antifade	Molecular Probes
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Sigma
DAPI (0,1mg/ml)	Roche
Dihydroethidium	Sigma
DEPC	Promega
DMSO	Roth
dNTPs	Fermentas
EDTA 2Na2H ₂ O	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (≥99,8%(v/v))	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Formamid	Merck
Geneticin	Invitrogen
Glycerin (≥99,5%(v/v))	Roth
Glycin	Merck
Hydroxylamin Hydrochlorid	Sigma
Kanamycin	Invitrogen
Methanol	Roth

2 *Material*

MgCl ₂	Fermentas
Natriumacetat	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Sigma
Natriumhydroxyd	Roth
Reinstwasser	RKI
Salzsäure	Roth
SDS	Roth
Trichostatin A	Sigma
Tris	Roth
Triton-X-100	Fluka
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween®20	Roth

2.2 **Enzyme**

AMPLITAQ GOLD DNA Polymerase	Applied Biosystems
PFU Turbo DNA Polymerase	Stratagene
Reverse Transkriptase	Fermentas
DNase	Qiagen
RNase	Ambion
T4 DNA Ligase	Roche
<i>Apa</i> I	NEB
<i>Age</i> I	NEB
<i>Bsa</i> AI	NEB
<i>Eco</i> RI	NEB
<i>Hpa</i> II	NEB
<i>Msp</i> I	NEB
<i>Nhe</i> I	NEB
<i>Sac</i> I	NEB
<i>Sss</i> I	NEB
<i>Tau</i> I	Fermentas
<i>Xcm</i> I	NEB
<i>Xho</i> I	NEB
Proteinase K	Invitrogen
Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas
Trypsin	Sigma

2.3 DNA- und Protein-Längenstandards

O'GENERULER™ DNA LADDER MIX	MBI Fermentas
PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER	Fermentas

2.4 Antikörper

anti-β-Aktin, monoklonal, Klon AC-74 (1:5000)	Sigma-Aldrich
Anti-V5 Antibody (1:5000)	Invitrogen
Penta-His Antibody (1:1000)	Qiagen
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse HRP (1:5000)	Dako
GFP(B-2) HRP (1:200)	Santa Cruz Biotechnology

2.5 Software

Excel 97	Microsoft
Word 97	Microsoft
JabRef 2.4.2	Jgoodies
L ^A T _E X	Open Source Projekt
WinEdt 5.5	WinEdt Inc.
Adobe Reader	Adobe
Adobe Photoshop CS2	Adobe
Adobe Illustrator CS2	Adobe
DNAS _T ar Lasergene	DNA Star
CS1.6 HL1 Mod	Valve
SigmaPlot 9.0	STATCON
BioGPS	Genomics Institute of the Novartis Research Foundation
Ensembl.org	Wellcome trust Sanger Institute / European Bioinformatics Institute
ExPASy	Swiss Institute of Bioinformatics
GenCards.org	Crown Human Genome Center & Weizmann Institute of Science
ncbi.nlm.nih.gov	National Center for Biotechnology Information
Nucleic Acid Sequence Massager	Tonjum-Group
Matinspector	Genomatix
Primer3	Whitehead Inst. for Biomedical Res.

2.6 Herstellerfirmen

Affymetrix	Santa Clara, CA, USA
Agilent	Böblingen, Deutschland
Applied Biosystems	Forster City, CA, USA
Atlas Biolabs GmbH	Berlin, Deutschland
Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Biorad	München, Deutschland
Biozym	Hess. Oldendorf, Deutschland
Dako	Cytomation Glostrup, Dänemark
DNA Star	Madison, WI, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fermentas	St.Leon-Roth, Deutschland
Fujifilm	Düsseldorf, Deutschland
GE Healthcare	München, Deutschland
Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Hoefer	San Francisco, CA, USA
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Millipore	Schwalbach, Deutschland
Novagen	Darmstadt, Deutschland
New Brunswick Scientific	Nürtingen, Deutschland
New England Biolabs	Frankfurt, Deutschland
Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Pierce	Bonn, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Roche	Mannheim, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Stratagene	Amsterdam, Niederlande
USB	Corporation Cleveland, OH, USA
Tecan	Crailsheim, Deutschland
TPP	Trasadingen, Schweiz
Wheaton	Millville, NJ, USA
Zeiss	Göttingen, Deutschland

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Stammhaltung von Bakterien

Für eine langfristige Lagerung von *Escherichia coli* (*E.coli*)-Stämmen wurden Glycerinkulturen im Verhältnis ein Teil Glycerin zu einem Teil Bakteriensuspension (Übernachtskultur) angelegt und bei -80°C gelagert.

3.1.2 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *E.coli*-Stämmen erfolgte unter ausreichender Belüftung bei 37°C . Dabei wurden *E.coli*-Flüssigkulturen in LB-Vollmedium (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl) unter Schütteln bei 220 rpm (Innova 4330, New Brunswick Scientific) und *E.coli*-Festkulturen auf LB-Vollmediumplatten (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 1,5% (w/v) Agar Agar) ohne Schütteln inkubiert. Für die Anzucht von Bakterienstämmen mit einer Antibiotikaresistenz, wurde dem Nährmedium das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt (Ampizillin (Serva) Endkonzentration $100\ \mu\text{l}/\mu\text{l}$, Kanamycin (Serva) Endkonzentration $50\ \mu\text{l}/\mu\text{l}$).

3.1.3 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen

Die Zelldichte der Bakterienkulturen wurde durch Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer (Biophotometer, Eppendorf) bestimmt. Kulturen mit einer Zelldichte von OD_{600} größer eins wurden hierbei mit Flüssigmedium verdünnt.

3.1.4 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung von kompetenten Bakterien erfolgte nach dem Rubidiumchloridprotokoll (Qiagen, Hilden, Deutschland). Als bakterieller Ausgangsstamm wurde *E.coli* oneShot® TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

100 ml LB-Medium wurden mit 10 µl einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C mit 220 rpm schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Nach fünfminütigem Kühlen auf Eis wurden die Bakterien mittels Zentrifugation (10 min, 4000 g, 4°C) pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 30 ml TFB I-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Dieser Ansatz wurde 90 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut pelletiert (10 min, 4000 g, 4°C). Danach wurde das Pellet in 4 ml eiskaltem TFB II-Puffer (10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 6,8) resuspendiert und zu je 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.5 Transformation durch Hitzeschock

Für die Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien fanden chemokompetente *E.coli* Top10 F' Verwendung (Herstellung siehe Kapitel 3.1.4). Einhundert Mikroliter der kompetenten Bakterien wurden für 5 min auf Eis aufgetaut und anschließend mit 10 µl Ligationsansatz bzw. 1 ng Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wurde anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1,5 min und eine Inkubation des Transformationsansatzes für 3 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 2.000 g für 2 min zentrifugiert, das Pellet in 100 µl Medium aufgenommen und auf einer LB-Agar-Platte mit Selektionsmedium ausgestrichen. Die Inkubation der LB-Agar-Platte erfolgte bei 37°C für 16 h.

3.2 Methoden der Zellkultur

3.2.1 Kultivieren von Zellen

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien erfolgte bei 5% CO₂, 96% relativer Luftfeuchte und einer Temperatur von 37°C im Brutschrank (BBD 6220, Heraeus). Sämtliche Zellkultur-Arbeiten wurden unter sterilen Bedingung innerhalb der Sterilbank HERASAFE (Heraeus) durchgeführt.

3.2.2 Zelllinien und Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien, deren biologischer Ursprung und die für die Kultivierung der Zellen verwendeten Zellkulturmedien können der Tabelle B.1 auf der Seite XXXV entnommen werden. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Zellkulturmedien ist in Tabelle B.2 auf Seite XXXVI aufgeführt.

3.2.3 Passagieren von Zellen

Die bis zu 70% bewachsenen Kulturschalen wurden vom Medium befreit und anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von einem Milliliter Trypsin/EDTA-Lösung und einer fünf- bis zehnmütigen Inkubation bei 37°C konnten die von der Oberfläche abgelösten Zellen in 7 ml frischem Medium aufgenommen werden. Je nach Bedarf wurden Teilmengen der Zellsuspension auf eine neue Kulturschale gegeben und mit dem entsprechenden Volumen an Medium versorgt.

3.2.4 Auftauen von Zellen

Die in Kryokonservierungsröhrchen abgefüllten humanen Zellen wurden aus dem flüssigem Stickstoff entnommen und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Danach erfolgte ein Anwärmen der Zellen im Wasserbad bei 37°C für weitere 5 Minuten. 1 ml der Zellsuspension wurde anschließend in 5 ml Nährmedium aufgenommen und in 15 ml Zentrifugenröhrchen abgefüllt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 220 g konnte der Überstand vollständig entfernt und

das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen werden. Nach sanftem Lösen des Zellpellets wurden die entstandene Zellsuspension in $\frac{1}{3}$ und $\frac{2}{3}$ Portionen auf zwei Kulturschalen gegeben und mit dem entsprechenden Volumen Medium versorgt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.5 Einfrieren von Zellen

Für eine Langzeitlagerung der Zelllinien wurden Aliquots zu einem Milliliter in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierfür wurden Zellen, welche bis zu einer Konfluenz von ca. 70% in 10 cm Kulturschalen herangewachsen waren, mit Trypsin/EDTA abgelöst (siehe 3.2.3), mit PBS gewaschen und in 15 ml Zentrifugenröhrchen bei 220 g pelletiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 4 ml Einfriermedium aufgenommen und Aliquots zu je einem Milliliter in Kryokonservierungsröhrchen abgefüllt. Diese wurden anschließend für zwei Tage in -80°C kaltem Isopropanol inkubiert und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.6 Transfektion humaner Zellen

Für das Einbringen von DNA-Molekülen in humane Zellen kam das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 der Firma Invitrogen zur Anwendung. Die Vorgehensweise entsprach den Vorgaben des Herstellers. Als Transfektionsmedium diente serumfreies Zellkulturmedium. Zwölf Stunden nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Effizienz der Transfektion konnte fluoreszenzmikroskopisch durch Transfektion des GFP kodierenden Vektors pmax-GFP der Firma Amaxa bestimmt werden.

3.2.7 Selektion von humanen Zellen mittels Geneticin

Die Verbesserung des Verhältnisses von positiv transfizierten Zellen gegenüber nicht-transfizierten Zellen erfolgte mittels Selektion auf eine in die Zellen eingebrachte Antibiotikaresistenz. Hierfür wurde in einem ersten Schritt die Konzentration an Antibiotikum ermittelt, welche für ein Absterben der untersuchten Zellen mindestens vorhanden sein musste. Dafür wurden Zellen in Kulturschalen mit einer Konfluenz von 30% ausgesät und mit ansteigenden Konzentrationen des Antibiotikum behandelt. Die optimale Selektionskonzentration des

Antibiotikums zeigte sich bei einer nahezu 100%igen Abtötung der resistenzfreien Zellen, verbunden mit einer möglichst geringen Konzentration des Antibiotikums. Für die Zelllinie HEK-293 erfolgte eine Selektion auf Geneticin-Resistenz mit einer Konzentration von 500 µg/ml Geneticin (Invitrogen) für drei bis fünf Tage. Die Zellen wurden hierbei alle 24 h mit frischem, Geneticin-haltigem Zellkulturmedium versetzt.

3.2.8 Behandlung humaner Zelllinien mit 5-Aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin-A

5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung

Das demethylierende Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin (5DC) (Sigma) wurde in ddH₂O gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Behandlung der Zelllinien erfolgte mit einer Konzentration von 2 µM 5DC für 72 h (GH-Zellen 1 µM 5DC). Die Zellen wurden dabei alle 24 h mit frischem Medium versorgt. Für Vergleichsuntersuchungen wurden Zellen der gleichen Zelllinie unter identischen Bedingungen mit Zellkulturmedium ohne 5DC-Zusatz kultiviert und Proben zum gleichen Zeitpunkt entnommen.

Trichostatin-A-Behandlung

Der Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin-A (TSA) (Sigma) wurde in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Behandlung der Zelllinien erfolgte mit einer Konzentration von 50 nM TSA für 72 h (GH-Zellen 25 nM). Die Zellen wurden dabei alle 24 h mit frischem Medium versorgt. Für Vergleichsuntersuchungen wurden Zellen der gleichen Zelllinie unter identischen Bedingungen mit Zellkulturmedium ohne TSA-Zusatz, aber mit gleicher Molarität an DMSO kultiviert und Proben zum gleichen Zeitpunkt entnommen.

5DC- und TSA-Behandlung

Die gleichzeitige Behandlung von Zellen mit 5DC und TSA erfolgte unter den oben aufgeführten Bedingungen mit 5DC und TSA in Kombination.

3.2.9 Anfertigung mikroskopischer Präparate

Herstellung der Mowiol-Fixierlösung

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellpräparate wurden mit Hilfe einer Mowiol-DAPI-DABCO-Lösung fixiert und haltbar gemacht. Hierfür wurden 2,4 g Mowiol 4-88 (Carl Roth) in 6 g Glycerol unter Rühren für 1 h miteinander gemischt. Im Anschluss daran konnte dem Stoffgemisch 6 ml ddH₂O hinzugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert werden. Danach wurden 12 ml 0,2 M Tris (pH 8,5) hinzugegeben und die Lösung wurde bei 50°C für 2 h inkubiert (alle 20 min kurzes Mischen). Nachdem das Mowiol gelöst war, wurde die Fixierlösung bei 5000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit 2,5% (w/v) 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan (DABCO) (Carl Roth) und 100 ng/ml 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Sigma) versetzt. Die fertige Fixierlösung konnte im Anschluss aliquotiert und bei -20°C gelagert werden.

Herstellung der mikroskopischen Präparate

Für die Anfertigung mikroskopischer Präparate dienten die Zelllinien GH, HeLa und HeLa-TZM-bl. Hierfür wurden die Zellen auf sterile Deckgläschen ausgesät und 12 h inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Transfektion der Zellen mit den Fluoreszenzprotein-kodierenden Plasmiden (Kapitel 3.2.6) und eine Inkubationsphase von 12-48 h. Für die Fixierung der Zellen wurden die Deckgläschen für 10 Sekunden in ddH₂O gewaschen und anschließend in 15 µl Fixierlösung auf Objektträgern eingebettet. Nach einer Trocknungszeit von 24 Stunden bei RT konnten die Präparate bis zur mikroskopischen Betrachtung bei 4°C gelagert werden.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte mittels UV-Vis-Spektrophotometrie. Hierfür wurde 1 µl der zu untersuchenden Probe mit Hilfe eines NanoDrop Spektrophotometers (Peqlab) nach Herstellerangaben vermessen.

3.3.2 Isopropanolfällung

Für die Fällung von DNA aus großen Volumina wurde die DNA-Lösung mit 0,7 Volumen Isopropanol und 0,3 M Kaliumacetat (1/10 einer 3 M Kaliumacetatlösung) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 8.000 g und 4°C konnte der Überstand entfernt und das entstandene Pellet durch waschen mit 70% Ethanol von Isopropanolrückständen gereinigt werden. Nach der Trocknung des DNA-Pellets für ca. 10 min wurde dieses anschließend je nach Verwendungszweck in TE-Puffer oder ddH₂O gelöst.

3.3.3 Ethanolfällung

Für die Aufreinigung oder Konzentration wenig voluminöser DNA-Lösungen wurde die Fällung mit Ethanol angewandt. Da hierfür eine Mindestkonzentration von 70% Ethanol erforderlich ist, wurde die Probe mit dem 2,5-fachem Volumen an Ethanol versetzt und 1/10 Volumen einer 3 M Kaliumacetatlösung wurden hinzugefügt (0,3 M Kaliumacetat im Ansatz). Nach zehninütiger Inkubation bei RT konnte die Probe bei 8.000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ca. 10 min getrocknet. Danach konnte das trockene Pellet je nach Verwendung in TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen werden.

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Längenauftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten. Je nach zu erwartender Bandengröße wurden Gele zwischen 0,5 und 2% Agarose (w/v) in TAE-Puffer (0,04 M Tris base, 1 mM EDTA, 0,02 M Eisessig, pH 8,0) hergestellt (siehe Tabelle 3.1). Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und im Anschluss der noch flüssigen Agaroselösung 400 ng/ml Ethidiumbromid zur Detektion der Nukleinsäuren im UV-Licht beigefügt. Die Verfestigung des Agarose-TAE-Puffergemisches erfolgte in einer Gelkammer mit entsprechendem Kamm. Die zu analysierenden Proben wurden anschließend mit 1/10 10-fach DNA-Ladepuffer (50% (v/v) Glycerin, 0,15% (w/v) Orange G, 1-fach TAE) versetzt und in die entsprechenden Gelta-schen pipettiert. Zur Abschätzung der Fragmentgröße diente der DNA-Marker O'GeneRuler der Firma Fermentas. Die Elektrophorese erfolgte in einer Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer als Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 80-100 V für 30 bis 90 min. Im

Anschluss erfolgte die Detektion der elektrophoretisch aufgetrennten DNA auf einem UV-Schirm (GelDoc 2000, BioRad) und die digitale Dokumentation (Quantity One Software, BioRad).

Tabelle 3.1: Agarose-Gelelektrophorese - Gelstärke in Abhängigkeit der Fragmentgröße. Angegeben sind weiterhin die Fragmentlängen, die mit dem Farbstoff Goldorange komigrieren.

Fragmentgröße	Agarosekonzentration (w/v)	Goldorange
1 bis 30 kb	0,5%	1000 bp
0,8 bis 12 kb	0,7%	700 bp
0,5 bis 7 kb	1%	300 bp
0,4 bis 6 kb	1,2%	200 bp
0,2 bis 3 kb	1,5%	120 bp
0,1 bis 2 kb	2%	<100 bp

3.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Gewinnung von hochreiner Plasmid-DNA aus bakteriellen Kulturen fand das kommerzielle Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen Anwendung (Ausbeute 5-10 µg). Für die Isolation hochreiner Plasmid-DNA aus Bakterien im größeren Maßstab (150-300 µg) wurde das Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Nach erfolgreicher Isolation konnte die Konzentration und Reinheit der gewonnenen DNA mit Hilfe eines Spektrophotometers (siehe Kapitel 3.3.7) ermittelt werden.

3.3.6 Präparation genomischer DNA aus humanen Zellen

Die Gewinnung von genomischer DNA aus humanen Zellkulturproben erfolgte mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue-Kits der Firma QIAGEN. Die Vorgehensweise entsprach den Angaben des Herstellers. $2,5 \cdot 10^7$ Zellen dienten dabei als Ausgangsmaterial für eine Präparation.

Die Reinheit und Ausbeute der isolierten genomischen DNA wurde anschließend via UV-Vis-Spektrophotometrie im Nanodrop ermittelt (siehe Kapitel 3.3.7 auf Seite 41) und die Integrität der Proben durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.1) überprüft.

3.3.7 RNA-Isolation

Die Präparation von Gesamt-RNA aus humanen Zellen erfolgte mit Hilfe des kommerziellen RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen. Für die Sicherstellung einer DNA freien RNA-Präparation erfolgte zusätzlich während der Durchführung des Verfahrens ein DNase Verdau mit Hilfe des Qiagen RNase-Free DNase Set (50). Die Anwendung beider Kits erfolgte nach Herstellerangaben.

Überprüfung der Integrität der Gesamt-RNA

Um die Integrität der isolierten Gesamt-RNA zu überprüfen wurden 500ng der RNA-Probe elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht (siehe Kapitel 3.1).

Bestimmung der Gesamt-RNA Konzentration

Die Messung der Konzentration an Gesamt-RNA wurde via UV/Vis-Spektrophotometrie bei $\lambda = 230 \text{ nm}$ durchgeführt. Die Reinheit der Probe ergab sich aus dem Koeffizienten $OD_{\frac{260}{280}}$ (siehe Kapitel 3.3.7).

3.3.8 Reverse Transkription

Die Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des Kits RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas). Hierbei wurden 0,5-2 μg Gesamt-RNA als Matrize für die Erststrang cDNA-Synthese eingesetzt. Als Primer für diese Reaktion wurden in Abhängigkeit des Experimentes Oligo(dT)₁₈ oder Random Hexamer Oligonukleotide eingesetzt. Die Zusammensetzung und das Reaktionsprotokoll entsprachen den Vorgaben des Herstellers. Die gewonnenen cDNA-Proben wurden anschließend 1:10 mit ddH₂O verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht eine spezifische *in vitro* Amplifikation von kurzen DNA Abschnitten (40-15.000 bp). Ein primärer PCR-Reaktionsansatz besteht dabei aus

einem PCR-Puffer (15 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,0), MgCl₂ (mindestens 1,5 mM), dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 0,2 mM)), spezifischen Sense- und Antisense-Oligonukleotiden (je 0,1 µM), der Template-DNA und einer thermostabilen DNA-Polymerase. Durch gezielte Veränderungen der jeweiligen Komponenten lässt sich dabei die Spezifität und Effizienz der Reaktion beeinflussen. Zudem kann durch die Zugabe von PCR-Enhancern wie beispielsweise DMSO eine Erhöhung der Spezifität der Amplifikation erreicht werden. Entscheidend für die Qualität und Ausbeute der Reaktion ist zudem das gewählte Temperaturprogramm. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene PCR-Strategien verwendet. Die jeweils verwendeten Reaktionsansätze und Temperaturprogramme können dem Kapitel D auf Seite XLV entnommen werden.

Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde für die Evaluierung plasmidtragender Bakterien nach erfolgreicher Transformation verwendet. Hier wurden Bakterienkolonien direkt als Template für die PCR eingesetzt. Für eine Erhöhung der Spezifität und der Ausbeute der Reaktion wurde DMSO respektive eine erhöhte MgCl₂-Konzentration eingesetzt. Die verwendete DNA-Polymerase und der 10-fach PCR-Puffer stammten von der Firma Applied Biosystems.

Fragment-PCR

Für die Gewinnung von quantitativen Mengen an spezifischen PCR-Produkten, beispielsweise für Klonierungsaufgaben, wurden 50 µl Reaktionsansätze mit 5% DMSO und ohne weiteren Zusatz von MgCl₂ eingesetzt (siehe Tabelle D.2). Für die Gewährleistung einer geringen Fehlerquote erfolgte die Amplifikation mit Hilfe der High-Fidelity DNA Polymerase PfuUltra (Stratagene).

Analytische PCR

Analytische PCR-Reaktionen erfolgten für semiquantitative Nachweise spezieller DNA-Sequenzen. Hierbei stand eine hohe Spezifität der Reaktion im Vordergrund. Es wurden kleine Volumina und geringe Zykluszahlen gewählt. Die verwendete DNA-Polymerase und der 10-fach PCR-Puffer stammten von der Firma Applied Biosystems.

3.3.10 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach erfolgter PCR wurden 5 µl jeder Probe mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Seite 40) aufgetrennt, um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen. Für den Fall unspezifischer PCR-Produkte wurden die DNA-Banden mit der richtigen Größe aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Spezifische Einzelbanden hingegen konnten direkt mittels QIAquick PCR-Purification-Kit der Firma Qiagen von Enzym, Nukleotiden und Oligonukleotiden befreit werden.

Aufreinigung von PCR-Produkten mittels Silica-Spinsäulen

Für die Aufreinigung von spezifischen PCR-Produkten kam das QIAquick PCR-Purification-Kit der Firma Qiagen zur Anwendung. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte wie vom Hersteller beschrieben. Die Reinheit und Ausbeute wurde anschließend via UV-Vis-Spektrophotometrie im Nanodrop ermittelt (siehe Kapitel 3.3.7 auf Seite 41).

Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin-Extraction-Kits der Firma Clontech Laboratories. Hierfür wurden die DNA-Proben in möglichst gering-prozentigen Agarosegelen aufgetrennt ($\sim 0,8\%$ (w/v)). Anschließend konnten die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellens herausgeschnitten werden. Die Vorgehensweise der DNA-Elution aus dem Agarosegel entsprach dem Protokoll des Herstellers.

Die Konzentration und Reinheit der Probe wurde anschließend mittels UV-Vis-Spektrophotometrie ermittelt (siehe Kapitel 3.3.7 auf Seite 41).

3.3.11 Restriktion

Die Restriktion von DNA-Molekülen erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs nach Vorgaben des Herstellers. Die Qualität der erfolgten Restriktionsreaktion wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe Kapitel 3.1 auf Seite 40).

3.3.12 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten kam das Enzym T4-DNA-Ligase der Firma Fermentas zum Einsatz. Ligationsreaktionen wurden hierbei für die Klonierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Zum Einsatz kamen dabei 25 ng einer linearisierten Vektor-DNA und die 5-fache Molarität an PCR-Fragment. Der Reaktionsansatz kann Tabelle 3.2 entnommen werden. Die Reaktionszeit betrug 18 Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 16°C.

Tabelle 3.2: Ligationsansatz für einen 5250 bp Vektor und ein 500 bp Fragment

Reagenz	Volumen in μl	Stammkonzentration	DNA-Länge	n in 20 μl
H ₂ O	14,8			
linearisierter Vektor	1	25 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$	5250 bp	7,2 fmol
PCR-Fragment	1,2	10 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$	500 bp	36 fmol
Ligationspuffer	2	10-fach		
T4-DNA-Ligase	1	1 WE		1 WE

3.3.13 Gensynthese

Die Herstellung codonoptimierter *np9*-DNA erfolgte mittels *in vitro* Gensynthese. Hierfür wurden entsprechend der *np9*-Gensequenz Oligonukleotide mit einer Länge von 50 Basen und einer jeweiligen Überlappung von 25 Basen für den Kodierenden- und Nichtkodierenden-DNA-Strang verwendet (Sequenzen siehe Tabelle C.2 auf Seite XXXVIII). Je 100 pmol der Oligonukleotide wurden in 50 μl Anlagerungspuffer (100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES pH 7,4, 2 mM Magnesiumacetat) aufgenommen und 4 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach zehnminütiger Inkubation bei 70°C konnte das Reaktionsgemisch auf 4°C abgekühlt werden. Die Amplifikation der neu synthetisierten DNA-Moleküle erfolgte mittels Fragment-PCR (siehe Kapitel 3.3.9). Die Hinzugabe des Templates (1 μl des Reaktionsgemisches) erfolgte dabei nach dem ersten Denaturierungsschritt (Temperatur 60°C). Die Kontrolle der spezifischen Amplifikation erfolgte im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.1).

3.3.14 Klonierung von DNA-Fragmenten

TA-Klonierung

TA-Klonierungen erfolgten mit Hilfe des TA-Klonierungsvektors pSSTA, welcher in linearisierter Form einen 5'Thymidinüberhang besitzt. Die Herstellung der zu klonierenden DNA-Fragmente wurde dabei mittels einer Polymerase-Kettenreaktion vollzogen. Auf Grund der terminalen Deoxytransferase-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase besitzen die synthetisierten DNA-Moleküle den für die Ligation notwendigen 3'Adeninüberhang. Die Ligation der DNA-Moleküle wurde wie in Kapitel 3.3.12 beschrieben durchgeführt. Danach erfolgte die Transformation der Plasmid-DNA in chemokompetente Bakterien (Kapitel 3.1.5). Einzelne Bakterienklone konnten anschließend mittels Kolonie-PCR (Kapitel 3.3.9) auf eine erfolgreiche Klonierung untersucht werden.

Klonierung nach Restriktionsverdau

Für die Klonierung von DNA-Molekülen in Expressions- und Reporter-gen-Plasmide wurden die DNA-Fragmente und die Plasmid-DNA spezifisch mit Restriktionsenzymen geschnitten (Kapitel 3.3.11), anschließend aufgereinigt (Kapitel 3.3.10) und mittels T4-DNA-Ligase ligiert (Kapitel 3.3.12). Danach erfolgte die Transformation der Plasmid-DNA in chemokompetente Bakterien (Kapitel 3.1.5). Einzelne Bakterienklone konnten anschließend mittels Kolonie-PCR (Kapitel 3.3.9) auf eine erfolgreiche Klonierung untersucht werden.

3.3.15 DNA-Sequenzierung

Die Ermittlung von DNA-Sequenzdaten erfolgte mittels Kettenabbruchverfahren nach Sanger. Ein DNA-Sequenzierungsansatz enthielt dabei 300 ng Plasmid-DNA, 2 µl BigDye-Mix 3.1 (ABI), 0,5 µl eines sequenzspezifischen Oligonukleotides (10 µM) und 1 µl 5-fach Puffer (ABI) in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Das Temperaturprogramm bestand aus einem Zyklus 95°C für 2 min, 25 Zyklen (95°C 10 sec, 55°C 5 sec, 60°C 4 min). Die Auftrennung der Reaktionsprodukte und die Datengewinnung erfolgte durch Mitarbeiter des Sequenzierlabors des Robert Koch-Instituts an einem 370A DNA-Sequencing System (Applied Biosystems). Für die Auswertung der Sequenzinformationen diente das Programm Lasergene (DNA Star).

3.4 Quantitative Real-time PCR

3.4.1 Allgemeines

Mit Hilfe der Real-time PCR ist es möglich die Amplifikation einer DNA-Sequenz über die Zeit hinweg zu verfolgen. Die hier verwendete Methode zur Messung der neu synthetisierten DNA vollzog sich über die Interkalation eines fluoreszierenden Farbstoffes (SYBR-Green I oder Eva-Green) in doppelstränge DNA, wodurch die Fluoreszenz messbar erhöht wird [Higuchi et al., 1993]. Das vom Farbstoff emittierte Licht wird über eine CCD-Kamera nach jedem Zyklus gemessen und am Ende der Reaktion als Funktion über der Zeit ausgegeben. Dabei korreliert die Fluoreszenz des Farbstoffes direkt mit der Menge an DNA im Reaktionsgefäß.

3.4.2 Prinzip der relativen Quantifizierung mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Pfaffl [2001]

Bei der relativen Quantifizierung von DNA ermittelt man nicht die absolute Kopienzahl einer Template-DNA (Target), sondern bestimmt das Expressions-Verhältnis des Target-Gens in zwei unterschiedlichen Proben. Mit Hilfe von Housekeeping-Genen (Referenz - keine/geringe Regulation zwischen verschiedenen Proben) ist es möglich, Unterschiede zwischen den Vergleichsproben hinsichtlich der Effizienz der reversen Transkription, der Probenmenge oder der Reaktionsqualität auszugleichen.

Berechnung der Ratio zweier cDNA-Proben

Mit Hilfe der Real-time PCR erhält man die C_T -Werte für die Target- und Referenz-Gene der zwei verschiedenen Proben (z.B. HEK-293 unbehandelt und HEK-293 behandelt). Danach erfolgte die Berechnung des normalisierten C_T -Wertes für die Probe (z.B. HEK-293 behandelt) mit der Formel 3.1

$$\Delta C_{T,q} = C_{T,Xq} - C_{T,Rq} \quad (3.1)$$

- mit $\Delta C_{T,q}$: normalisierter C_T für die Probe
 $C_{T,Xq}$: C_T des Targets in der entsprechenden Probe
 (z.B. $C_T env$ in HEK-293 behandelt)
 $C_{T,Rq}$: C_T der Referenz in der entsprechenden Probe
 (z.B. $C_T GUS-B$ in HEK-293 behandelt)

und die Berechnung des normalisierten C_T -Wertes für die Kalibrator Probe (z.B. HEK-293 unbehandelt) mit der Formel 3.2.

$$\Delta C_{T,cb} = C_{T,Xcb} - C_{T,Rcb} \quad (3.2)$$

- mit $\Delta C_{T,cb}$: normalisierter C_T für die Kalibrator-Probe
 $C_{T,Xcb}$: C_T des Targets in der entsprechenden Probe
 (z.B. $C_T env$ in HEK-293 unbehandelt)
 $C_{T,Rcb}$: C_T der Referenz in der entsprechenden Probe
 (z.B. $C_T GUS-B$ in HEK-293 unbehandelt)

Die Berechnung der Ratio erfolgt nach Gleichung 3.3, wobei sich $\Delta\Delta C_T$ aus Formel 3.4 ergibt.

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (3.3)$$

$$\text{mit } \Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb} \quad (3.4)$$

Da alle Werte im Triplet gemessen wurden, konnte nach der Berechnung der Ratio die Standardabweichung und der Mittelwert der Ratio-Werte berechnet werden.

Bestimmung der Amplifikations-Effizienzen

Voraussetzung für die $\Delta\Delta C_T$ -Methode sind gleiche Amplifikations-Effizienzen für die Target- und Referenz-DNA. Unterschiede können hier zum Beispiel durch unterschiedliche Bindeeigenschaften der verwendeten Primer entstehen. Die PCR-Effizienzen werden dabei mit Hilfe einer Standardkurve für die Target- und Referenz-DNA bestimmt. Dabei spielen absolute Konzentrationsangaben an Template-DNA keine Rolle. Für die Messung der PCR-Effizienzen wurde GH-cDNA verwendet und eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000) hergestellt. Alle fünf Verdünnungsstufen wurden jeweils im Triplet für die Referenz-Gene GUS-B, *env*, *rec* und *np9* gemessen. Durch Auftragen der entsprechenden C_T -Werte über dem Logarithmus der Standard-Menge erhält man durch lineare Regression eine Geradengleichung, deren Anstieg für die Effizienzberechnung (siehe Formel 3.5) verwendet wird.

$$Effizienz = 10^{-\frac{1}{Anstieg}} - 1 \quad (3.5)$$

3.4.3 Real-time PCR zur Detektion gespleißter HERV-K mRNA

Das hier verwendete System zur relativen Quantifizierung von gespleißter HERV-K mRNA beruhte auf einem bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll [Büscher, 2006]. Dabei wurden die verschiedenen HERV-mRNA Spezies, welche sich nur in wenigen Sequenzabschnitten voneinander unterscheiden, mit Hilfe eines generellen Sense-Primers und eines transkriptspezifischen Antisense-Primers detektiert. Auf Grund der hohen Anzahl von HERV-K(HML-2)-Proviren im humanen Genom wurde für eine spezifische Bestimmung der HERV-K-Expression von weitgehend intakten Proviren nur die gespleißten RNA-Spezies *env*, *rec* und *np9* untersucht. Im Vergleich zum ursprünglichen System [Büscher, 2006] wurde ein neuer *np9*-Primer erstellt. Ferner erfolgte die cDNA-Synthese in einem separaten Reaktionsschritt mit Hilfe von Random Hexamer Primern (siehe Kapitel 3.3.9) und für die PCR-Reaktion kam anstelle des TaqMan-real-time PCR-Systems ein SYBR-Green real-time PCR-System (BRILLIANT-SYBR-GREEN-QPCR (Stratagene)) zur Anwendung. Des Weiteren erfolgte die Normalisierung der Expressionsdaten gegen das Haushaltsgen GUS-B mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode siehe Kapitel 3.4.2 auf Seite 46.

Die real-time PCR wurde im Lightcycler Mx4000 (Stratagene) unter Verwendung des in

Tabelle D.4 aufgeführten PCR-Protokolls und Temperaturprogramms durchgeführt. Nach Ablauf des PCR-Programms erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse, um die Synthese eines einzelnen spezifischen PCR-Produktes zu kontrolliert.

3.4.4 EvaGreen Real-time PCR

Die relative Quantifizierung zellulärer mRNA-Spezies wurde mit Hilfe der real-time PCR und einem auf PCR-Gold-Buffer (Applied Biosystems), AmpliTaq-Gold DNA-Polymerase (Applied Biosystems) und EvaGreen (Biotium) beruhendem PCR-Reaktionsansatzes realisiert. EvaGreen (EG) lagert sich wie SYBR-Green-1 bevorzugt in doppelsträngige DNA ein, was in einer erhöhten Fluoreszenz des Farbstoffes resultiert. Im Gegensatz zu SYBR-Green-1 besitzt EvaGreen keinen PCR-inhibierenden Einfluss, eine höhere Sensitivität und keine Mutagenität und Zytotoxizität [Mao et al., 2007]. Der Fluoreszenzbereich entspricht dem von SYBR-Green-1.

Die Durchführung der real-time PCR erfolgte im Lightcycler Mx4000 (Stratagene) unter Verwendung des in Tabelle D.5 aufgeführten PCR-Protokolls und Temperaturprogramms. Nach Ablauf des PCR-Programms wurde zudem eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Synthese eines einzelnen spezifischen PCR-Produktes zu kontrolliert.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Proteinisolierung mittels RIPA-Lyse

Die Gewinnung von Gesamtzellprotein aus humanen Zellen erfolgte mittels RIPA-Lyse. Von den adhärennten Zellen einer Kulturschale wurde zunächst das Nährmedium abgenommen und im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von frischer PBS-Lösung wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Oberfläche abgelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation der Zellen bei 500 g für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in eiskaltem RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,2), 0,1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) Deoxycholat, 5 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 mM Benamidin, 2 µg/ml Leupeptin, 100 µM Natriumorthovanadat, 10 mM p-Nitrophenylphosphat)

aufgenommen. Danach erfolgte eine Inkubation für 10 min auf Eis und das Abtrennen unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C. Der Überstand enthielt das Gesamtprotein der Zellen und wurde in eine neues Gefäß überführt. Die Lagerung der Proteinsuspension erfolgte bei -20 °C.

3.5.2 BCA-Protein Assay

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben in Lösungen erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay der Firma Pierce (Bonn, Deutschland). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Extinktionsmessung mittels ELISA-Reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 570 nm gegen eine Referenz von 492 nm. Die Proteinkonzentration wurden dabei im Vergleich zu einer mitgeführten Eichreihe eines BSA-Standards (0, 200, 400, 600, 800, 1.000 und 1.200 µg/mL) in Dreifachansätzen ermittelt.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde verwendet, um Proteine nach ihrer molekularen Größe zu trennen. Dabei wandern die durch die SDS-Beladung weitgehend denaturierten Proteine mit Hilfe einer elektrischen Spannung durch ein Polyacrylamidgel. Das anionischen Detergenz SDS sorgt dabei für eine annähernd gleichmäßige negative Ladung der Proteine.

Die Proteinproben wurden hierfür in 4-fach Probenpuffer (100 mM Tris, 25% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Coomassie Blue G250) aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 5.000 g für 5 min. Der Überstand wurde anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Das SDS-Polyacrylamidgel bestand dabei aus einem Sammelgel (4% (w/v) Acrylamid-BIS, 0,08% (w/v) APS, 0,2% (v/v) TEMED, 0,15 M Tris, 0,12% (w/v) SDS, add 100% (v/v) H₂O (pH 6,7)) und einem 12 %igem Trenngel (12,5% (w/v) Acrylamid-BIS, 0,08% (w/v) APS, 0,2% (v/v) TEMED, 0,5 M Tris, 0,12% (w/v) SDS, add 100% H₂O (pH 8,8)). Ein kommerzieller, vorgefärbter Größenstandard (Proteinladder, Fermentas) wurde mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte im BioRad Mini Protean II System bei 100 V für 1 h in Laufpuffer (0,025 M Tris, 0,2 M Glycin, 0,1% SDS, add 100% H₂O). Danach standen die

Gele für einen direkten Proteinnachweis mittels Coomassie Färbung oder für einen Blot auf PVDF-Membranen zur Verfügung.

3.5.4 Coomassie-Färbung

Die Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte mittels Coomassie-Färbung. Hierfür wurden die Gele für 10 min bei RT in Coomassie-Färbelösung (0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% Methanol, 10% Essigsäure, add 100% H₂O) inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Gele mit H₂O erfolgte die Entfärbereaktion für zwei Stunden bei RT mittels Entfärberlösung (25% Methanol, 10% Essigsäure, add 100% H₂O).

3.5.5 Western Blot

Die Western Blot-Analyse ist eine immunoanalytische Methode zur Detektion von Proteinen auf einer Trägermembran mit spezifischen Antikörpern. Hierbei kam das Semidry-Elektroblotting-Verfahren (Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell, Biorad) zur Anwendung. Die Gele wurden nach der SDS-Gelelektrophorese für 10 min in Transferpuffer (60% Laufpuffer, 40% Methanol) inkubiert und anschließend mit Transferpuffer getränkten Blotpapieren und einer PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, 0,2 µm Poren von Millipore, Billerica, MA, USA) in die Blotkammer eingelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei 25 V für 30 min. Danach wurde eine Blockierung der nichtproteinbesetzten Membranbereiche mittels Blockierungspuffer (5% (w/v) Magermilchpulver, 95% Waschpuffer (10 mM Tris, 0,9% (w/v) NaCl, 0,05% (v/v) Tween-20)) für 1 h bei RT durchgeführt. Zum Nachweis spezifischer Proteine auf der Membran erfolgte im Anschluss an die Blockierung eine Inkubation der Membran mit einem Erstantikörper-Blockierungspuffergemisch für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht. Nach fünf Waschsritten für jeweils 5 min mit 30 mL Waschpuffer bei RT erfolgte die Inkubation der Membran mit einem Zweitantikörper-Blockierungspuffergemisch für 1 h bei RT. Im Anschluss daran wurde die Membran erneut fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und danach wurde eine ECL(Enhanced Chemiluminiszenz)-Detektion mit Hilfe des Amersham ECL-Western Blotting-Detection Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.6 Methoden zur Untersuchung der Genregulation

3.6.1 Dual-Luziferase-Reporterassay

Das Dual-Luziferase Reporter Assay System (DLR™) ist ein *in vivo* Reportersystem, welches Genexpressionsstudien in eukaryotischen Zellen erlaubt. Der Name „Dual Reporter“ resultiert aus der Besonderheit, dass bei diesem System zwei individuelle Reporter in einer Zelle gleichzeitig exprimiert und gemessen werden können. Dabei unterscheidet man zwischen einem „experimentellen“ Reporter, welcher auf Grund der zu untersuchenden Versuchsbedingungen unterschiedlich exprimiert wird und dem „Kontroll-Reporter“, dessen Expression unabhängig von äußeren Einflüssen in jeder Zelle auf nahezu gleichem Niveau stattfindet. Die Normalisierung des experimentellen Reporters zum Kontroll-Reporter minimalisiert experimentelle Unterschiede, welche beispielsweise durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen, Zellzahlen, Pipettiervolumen oder Zell-Lysis-Effekten auftreten können.

Reporterenzyme

Das (DLR™) besitzt als experimentellen Reporter das Enzym Firefly-Luziferase, welches durch den Vektor pGL3-basic bzw. pGL3-control kodiert wird. Als Normalisierungsreporter fungiert das Enzym Renilla-Luziferase, welches durch den Vektor pRL-CMV kodiert wird. Ein pGL3- und ein pRL-CMV-Vektor werden zeitgleich (dual) in eukaryotische Zellen transfiziert, wobei nur das Gen der Renilla-Luziferase in der Zelle kontinuierlich exprimiert und das Gen der Firefly-Luziferase je nach Versuchsbedingung aktiviert und abgelesen wird.

Ermittlung von LTR-Aktivität in humanen Zelllinien

Für die Ermittlung der HERV-K(HML-2) 5'LTR Aktivität in humanen Zellen wurden die Plasmide pGL3-basic, pGL3-control und pGL3-LTR in jeweiligen Dreifachansätzen zusammen mit dem Plasmid pRL-CMV mittels Lipofectamine-Transfektion (Kapitel 3.2.6) in die entsprechenden Zelllinien transfiziert. Nach 12 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die Gesamtkubationszeit betrug 60 h. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen und die Gewinnung des zellulären Gesamtprotein erfolgte mittels passiver Lyse mit Hilfe des Passiven Lysepuffers (Promega) nach Herstellerangaben.

Die Messung der Luziferaseaktivität wurde am Berthold CENTRO LB 960 Luminometer (Berthold Technologies) mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Kits (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Detektion von aktiven Promotorelementen

Für die Detektion regulatorischer DNA-Elemente innerhalb des 5'LTR von HERV-K108 wurden Teilsequenzen des LTR in den Vektor pGL3-basic stromaufwärts zum offenen Leserahmen des Reportergens Firefly-Luziferase kloniert. Die Vektoren wurden in gleicher Molekülzahl und in Kotransfektion mit dem Normalisierungsvektor pRL-CMV in die zu untersuchenden Zelllinien transfiziert. Nach 12 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die Gesamtkubationszeit betrug 60 h. Die weitere experimentelle Durchführung entsprach dem Protokoll in Kapitel 3.6.1.

Berechnung der Promotoraktivitäten

Für jedes Konstrukt erfolgte die Messung der Promotoraktivität im Triplet. Für die Berechnung der Promotoraktivität wurde zuerst das Verhältnis von Reporterogenaktivität (Firefly-Lumineszenz) zur Referenzaktivität (Renilla-Lumineszenz) berechnet. Damit erhält man für jedes Konstrukt eine relative Luziferaseaktivität (RLU), die als normalisiertes Maß für den in der Zelle exprimierten Reporter steht. Des Weiteren erfolgte die Berechnung des Verhältnisses aus der relativen Luziferaseaktivität für jedes Promotorkonstrukt gegenüber dem promotorfreien Vektor pGL3-basic, welcher die Hintergrundaktivität des Systems beschreibt. Dieser Wert wurde nachfolgend als *relative Promotoraktivität* bezeichnet.

3.6.2 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin Immunopräzipitation ist eine Methode zum Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen. Dabei werden intakte Zellen mittels Formaldehyd fixiert, wodurch DNA-gebundene Protein kovalent an die DNA geknüpft werden. Durch eine anschließende Sonifikation der Zellen wird das enthaltene Chromatin in 500-1.500 bp große Fragmente zerkleinert. Diese können danach über eine selektive Immunopräzipitation der angehefteten Proteine mittels spezifischer Antikörper angereichert werden. Durch eine Aufhebung der

Quervernetzung und einen enzymatischen Verdau der Proteine erhält man freie Nucleinsäuren, welche für eine selektive Amplifikation mittels PCR zur Verfügung stehen.

In dieser Arbeit wurden für die ChIP die Zelllinien GH und HEK-293 in jeweils drei 15 cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70-80% angezogen. Die Durchführung der ChIP erfolgte mit Hilfe des Kits ChIP-IT™ der Firma Active Motif. Die Fixierung der Zellen erfolgte dabei nach Herstellerangaben. Die Sonifikation der Proben wurde am Sonifikator Branson Sonifer 250 durchgeführt. Für die Gewinnung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 800-1.500 bp wurden 7 Sonifikationsdurchgänge mit einer Pulszeit von 20 Sekunden, gefolgt von einer Inkubation von 30 Sekunden auf Eis durchgeführt. Die Qualität der DNA-Fragmentierung wurde mittels DNA-Gelelektrophorese kontrolliert (siehe Kapitel 3.1). Hierfür wurde vorab von einem Teil der DNA-Lösung die Quervernetzung aufgehoben und mittels Proteinase-K Verdau das im Ansatz befindliche Protein gespalten.

Die weitere Durchführung der Chromatin Immunopräzipitation (Vorsäuberung des Chromatins, Präzipitation, Waschen der Chip-Reaktion, Aufheben der Quervernetzung und Proteinverdau, DNA-Elution) erfolgte streng nach Herstellerangaben. Die gewonnenen DNA-Lösungen wurden anschließend für real-time PCR Analysen eingesetzt.

3.6.3 *In vitro* DNA-Methylierung

Die *in vitro* Methylierung von DNA-Molekülen erfolgte mit Hilfe der CpG-Methyltransferase *SssI* (NEB). Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben im 20 µl Maßstab mit 640 µM S-adenosylmethionin (SAM) für 4 h bei 37°C. Für eine differenzielle Methylierung der DNA-Moleküle wurde die Menge an *SssI*-Methyltransferase herabgesetzt. Im Anschluss erfolgte eine Inaktivierung der Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für 20 min und eine Aufreinigung der DNA mittels PCR-Purification (siehe Kapitel 3.3.10). Die Qualität der Methylierungsreaktion wurde durch eine Restriktion mit Hilfe des methylierungssensitiven Restriktionsenzym *HpaII* und des methylierungsinsensitiven Restriktionsenzym *MspI* (Kapitel 3.3.11) mit einer daran anschließenden Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.1) kontrolliert.

3.6.4 Patch-Methylierung

Die Methode der Patch-Methylierung dient der Erzeugung teilmethylierter Vektorsequenzen. Hierbei wurden 10 µg des Vektors pGL3[-283 - +1255bp] mittels der Restriktionsenzyme *SacI* und *NheI* wie in Kapitel 3.3.11 beschrieben verdaut und die Reaktionsprodukte (Fragment und Vektorrückgrat) mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Gel-Elution aufgereinigt (siehe Kapitel 3.1 und 3.3.10). Im Anschluss daran erfolgte eine *in vitro* Methylierung des LTR-Fragmentes (Kapitel 3.6.3) und eine Rückligation des Fragmentes in das unmethylierte Vektorrückgrat (Kapitel 3.3.12). Für die Erzeugung eines Vergleichsvektors diente eine Rückligation unmethylierter LTR-Fragmente in das Vektorrückgrat. Die Aufreinigung der Ligationsansätze erfolgte mittels PCR-Purifikation (Kapitel 3.3.10).

Für die Kontrolle gleicher Ligationseffizienzen wurden Teilvolumina der Ligationreaktionen in einer Dreifachbestimmung in chemokompetente *E.coli* Zellen transformiert und die Anzahl der resultierenden Kolonien quantifiziert (siehe Kapitel 3.1.5). Zudem erfolgte eine semiquantitative PCR mit Primern über eine Ligationsstelle hinweg (Kapitel 3.3.9).

3.6.5 Methylierungssensitive Restriktionsanalyse

Die methylierungssensitive Restriktionsanalyse wurde etabliert, um einen Überblick über das CpG-Methylierungslevel verschiedener HERV-K(HML-2)-Proviren im humanen Genom zu ermitteln. Hierbei wurden drei CpG-Dinukleotide innerhalb des 5'LTR für die Untersuchung ausgewählt. Gegenüber der Methode der Bisulfit-Sequenzierung bietet die CpG-Methylierungsdetektion mittels methylierungssensitiver Restriktionsanalyse eine geringere Auflösung, jedoch Dank des reduzierten Arbeitsaufwandes die Möglichkeit, eine Vielzahl verschiedener Loci im humanen Genom zu untersuchen.

Die Methode gliedert sich dabei in zwei Abschnitte. Nach der Isolation der genomischen DNA aus humanen Zelllinien (Kapitel 3.3.6) wird diese mittels einer methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease über Nacht geschnitten. Im zweiten Schritt dient die verdauten genomische DNA als Template für eine semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion, wobei die für die Amplifikation notwendigen Oligonukleotide jeweils stromaufwärts und stromabwärts der Schnittstelle binden. Für den Fall einer unmethylierten Schnittstelle wird die DNA geschnitten und eine PCR über die Schnittstelle ist nicht möglich. Für den Fall des Vorliegens einer methylierten Schnittstelle bleibt die DNA unverdaut und als Template für die

PCR erhalten. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

In dieser Arbeit wurden für die Detektion des Methylierungsstatus von HERV-K 5'LTRs die methylierungssensitiven Endonukleasen *TauI* (Fermentas), *BsaAI* (NEB) und *HpaII* (NEB) ausgewählt. Zusätzlich wurde die genomische DNA mittels *EcoRI* (NEB) (methylierungsinsensitiv, keine Schnittstelle im 5'LTR) in ungefähr 4.000 bp lange Fragmente geschnitten. Für die Normalisierung der PCR-Reaktion wurde ein *EcoRI*-Einzelverdau mitgeführt. Die Kontrolle des Vorhandenseins der *HpaII*-Schnittstelle im HERV-K 5'LTR erfolgte mit Hilfe des methylierungsinsensitiven Isoschizomers *MspI*. Da für die Enzyme *TauI* und *BsaAI* keine methylierungsinsensitiven Isoschizomere bekannt sind, wurde für die Schnittstellen-Kontrolle unmethyliertes PCR-Fragment als Edukt für die Restriktion eingesetzt. Für einen Restriktionsansatz wurden 200 ng genomische DNA verwendet. Ein PCR-Ansatz enthielt dabei 5 ng der geschnittenen genomischen DNA. Die hier verwendeten Primerpaare bestanden aus einem generellen Rückwärtsprimer (Bindestelle am 3'Ende des 5'LTR) und locusspezifischen Vorwärtsprimern (Bindestelle 40-200 bp stromaufwärts zum 5'LTR). Für die Analyse wurden 5'LTRs von zehn HERV-K(HML-2)-Proviren und zwei solo-LTRs ausgewählt. Als Untersuchungsobjekte dienten die HERV-K exprimierenden Zelllinien GH, SK-MEL-13 und SchM, sowie die HERV-K nicht-exprimierenden Zelllinien HEK-293, SK-MEL-24 und RA. Die Bedingungen der Polymerase-Kettenreaktion können der Tabelle D.3 auf Seite XLVI entnommen werden.

Für die Kontrolle der Qualität des Assay wurde der 5'LTR von HERV-K 22q11 (FW 22q11 und REV K108 +961 siehe Tabelle C.3 auf Seite XLI) in den TA-Klonierungsvektor pSSTA ligiert (Kapitel 3.3.14) und differenziell methyliert (Kapitel 3.6.3). Die Plasmid-DNA diente im Anschluss als Kontroll-DNA für den Verdau mittels methylierungssensitiver Endonukleasen.

3.6.6 Bisulfit Sequenzierung

Die Methode der Bisulfit-Sequenzierung von genomischer DNA ermöglicht es den Methylierungsstatus aller Cytosinnukleotide eines DNA-Strangs zu ermitteln. Das Verfahren beruht dabei auf einer chemischen Behandlung kurzer einzelsträngiger DNA Moleküle (ca. 4.000 bp) mittels Natriumbisulfit, wobei unmethylierte Cytosinbasen zu Uracil umgewandelt werden. Methylierte Cytosinnukleotide hingegen sind weitgehend unempfindlich ge-

genüber dieser Prozedur. Die Detektion der vollzogenen DNA-Modifikation erfolgt mittels Sequenzierung und dem Vergleich mit unbehandelter genomischer DNA.

Die hier angewandte Methode ist eine Abwandlung der Methode von Olek et al. [1996]. Für die Erzeugung kurzer DNA-Fragmente wurden in einem ersten Schritt 500 ng der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (siehe Kapitel 3.3.11) über Nacht verdaut und anschließend in 0,3 M NaOH für 20 min in einem Volumen von 25 µl bei 55°C denaturiert. Die denaturierte DNA wurde anschließend mit 50 µl 2% (w/v) Low Melting Point-Agarose (Sigma) vermischt. Anschließend konnten durch das Pipettieren von jeweils 10 µl des DNA/Agarose-Gemischs in eisgekühltes Mineralöl (Sigma) Kugeln geformt werden. Dies erfolgte pro Ansatz sieben Mal, wodurch eine DNA/Agarose-Kugel ca. 67 ng DNA enthielt. Danach wurden je 500 µl Natriumbisulfit/Hydrochinone-Lösung (Sigma) zu den DNA/Agarose-Kugeln unter das Mineralöl pipettiert und für 18 h bei 55°C inkubiert. Anschließend konnten die Kugeln in 1-fach TE-Puffer gewaschen und die gebundene DNA durch eine Behandlung mit 0,3 M NaOH (Sigma) für 15 min bei 37°C desulfoniert werden. Nach nochmaligem Waschen der Kugeln in TE-Puffer und ddH₂O wurden diese direkt als Template in die darauffolgende nested PCR eingesetzt.

In dieser Arbeit sollte der 5'LTR von HERV-K108 auf Cytosinmethylierung untersucht werden. Die nested PCR-Primerpaare können der Tabelle C.3 auf Seite XLI entnommen werden. Die Reaktionszusammensetzung und das Temperaturprogramm sind in Tabelle D.6 aufgeführt.

Die Qualität der PCR-Reaktion wurde gelelektrophoretisch überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.10), in einen TA-Klonierungsvektor kloniert (siehe Kapitel 3.3.14), sequenziert (siehe Kapitel 3.3.15) und analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Regulation der HERV-K(HML-2) Expression in humanen Melanomen

Die HERV-K(HML-2) mRNA- und Proteinexpression ist auf eine nur geringe Anzahl von Geweben und Tumoren respektive Tumorzelllinien beschränkt. Besonderes Interesse gilt dabei der Expression der von HERV-K(HML-2) kodierten Proteine Env, Rec und Np9, welche unter Verdacht stehen, eine Rolle im Transformationsprozess der Zelle bzw. der Tumorprogression zu spielen. Für humane Melanome ist bekannt, dass die Expression von HERV-K(HML-2) ein Marker für eine reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit von Melanompatienten ist [Hahn et al., 2008]. Um die tumorspezifische Expression von HERV-K näher zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit die transkriptionelle Regulation dieses humanen endogenen Retrovirus in humanen Melanomzelllinien untersucht.

4.1.1 Ermittlung HERV-K exprimierender Melanomzelllinien

Für eine Analyse der Ursache der Expression von HERV-K(HML-2) in humanen Melanomen sollte in einem ersten Schritt ein Panel HERV-K exprimierender und HERV-K nicht-exprimierender Melanomzelllinien für nachfolgende Vergleichsstudien etabliert werden. Hierfür wurden elf humane Melanomzelllinien ausgewählt, kultiviert und Zellproben für die RNA und DNA-Extraktion gewonnen. Zu diesem Panel zählten die Zelllinien SK-MEL-13, SK-MEL-19, SK-MEL-24, SK-MEL-28, SK-MEL-37 [Carey et al., 1976], sowie die Zelllinien RA, TR, SchM, SchW, ZO und ZD [Büscher, 2006].

Die Quantifizierung der HERV-K *env*-, *rec*- und *np9*-mRNA-Level erfolgte mittels real-time PCR nach der $\Delta\Delta CT$ Methode im Vergleich zur humanen Teratokarzinomzelllinie GH. Dabei konnte für die Zelllinien SK-MEL-13, SK-MEL-19, SK-MEL-28, SchM und SchW

4 Ergebnisse

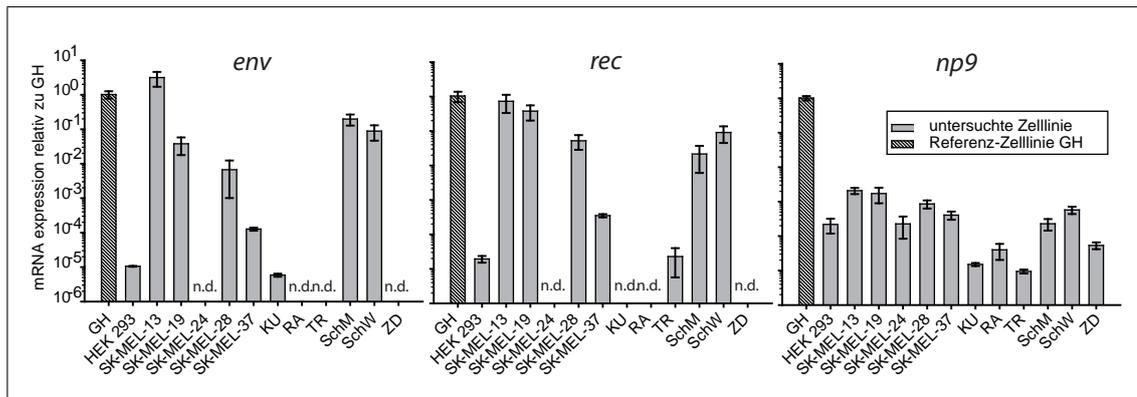


Abbildung 4.1: Bestimmung des mRNA-Niveaus der HERV-K(HML-2) Spleißvarianten *env*, *rec* und *np9* in humanen Zellen mittels real-time PCR nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode im Vergleich zur HERV-K exprimierenden Zelllinie GH (n.d. bedeutet nicht detektierbar).

ein hohes Level an HERV-K-mRNA für die Transkriptvarianten der Typ2 Proviren *env* und *rec* detektiert werden (Abbildung 4.1). Diese Zelllinien besaßen im Vergleich zu allen anderen getesteten Zelllinien ein ebenfalls erhöhtes Niveau an *np9*-mRNA, welches aber nur 0,2 Prozent des *np9*-mRNA-Niveaus der Positivzelllinie GH darstellte. Die Melanomzelllinien SK-MEL-24, SK-MEL-37, KU, RA, TR und ZD zeigten keine bzw. lediglich basale Level an HERV-K-mRNA, vergleichbar mit der Expression in der HERV-K nicht-exprimierenden Zelllinie HEK-293.

Interessanterweise konnten innerhalb der HERV-K exprimierenden Zelllinien unterschiedliche Niveaus an gespleißten HERV-K mRNA Spezies detektiert werden. Die Zelllinie SK-MEL-13 wies dabei ein dreifach höheres *env*-mRNA-Level im Vergleich zu GH-Zellen auf, wohingegen das *rec*-mRNA Level um den Faktor 0.8 verringert war. Im Gegensatz dazu besaß die Zelllinie SK-MEL-19 nur 5% des *env*-mRNA-Levels von GH-Zellen, jedoch im Vergleich dazu ein erhöhtes Level an *rec*-mRNA (40% von GH).

Für weitere Untersuchungen wurden die HERV-K exprimierenden Zelllinien SK-MEL-13, SK-MEL-19 und Schw, sowie die HERV-K nicht-exprimierenden Zelllinien SK-MEL-24, SK-MEL-37 und RA ausgewählt.

4.1.2 Bestimmung der HERV-K Promotoraktivität in humanen Zelllinien

Für den Nachweis HERV-K(HML-2) aktivierender Transkriptionsfaktoren in Melanomzelllinien kam ein LTR-Luziferase-Reportergenassay zur Anwendung (siehe Kapitel 3.6.1 auf

Seite 52). Für die Messung der HERV-K-Promotoraktivität wurde der gesamte 5'LTR von HERV-K108 sowie der 5'UTR stromaufwärts zum Reportergen Firefly-Luziferase in den Vektor pGL3-basic kloniert. Die Bestimmung der Basalexpression des Systems erfolgte mit Hilfe des promotorfreien Firefly-Luziferasevektors pGL3-basic. Als Expressionsreferenz diente der Kontrollvektor pGL3-control, welcher die Expression des Reportergens Firefly-Luziferase über einen vorgeschalteten SV40-Promotor reguliert.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten für das Kontrollplasmid pGL3-control eine annähernd gleiche Reportergenaktivität (ca. 50-fache Erhöhung im Vergleich zu pGL3-basic). Demgegenüber konnte für den HERV-K 5'LTR getriebenen Reportergenvektor pGL3-LTR ein deutlicher Unterschied zwischen HERV-K exprimierenden und HERV-K nicht-exprimierenden Zelllinien hinsichtlich der Luziferaseaktivität festgestellt werden. Die Zelllinien GH, SK-MEL-13, SK-MEL-19 und SchM (charakterisiert durch eine hohe HERV-K Expression) zeigten dabei eine deutlich erhöhte Reportergenaktivität gegenüber den Zelllinien HEK-293, SK-MEL-24, SK-MEL-37 und RA (charakterisiert durch eine basale HERV-K-Expression). Dabei unterschieden sich die relativen Luziferaseaktivitäten der Kontrollzelllinien GH und HEK-293 um den Faktor 373 und die der Melanomzelllinien im Mittel um den Faktor 42 (Abbildung 4.2 A).

Die Ergebnisse des Reportergenassays wiesen somit eine starke Korrelation zwischen erhöhter HERV-K-Expression und einer hohen Promotoraktivität bzw. einer basalen HERV-K-Expression und basaler HERV-K-Promotoraktivität auf.

4.1.3 Bestimmung der HERV-K Promotoraktivität in einem Panel zufällig ausgewählter Melanomzelllinien

Durch das Auffinden erhöhter LTR-Promotorstärken in Melanomzellen mit hohen HERV-K-mRNA-Niveaus ergab sich die Frage, ob das Vorhandensein von HERV-K transaktivierenden Faktoren ein allgemeines Phänomen von Melanomen ist oder aber ein Kennzeichen weniger Zellen. Für die Beantwortung dieser Frage wurde ein Set von zehn zufällig ausgewählten Melanomzelllinien (HERV-K-Expressionslevel unbekannt) zusammengestellt und auf LTR-Promotoraktivität getestet (Abbildung 4.2 B). Alle zehn getesteten Zelllinien zeigten keine Expression des Reportergens nach der Transfektion des 5'LTR getriebenen Luziferasevektors pGL3b-LTR. Die Promotoraktivitäten des Kontrollplasmides pGL3-control waren mindestens doppelt so hoch wie die des Leervektor pGL3b. In allen Messungen konn-

4 Ergebnisse

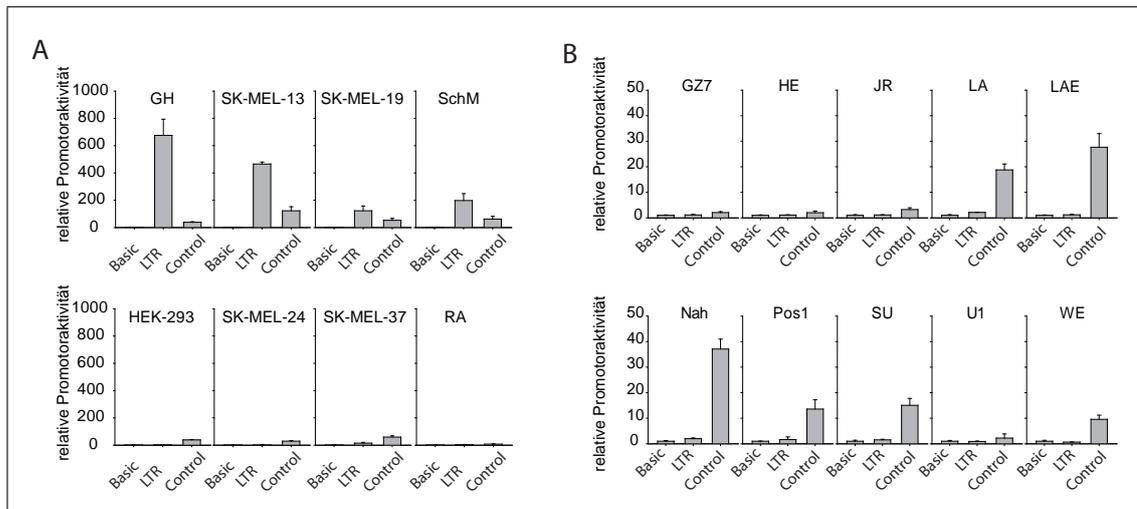


Abbildung 4.2: Bestimmung der HERV-K(HML-2)-5'LTR-Aktivität in den **A)** humanen Kontrollzelllinien GH und HEK-293, den HERV-K-exprimierenden Melanomzelllinien SK-MEL-13, SK-MEL-19, SchM und den HERV-K-nicht-exprimierenden Melanomzelllinien SK-MEL-24, SK-MEL-37 und RA und **B)** in einem Panel an zufällig ausgewählten Melanomzelllinien. Die aufgeführten Luziferaseaktivitäten der Vektoren pGL3-basic (kein Promotor), pGL3-LTR (HERV-K 5'LTR) und pGL3-control (SV40-Promotor) sind angegeben als Vielfaches der Luziferase-Expression von pGL3-basic.

ten hohe Luziferasewerte für den kotransfizierten, CMV-Promotor getriebenen Renilla-Luziferase-Vektor pRL-CMV gemessen werden, was eine ausreichende Transfektionseffizienz und die Funktionalität des Assays bestätigte.

Erhöhte Level an HERV-K(HML-2) transaktivierenden Faktoren können daher nicht als ein allgemeines Charakteristikum von Melanomzellen angesehen werden, sondern sind ein Kennzeichen weniger Zelllinien.

4.1.4 Untersuchung der proviralen Promotornutzung

Für die Detektion transkriptionsregulierender Sequenzen innerhalb des HERV-K108 5'LTRs wurden mit Hilfe der in Tabelle C.2 auf Seite XXXVIII aufgeführten Primer sechs unterschiedlich lange LTR-Sequenzen über die Schnittstellen *NheI* und *SacI* vor das Firefly-Luziferase Gen des Vektors pGL3-basic kloniert (siehe Kapitel 3.3.14). Die Kontrolle der LTR-Vektoren erfolgte mittels Restriktionsanalyse und Sanger-Sequenzierung (Kapitel 3.3.11 und 3.3.15). Folgende Promotordelektionskonstrukte konnten hergestellt werden: pGL3b[-283 - +960bp], pGL3b[-283 - +800bp], pGL3b[+1 - +800bp], pGL3b[+267 - +800bp],

4.1 Regulation der HERV-K(HML-2) Expression in humanen Melanomen

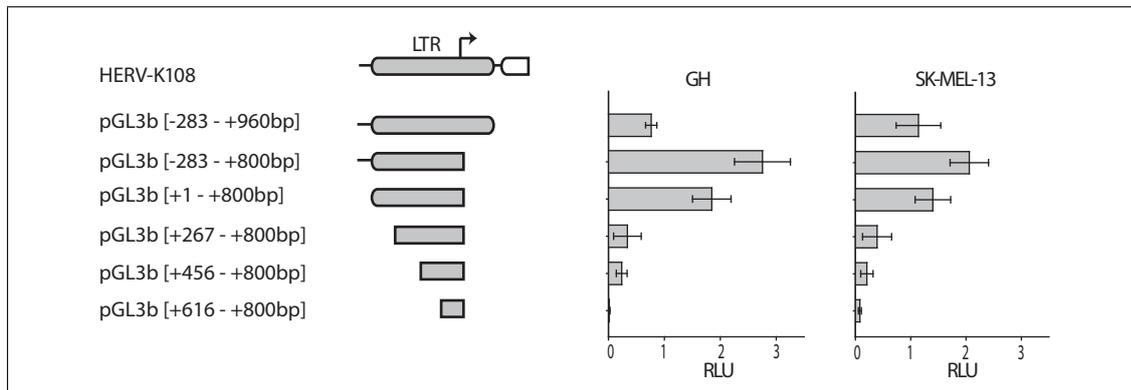


Abbildung 4.3: Detektion von trans-aktivierenden Sequenzen innerhalb des HERV-K 5'LTR in den humanen Zelllinien GH und SK-MEL-13 mit Hilfe von LTR-Deletionskonstrukten im Reporterassay. Der linke Teil der Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten 5'LTR-Sequenzen und der rechte Teil der Abbildung die dazugehörigen relativen Luciferaseaktivitäten (RLU) der jeweiligen Zelllinien.

pGL3b[+456 - +800bp] und pGL3b [+616 - +800bp] (Werte in eckigen Klammern geben die relative Position der klonierten Sequenz des 5'LTRs an, wobei +1 dem ersten Basenpaar von HERV-K108 entspricht).

Nach einer transienten Transfektion der Vektoren in die Zelllinien GH und SK-MEL-13 und einer anschließenden 60-stündigen Inkubation erfolgte die Probennahme und die Bestimmung der Luciferaseaktivität (Kapitel 3.6.1). Hierbei konnte festgestellt werden, dass für beide Zelllinien ein sehr ähnliches Promotoraktivitätsprofil zu verzeichnen war (Abbildung 4.3). Das LTR-Reportergen pGL3b[-283 - +800bp] zeigte dabei die größte Promotorstärke. Diese sank durch eine Hinzunahme der LTR Sequenz +801 - +960bp in GH Zellen auf 28% und in SK-MEL-13 Zellen auf 54%. Zudem konnte festgestellt werden, dass eine Entfernung der stromaufwärts zu HERV-K108 gelegenen genomischen DNA ebenfalls zu einem Verlust an Promotoraktivität führte (Verlust von 32% für GH und SK-MEL13). Eine Deletion im U3-Bereichs des 5'LTRs (+1 - +266bp) bewirkte den größten Verlust an Promotorstärke (82% für GH und 73% für SK-MEL-13). Weitere Deletionen des 5'Endes des LTRs offenbarten nur noch geringe Verluste an Promotorleistung. Das kürzeste Konstrukt [+616 - +800bp] zeigte für beide Zelllinien sehr schwache, aber im Vergleich zum Leervektor erhöhte Signalstärken.

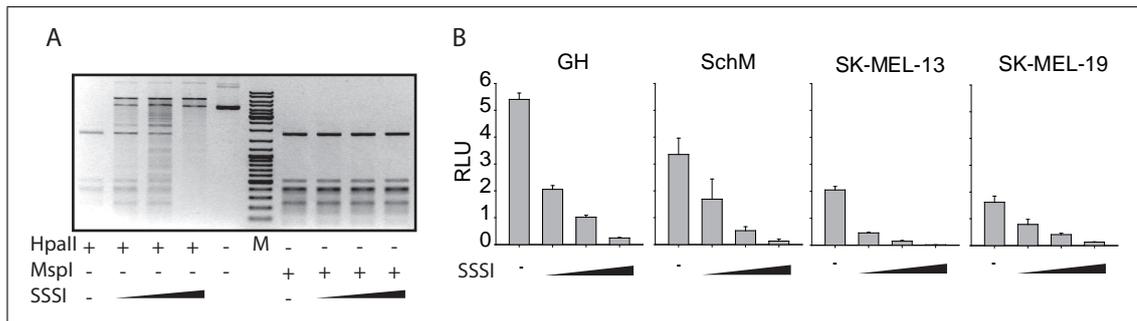


Abbildung 4.4: Analyse der methylierungsabhängigen transkriptionellen Regulation des HERV-K 5'LTR in humanen Melanomzelllinien. A) Kontrolle der differentiellen *in vitro* Methylierung des Reporter-Gen-Konstruktes pGL3-LTR mit Hilfe der isoschizomeren Restriktionsenzyme *HpaII* und *MspI*. B) Messung der Luziferaseaktivität differentiell methylierter Reporter-Gen-Konstrukte nach transienter Transfektion in humane Zelllinien (RLU entspricht der relativen Luziferaseaktivität).

4.1.5 Untersuchungen der Methylierungsabhängigkeit des HERV-K(HML-2) 5'LTRs

Neben der Regulation der Initiation der Transkription durch eine Erhöhung des Levels an aktivierten, promotor-spezifischen Transaktivatoren (bzw. der Reduktion von Transkriptionsinhibitoren) werden humane Gene über epigenetische DNA- und DNA-Protein-Veränderungen reguliert. Für HERV-K(HML-2) Proviren ist bekannt, dass DNA-Methylierung die transkriptionelle Aktivität des 5'LTRs in Teratokarzinomzelllinien direkt inhibiert [Lavie et al., 2005].

Für eine Analyse der putativen Regulation der HERV-K-5'LTR-Aktivität über den Mechanismus der DNA-Methylierung in Melanomzellen wurde das Reporter-Gen-Konstrukt pGL3-LTR mittels *in vitro* CpG-Methylierung differentiell aufmethyliert (siehe Abbildung 4.4A) und anschließend in humane, HERV-K exprimierende Melanomzelllinien transfiziert. Alle getesteten Zelllinien zeigten dabei eine starke Reduktion der LTR-Aktivität in Abhängigkeit von der Stärke der Plasmid-Methylierung. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass eine annähernd vollständige CpG-Methylierung des 5'LTRs zu einer Reduktion der Promotoraktivität auf ein basales Niveau führte (Abbildung 4.4B). Somit konnte auch für Melanomzellen eine direkte Abhängigkeit der HERV-K(HML-2)-Promotoraktivität vom Grad der LTR-Methylierung festgestellt werden.

4.1.6 Untersuchungen der Methylierungsabhängigkeit des HERV-K(HML-2) 5'LTRs mittels Patch-Methylierung

Die in Kapitel 4.1.5 verwendeten Luziferasevektoren besaßen neben der Methylierung des LTR-Bereiches auch eine Methylierung des Vektorrückgrates. Für die Erzeugung einer LTR-spezifischen Methylierung kam die Methode der *Patch-Methylierung* zur Anwendung (siehe Kapitel 3.6.4). Hierfür wurde das LTR-Fragment aus dem Vektor pGL3[-283 - + 1255] herausgeschnitten und selektiv aufmethyliert bzw. für eine Vergleichsmessung im unmethylierten Zustand belassen. Die Kontrolle der *in vitro* Methylierung des LTRs erfolgte anschließend mittels der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease *HpaII*. Hierbei konnte eine Gesamtmethylierung von 50 bis 70 Prozent des methylierten LTR-Fragmentes detektiert werden, wohingegen das unmethylierte LTR-Fragment keine CpG-Methylierung aufwies (Abbildung 4.1.6A). Im Anschluss daran erfolgte die Religation des methylierten und unmethylierten DNA-Fragmentes in den unmethylierten Vektor pGL3-basic. Für eine Bestimmung der Grundaktivität wurde eine Ligation des geschnittenen Vektors ohne LTR-Fragment durchgeführt.

Die Quantität der Reklonierungsreaktionen wurde durch eine Transformation des Ligationproduktes in chemokompetente *E.coli* Zellen kontrolliert. Dabei konnten annähernd gleiche Koloniezahlen für die Ligationen des methylierten und unmethylierten LTR-Fragmentes detektiert werden, wohingegen für die Leervektorligation nur wenige Kolonien zu verzeichnen waren (hier nicht aufgeführt).

Die Messung der Luziferaseaktivität in Zellen, welche mit DNA der Ligationkontrolle transfiziert wurden, ergab Leuchtstärken im Bereich untransfizierter Zellen. Demgegenüber konnten für die methylierten und die unmethylierten Vektorproben deutliche Luziferaseaktivitäten gemessen werden, was eine Funktionalität des Assays bescheinigte. Die Leuchtstärke des methylierten LTR-Vektors war im Vergleich zum unmethylierten Vektor konstrukt um ca. 50 Prozent herabgesetzt und bestätigte somit die bereits aufgezeigte direkte Abhängigkeit der HERV-K Promotorstärke vom Grad der CpG-Methylierung (Abbildung 4.5).

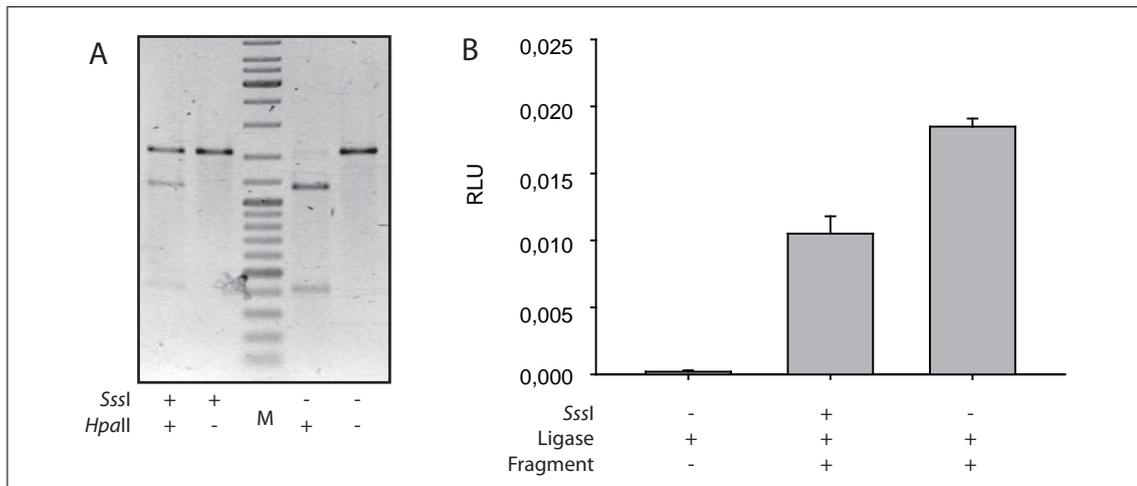


Abbildung 4.5: Analyse der methylierungsabhängigen transkriptionellen Regulation des HERV-K 5'LTR in der humanen Teratokarzinomzelllinie GH. A) Kontrolle der differentiellen *in vitro* Methylierung des LTR-Fragmentes mit Hilfe des methylierungssensitiven Restriktionsenzym *HpaII*. B) Messung der Luciferaseaktivität der Ligationskontrolle und des methylierten bzw. unmethylierten LTR-Fragmentes.

4.1.7 Bestimmung des Methylierungsgrades ausgewählter HERV-K(HML-2) 5'LTRs im humanen Genom

Aufgrund der direkten Abhängigkeit der HERV-K-Promotoraktivität vom Methylierungsstatus des 5'LTR im Reportergenassay, sollte das HERV-K 5'LTR-Methylierungsniveau in humanen Melanomzelllinien näher charakterisiert werden. Für die Detektion methylierter CpG-Dinukleotide in DNA-Fragmenten genomischer DNA wurde in einem ersten Untersuchungsschritt die Methode der DNA-Methylierungsdetektion mittels methylierungssensitiver Restriktionsendonukleasen und anschließender PCR-Amplifikation über die Schnittstelle hinweg gewählt. Diese Methode erlaubt es, einzelne CpG-Dinukleotide innerhalb eines DNA-Fragmentes hinsichtlich ihrer Methylierung zu untersuchen. Als methylierungssensitive Restriktionsendonukleasen wurden die Enzyme *TauI* (Schnittstelle im U3-Bereich des LTR), *BsaAI* (Schnittstelle im R-Bereich des LTR) und *HpaII* (Schnittstelle im U5-Bereich des LTR) ausgewählt.

Evaluation des Methylierungsassays

Für die Evaluation des Methylierungsassays wurde der 5'LTR von HERV-K 22q11 in den Vektor pSSTA kloniert (Klonierungsprimer FW 22q11 und REV K108 +961 siehe Tabelle C.3 auf Seite XLI) und mittels in vitro Methylierung stark bzw. vollständig aufmethyliert. Die differenziell methylierte DNA wurde als Referenz-DNA unter den in Kapitel 3.6.5 aufgeführten Bedingungen verdaut. Die Produkte der Restriktion dienten als Template für eine anschließende semiquantitative PCR mittels des HERV-K 22q11 spezifischen Vorwärtsprimers und des generellen HERV-K LTR Rückwärtsprimers. Durch eine Visualisierung der Reaktionsprodukte im Agarosegel und einem anschließenden Vergleich der Bandenstärken der unverdauten Kontrollreaktionen mit den methylierungssensitiven Analysereaktionen konnte festgestellt werden, dass die Restriktionsenzyme *BsaAI* und *HpaII* qualitativ zwischen nicht methylierter, leicht methylierter und stark methylierter DNA unterscheiden können. Mit Hilfe des Restriktionsenzym *TauI* war hingegen nur eine Unterscheidung zwischen nicht/leicht methylierten und stark methylierten CpG-Dinukleotiden möglich (Abbildung 4.6B).

Ermittlung des Methylierungsgrades von zehn proviralen 5'LTRs und zwei solo-LTRs

Für eine umfassende Analyse des Methylierungsgrades von HERV-K(HML-2) 5'LTRs wurden zehn Vollängen-Proviren und zwei solo-LTRs ausgewählt und mittels methylierungssensitiver Restriktionsendonukleasen auf ihren CpG-Methylierungszustand untersucht. Bei der Betrachtung aller untersuchter 5'LTRs zeigte sich, dass die HERV-K-exprimierende Kontrollzelllinie GH einen schwachen und die HERV-K nicht-exprimierende Kontrollzelllinie HEK-293 einen starken Methylierungsgrad aufwies. Für die Melanomzelllinie SK-MEL-13 (HERV-K exprimierend) zeigte sich ebenfalls eine sehr starke Demethylierung aller 5'LTRs (ausgenommen HERV-K 12q14). Im Gegensatz dazu konnten hohe Methylierungsgrade für die HERV-K nicht-exprimierenden Zelllinien RA und SK-MEL-24 detektiert werden. Interessanterweise wies die Zelllinie SchM (HERV-K exprimierend) ebenfalls einen hohen Grad an CpG-Methylierung für eine Vielzahl der untersuchten 5'LTRs auf. 5'LTRs mit geringer bzw. keiner Methylierung waren auch für diese Zelllinie zu verzeichnen.

Des Weiteren ließ sich beobachten, dass in allen Zelllinien sowohl methylierte als auch nicht-methylierte HERV-K-5'LTRs detektiert werden konnten. Zudem zeigten sich beim

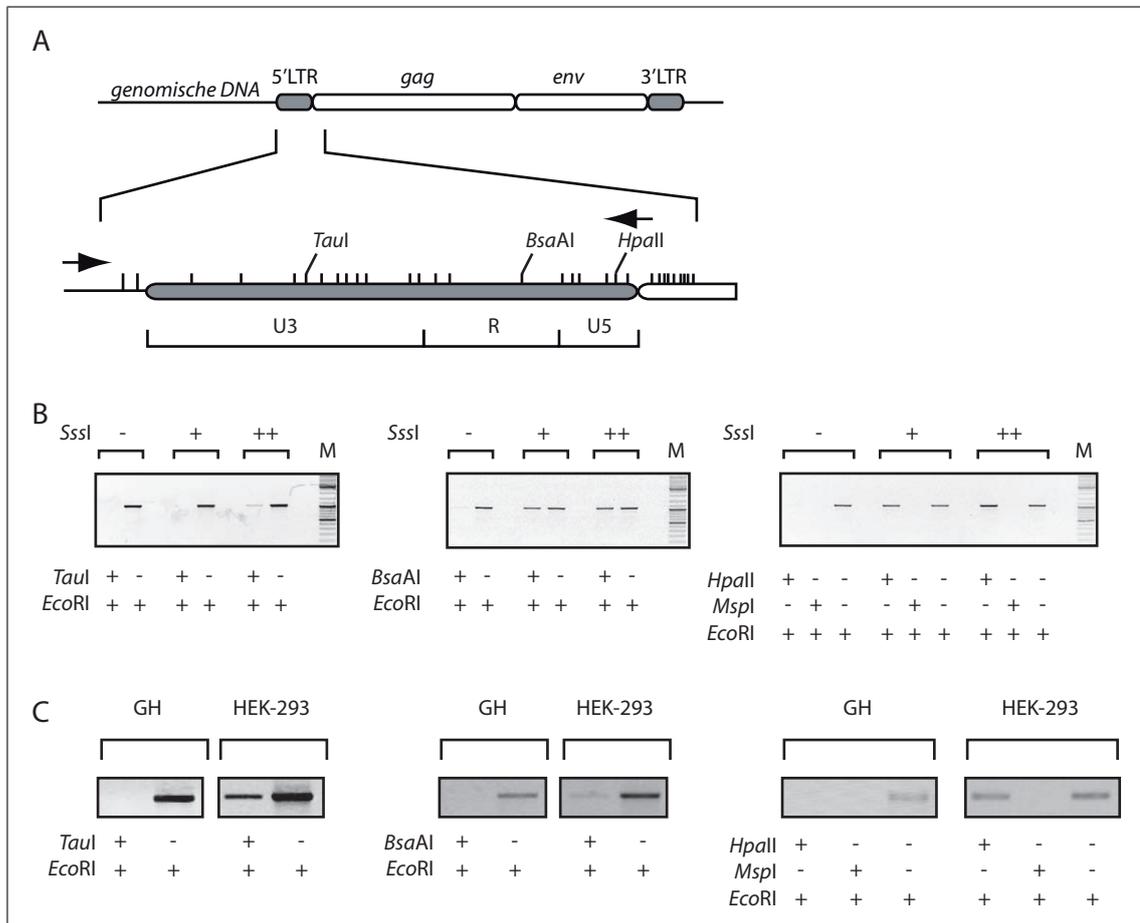


Abbildung 4.6: Evaluation des Assays für die Detektion methylierter CpG-Dinukleotide mit Hilfe von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen. A) Schematische Darstellung eines HERV-K-Provirus mit herausgestellter Darstellung des zu analysierenden 5'LTRs (grau unterlegt). Vertikale, einfache Linien stellen CpG-Dinukleotide dar, Pfeile kennzeichnen die Primerbindestellen. Die Positionen der Konsensussequenzen der Restriktionsendonukleasen sind durch schräge Linien dargestellt und beschriftet. B) Evaluation des Methylierungsassays mit Hilfe differenziell methylierter HERV-K 22q11 5'LTR-Plasmid-DNA für die Restriktionsenzyme *TauI*, *BsaAI* und *HpaII*. C) Methylierungsanalyse von HERV-K 22q11 unter Assaybedingungen für die Kontrollzelllinien GH und HEK-293 mit *TauI*, *BsaAI* und *HpaII*.

Vergleich verschiedener 5'LTRs innerhalb einer Zelllinie unterschiedliche Methylierungsmuster (beispielsweise GH 3q12 vollständig demethyliert vs. GH 12q11 vollständig methyliert).

Bei einer Gesamtbetrachtung des Methylierungsgrades konnte eine klare Korrelation zwischen der Demethylierung von HERV-K 5'LTRs und erhöhter HERV-K-mRNA-Expression bzw. einer starken Methylierung der proviralen LTRs und einer geringen HERV-K Expression nachgewiesen werden.

Auffällig zeigte sich des Weiteren, dass in allen Zelllinien und für alle untersuchten 5'LTRs eine starke Methylierung der *HpaII*-Schnittstelle im U5-Bereich des LTRs zu verzeichnen war. Der Kontrollverdau mit dem methylierungsinsensitiven *HpaII*-Isoschizomer *MspI* zeigte immer ein Vorhandensein der *HpaII*-Schnittstelle im Untersuchungsbereich.

Tabelle 4.1: Methylierung von HERV-K(HML-2) 5'LTRs in HERV-K exprimierenden Zelllinien. *Lage der Schnittstelle* gibt die Position der Erkennungssequenz der Endonuklease in Basenpaaren in Relation zum ersten Nukleotid des 5'LTRs an.

genomische Lokalisation	Lage der Schnittstelle			GH			SK-MEL-13			SchM		
	<i>TauI</i>	<i>BsaAI</i>	<i>HpaII</i>	<i>TauI</i>	<i>BsaAI</i>	<i>HpaII</i>	<i>TauI</i>	<i>BsaAI</i>	<i>HpaII</i>	<i>TauI</i>	<i>BsaAI</i>	<i>HpaII</i>
1q22	304	711	854	○	○	●	○	○	○	●	○	●
1q23.3	n.v.	712	855		●	●		○	●		○	●
3q12	305	718	610	○	○	○	○	○	●	●	○	●
3q13	296	703	846	○	○	●	○	○	●	●	●	●
5q13	296	693	n.v.	○	●		○	○		●	●	
5q33	305	712	855	○	○	●	○	○	●	●	●	●
7p12	304	n.v.	854	○		○	○	○		●		○
11q22	304	711	854	○	○	●	○	○	○	○	○	○
12q11	304	711	854	●	●	●	○	●	●	●	●	●
22q11	304	711	854	○	○	○	○	○	●	○	●	●
Solo 7p21	304	711	854	○	○	●	○	○	●	○	○	●
Solo 19q13	304	711	854	○	○	●	○	○	○	○	○	●

n.v. nicht vorhanden ○ keine Methylierung ● leichte Methylierung ● starke Methylierung

4.1.8 CpG-Methylierungsanalyse eines aktiven HERV-K(HML-2) 5'LTR

Für eine detaillierte Analyse des Methylierungsstatus eines HERV-K(HML-2) 5'LTR auf Ebene einzelner CpG-Dinukleotide kam die Methode der Bisulfit-Sequenzierung zur Anwendung (siehe Kapitel 3.6.6). Da dieses Verfahren mit einem erheblichen Zeit- und Kostenaufwand verbunden ist, sollte die Untersuchung auf einen transkriptionskompetenten 5'LTR eines nahezu intakten HERV-K Provirus beschränkt werden. Die Detektion transkriptionskompetenter HERV-K Proviren im humanen Genom ist aufgrund der hohen Se-

4 Ergebnisse

Tabelle 4.2: Methylierung von HERV-K(HML-2) 5'LTRs in HERV-K **nicht-exprimierenden** Zelllinien. *Lage der Schnittstelle* gibt die Position der Erkennungssequenz der Endonuklease in Basenpaaren in Relation zum ersten Nukleotid des 5'LTRs an.

genomische Lokalisation	Lage der Schnittstelle			HEK-293			SK-MEL-24			RA		
	<i>TauI</i>	<i>BsaAI</i>	<i>HpaII</i>	<i>TauI</i>	<i>BsaAI</i>	<i>HpaII</i>	<i>TauI</i>	<i>BsaAI</i>	<i>HpaII</i>	<i>TauI</i>	<i>BsaAI</i>	<i>HpaII</i>
1q22	304	711	854	●	●	●	●	●	●	○	●	●
1q23.3	n.v.	712	855		●	●		○	●	○	●	●
3q12	305	718	610	●	●	●	●	●	●	○	●	●
3q13	296	703	846	○	●	●	○	○	●	○	●	●
5q13	296	693	n.v.	●	○		●	○		●	●	
5q33	305	712	855	○	●	○	○	○	●	○	●	○
7p12	304	n.v.	854	●		●	○		●	○		●
11q22	304	711	854	●	○	●	●	●	●	●	●	○
12q11	304	711	854	○	●	●	●	●	●	●	●	○
22q11	304	711	854	●	●	●	●	○	●	○	●	○
Solo 7p21	304	711	854	●	●	●	○	●	●	○	●	●
Solo 19q13	304	711	854	●	●	●	○	○	○	○	●	●

n.v. nicht vorhanden ○ keine Methylierung ● leichte Methylierung ● starke Methylierung

quenzhomologien zwischen den einzelnen Proviren der Familie HERV-K(HML-2) bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur durch Resequenzierungsmethoden von cDNA-Bibliotheken einer Zelllinie möglich. Eine unveröffentlichte Analyse aktiver Proviren in der Zelllinie GH mittels Resequenzierung und Sequenzvergleich durch Büscher [2006] ergab eine hohe Sequenzanzahl für das Provirus HERV-K108. Die Verifizierung dieser Ergebnisse sollte mit Hilfe eines neuen Detektionsansatzes - der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) gegen die DNA-abhängige-RNA-Polymerase II mit anschließender real-time PCR erfolgen.

Verifizierung der transkriptionellen Aktivität von HERV-K108

Aktiv transkribierte Gene sind durch offene Promotorstrukturen gekennzeichnet, die eine Assemblierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II an den Ort der Transkriptionsinitiation ermöglichen. Daher kann der Nachweis der Protein-DNA-Interaktion zwischen der RNAP II und dem Promotor eines Gens als Marker für aktiv transkribierte Gene verwendet werden.

Die Detektion der Bindung der RNAP II an den 5'LTR von HERV-K108 erfolgte mittels ChIP gegen die RNAP II und anschließender real-time PCR mit Hilfe eines HERV-K108 spezifischen Primerpaares (FW 7p22 und REV K108 +961 siehe Tabelle C.3 auf Seite XLI). Für die Ermittlung der Rate unspezifisch präzipitierter DNA wurde eine ChIP-Reaktion mit Maus IgG-Antikörpern durchgeführt (Negativkontrolle). Zudem diente nicht-präzipitierte

4.1 Regulation der HERV-K(HML-2) Expression in humanen Melanomen

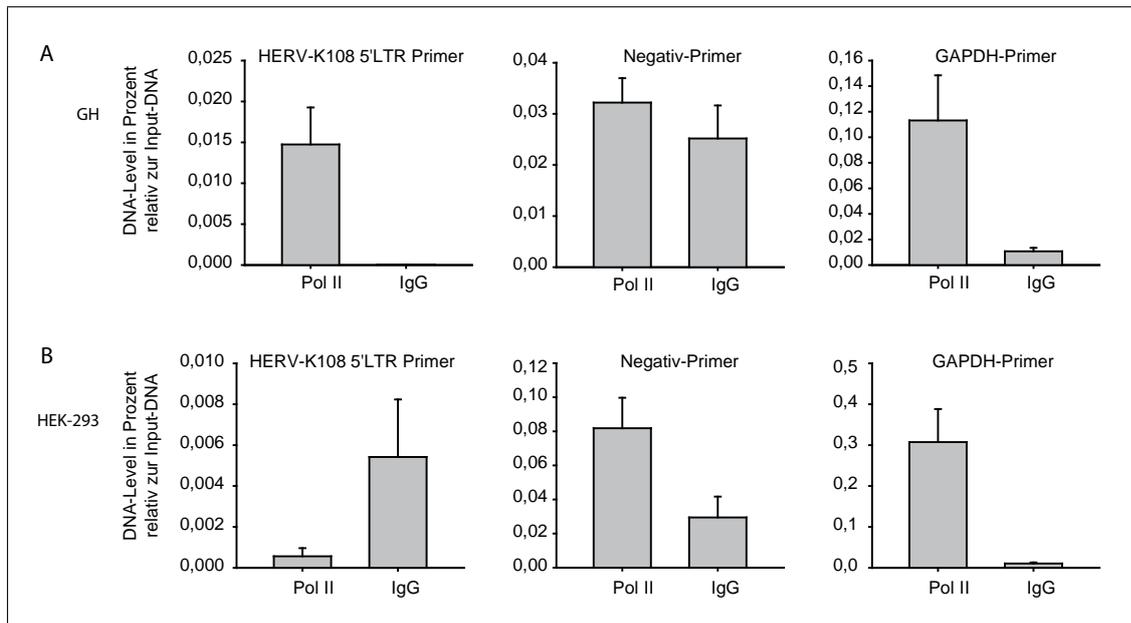


Abbildung 4.7: Verifikation der Promotor-Aktivität von HERV-K108 mittels Chromatin-Immuno-präzipitation. Die Messung der mittels Pol II-Antikörpern oder IgG-Antikörpern präzipitierten genomischen DNA von HERV-K108 (5'LTR Primer), von unspezifischen DNA-Bereichen (Negativ-Primer) und genomischer DNA von GAPDH (GAPDH-Primer) erfolgte mittels real-time PCR in Relation zu unpräzipitierter DNA (Input - entspricht dem Zahlenwert 1) für A) HERV-K exprimierende GH-Zellen und B) HERV-K nicht-exprimierende HEK-293 Zellen.

DNA der Zelllinien (Input-DNA) zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse. Die Nachweis-PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe von locuspezifischen Primern gegen den 5'LTR von HERV-K108 (Zielgen), den Promotor des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Positivkontrolle) und Primern gegen nicht kodierende Bereiche des humanen Genoms (Negativkontrolle) durchgeführt. Die Untersuchungen auf eine transkriptionelle Aktivität von HERV-K108 erfolgten in den Zelllinien GH und HEK-293.

Die Analyse der Bindung der RNAP II an den GAPDH-Promotor zeigte in GH-Zellen eine 12-fach höhere Signalstärke bei der Verwendung von RNAP II spezifischen Antikörpern für die ChIP-Reaktion als bei Verwendung von Maus-IgGs. In HEK-293 Zellen lag dieser Unterschied bei einem Faktor von 15. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Benutzung der Negativ-Primer für die Amplifikation der präzipitierten DNA kein deutlicher Unterschied beim Vergleich der Präzipitationen mit RNAP II-spezifischen Antikörpern gegenüber Maus-IgGs (GH-Zellen RNAP II/IgG=1,2; HEK-293 Zellen RNAP II/IgG=2,6). Demgegenüber konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben der RNAP II- und

den Proben der Maus-IgG-Präzipitation bei der Verwendung HERV-K108 spezifischer Oligonukleotide für die quantitative real-time PCR gemessen werden. Für GH-Zellen wurde dabei 200-mal mehr Template-DNA in der Probe der RNAP II-Präzipitation im Vergleich zur Maus-IgG Präzipitation nachgewiesen (RNAP II/IgG=200). In HEK-293 Zellen war im Vergleich dazu die Template-Menge der RNAP II-Probe gegenüber der Maus-IgG-Probe um den Faktor 3,7 verringert (RNAP II/IgG=0,27) (Abbildung 4.7).

Damit konnte gezeigt werden, dass in GH-Zellen bis zu 700-mal mehr RNAP II an den HERV-K108 LTR gebunden war als in HEK-293 Zellen und somit das Provirus HERV-K108 in GH-Zellen als aktiv und in HEK-293 Zellen als inaktiv eingestuft werden kann.

CpG-Methylierungsanalyse des HERV-K108 5'LTR mittels Bisulfit-Sequenzierung

Die Methode der Bisulfit-Sequenzierung ermöglicht eine detaillierte Betrachtung des CpG-Methylierungsgrades eines DNA-Fragments mit einer Länge von 500 bis 700 Basenpaaren. Die Analyse des CpG-Methylierungsmusters des 5'LTRs von HERV-K108 und dem angrenzenden 5'UTR (Gesamtlänge 1.100 bp) erfolgte daher mit Hilfe eines hochoptimierten Bisulfit-Sequenzierungsprotokolls (siehe Seite 56). Für die Untersuchungen wurden genomische DNA Proben der Kontrollzelllinien GH und HEK-293 sowie DNA aus humanen peripheren mononuklearen Zellen, embryonalen Stammzellen verschiedener Differenzierungsstadien und DNA der Melanomzelllinien SK-MEL-13, SK-MEL-19, SK-MEL-24, SK-MEL-28, SK-MEL-37, Schw, RA und ZD verwendet. Für jede Zelllinie wurden mindestens vier Bisulfit-behandelte DNA-Fragmente sequenziert und analysiert. Dabei konnte für die HERV-K nicht-exprimierende Kontrollzelllinie HEK-293 eine fast vollständige Methylierung aller CpG-Dinukleotide über den gesamten Untersuchungsbereich hinweg festgestellt werden. Auch die peripheren mononuklearen Zellen (HERV-K nicht-exprimierend [Büscher, 2006]) zeigten einen sehr hohen Grad an CpG-Methylierung. Lediglich der U3-Bereich des 5'LTRs offenbarte in diesen Zellen demethylierte CpG-Dubletten. Die HERV-K exprimierende Teratokarzinomzelllinie GH zeigte eine starke Demethylierung des 5'LTRs. Vereinzelt Methylierung war lediglich im U5-Bereich des LTRs und im *gag* 5'UTR zu verzeichnen. Die DNA-Proben der humanen Stammzelllinien hES 9.2 (undifferenziert und differenziert) und der undifferenzierten humanen Stammzelllinie hES I3 besaßen eine nahezu vollständige Methylierung des HERV-K108 5'LTR und 5'UTR (die genomische DNA der humanen embryonalen Stammzelllinien wurde freundlicherweise von Frau Stefanie Ter-

stegge und Herrn Dr. Oliver Brüstle vom Institut für Rekonstruktive Neurobiology, LIFE & BRAIN GmbH Cellomics Unit in Bonn zur Verfügung gestellt).

Im Vergleich dazu zeigten alle untersuchten Melanomzelllinien eine Demethylierung des 5'LTR von HERV-K108. Diese war für die HERV-K exprimierenden Zelllinien SK-MEL-13, SK-MEL-19 und SchM über den gesamten Untersuchungsbereich hinweg zu verzeichnen. Eine Ausnahme davon stellte die Zelllinie SK-MEL-28 dar. Diese war ebenfalls über den gesamten LTR-Bereich stark demethyliert, zeigte aber eine starke DNA-Methylierung im 5'UTR.

Die Melanomzelllinien SK-MEL-24, SK-MEL-37, RA und ZD (charakterisiert durch eine basale HERV-K-Expression) besaßen ebenfalls eine starke Methylierung im *gag*-5'UTR. Interessanterweise konnte für die Zelllinien SK-MEL-37 und ZD eine fast vollständige Demethylierung des LTR-Bereichs verzeichnet werden, wohingegen die Zelllinien RA und SK-MEL-24 methylierte CpG-Dubletten im R- respektive im U5-Bereich aufzeigten (Abbildung 4.8).

4.1.9 HERV-K(HML-2) Expression nach Behandlung mit 5DC und TSA

Um die Auswirkungen einer genomweiten DNA-Demethylierung auf den Grad der Expression von HERV-K zu untersuchen, wurden sowohl Zelllinien mit hoher HERV-K Expression als auch Zelllinien mit geringer HERV-K Expression mit Hilfe des demethylierenden Agens 5DC behandelt. Die Messungen der Veränderung des HERV-K mRNA-Niveaus erfolgten wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben. Für die HERV-K exprimierende Teratokarzinomzelllinie GH konnte nach 5DC-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Probe eine leichte Erhöhung der Expression von *env*, *rec* und *np9* detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte die HERV-K nicht-exprimierende Zelllinie HEK-293 eine starke Erhöhung für die mRNA-Spezies *env* und *rec* und einen leichten Anstieg der *np9* mRNA. Für die HERV-K exprimierenden Melanomzelllinien SK-MEL-13 und SK-MEL-19 wurde nach 5DC-Behandlung kein Unterschied in der Expression der viralen Spleißprodukte *env*- und *rec* festgestellt. Lediglich das *np9*-mRNA-Niveau der SK-MEL-13-Melanomzelllinie war leicht erhöht.

Im Vergleich dazu konnte für die ebenfalls HERV-K-exprimierende, aber weitgehend methylierte Zelllinie SchM eine Erhöhung der *env*- und *rec*-mRNA, jedoch keine Erhöhung des *np9*-mRNA-Niveaus verzeichnet werden.

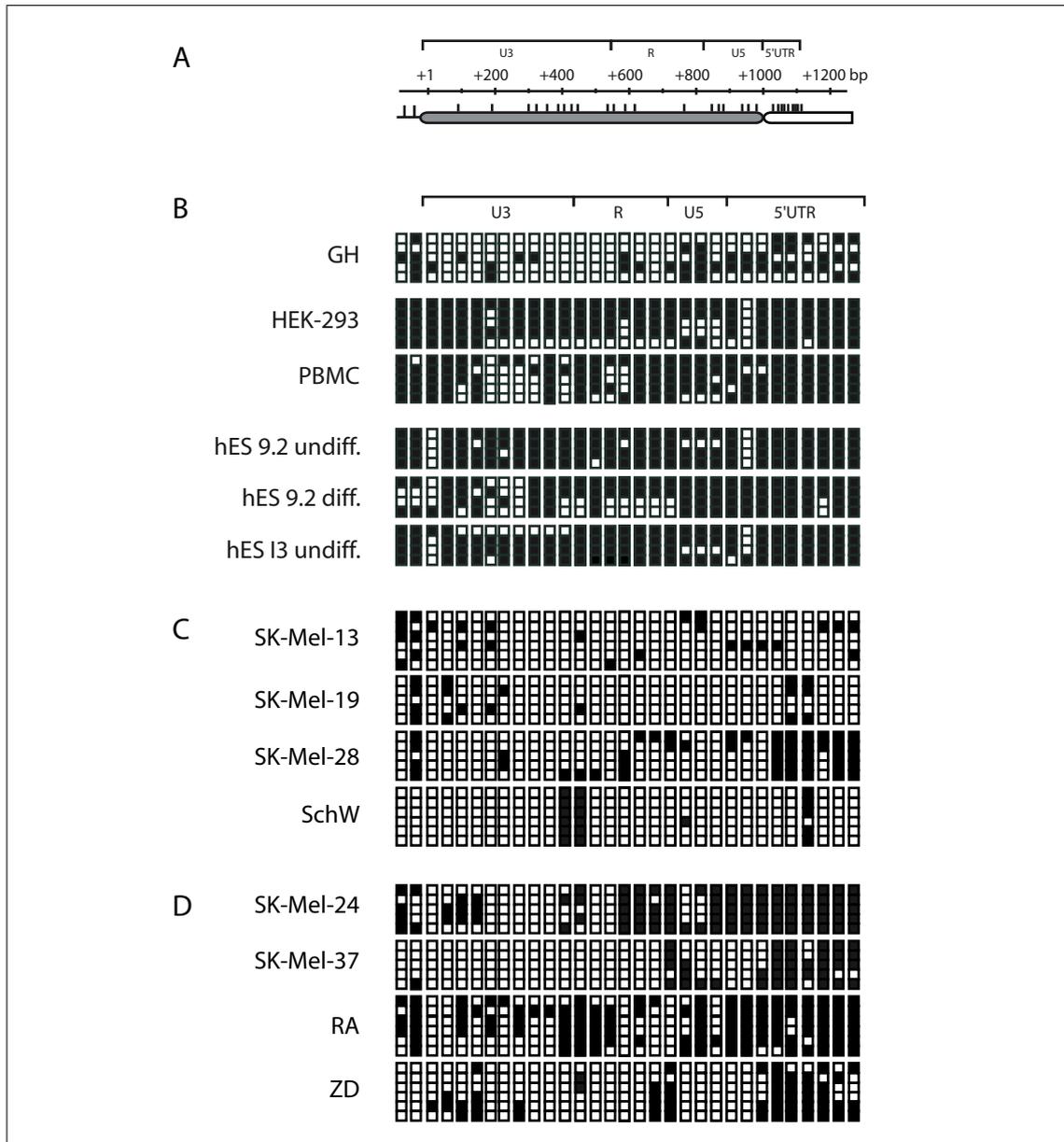


Abbildung 4.8: Bisulfit-Sequenzierung des HERV-K108 5'LTR in humanen Zelllinien. A) Schematische Darstellung des HERV-K108 5'LTRs (grau unterlegt) und dem angrenzenden 5'UTR (weiß unterlegt) mit CpG-Dinukleotiden (vertikale Linien) einem Längenmarker und der strukturellen Untergliederung der Sequenz in U3, R und U5-Bereich. B) Bisulfit-Analyse der Kontrollzellen GH, HEK-293 und humanen PBMCs und der humanen embryonalen Stammzelllinien hES 9.2 (differenziert und undifferenziert) und hES I3 (undifferenziert). C) BSS-Ergebnisse der HERV-K nicht-exprimierenden humanen Melanomzelllinien. D) BSS-Ergebnisse der HERV-K exprimierenden humanen Melanomzelllinien. Ausgefüllte Kästchen kennzeichnen methylierte CpG-Dinukleotide. Leere Kästchen kennzeichnen unmethylierte CpG-Dinukleotide.

Die Behandlung von HERV-K nicht-exprimierenden Melanomzelllinien führte zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von *env*, *rec* und *np9*. Diese fiel jedoch für die Melanomzelllinie RA im Vergleich zu den Zelllinien SK-MEL-24 und SK-MEL-37 geringer aus (siehe Tabelle 4.3).

Da die Initiation der Transkription nicht nur über Veränderungen der DNA-Methylierung, sondern auch über posttranslationale Modifikationen der Histone erfolgt, wurde in dieser Arbeit des Weiteren die Einflussnahme einer stärkeren globalen Acetylierung der Histone auf die mRNA-Synthese von HERV-K(HML-2)-Proviren untersucht. Dafür wurden die oben aufgeführten Zelllinien mit Hilfe des Histon-Deacetylaseinhibitors Trichostatin A (TSA) behandelt. Für die Kontrollzelllinie GH zeigte sich dabei kein verändertes HERV-K-Expressionsmuster. Für die Zelllinie HEK-293 konnte hingegen eine starke Erhöhung der mRNA-Spezies *rec* und eine leichte Erhöhung des *np9*-mRNA-Niveaus verzeichnet werden. Das *env*-mRNA-Niveau blieb demgegenüber relativ unverändert. Alle getesteten Melanomzelllinien zeigten keine oder lediglich eine sehr geringe Veränderung der Expression der HERV-K Spleißvarianten *env*, *rec* und *np9*.

Die Kostimulation von HEK-293 Zellen mittels 5DC und TSA offenbarten synergistische Effekte der beiden Agenzien auf die Expression von *env*, *rec* und *np9*. Besonders für die mRNA-Spezies *rec* konnte eine 277-fache Erhöhung gegenüber unbehandelten Zellen detektiert werden. Diese synergistischen Effekte wurden bei keiner anderen Zelllinien beobachtet.

4.1.10 Bestimmung der Promotoraktivität von HERV-K(HML-2) nach 5DC-Behandlung

5-Aza-2'-deoxycytidin ist ein genomweit demethylierend wirkendes Agens. Daher bestand die Möglichkeit, dass die HERV-K aktivierende Wirkung des Agens nicht auf einer Demethylierung des 5'LTRs, sondern auf einer Aktivierung von HERV-K-spezifischen Transkriptionsfaktoren beruhte. Zur näheren Charakterisierung der Wirkungsweise von 5DC auf Zelllinien mit geringer HERV-K Expression wurden diese Zellen mit dem Reportergenkonstrukt pGL3-LTR transfiziert und im Anschluss daran mit 5DC behandelt. Um die Wirksamkeit der 5DC-Behandlung zu demonstrieren, wurden, parallel zu diesem Experiment, untransfizierte Zelllinien unter gleichen Bedingungen mit 5DC oder Medium allein behandelt. Die Messung der Veränderung des *rec*-mRNA Niveaus zeigte die erfolgreiche Aktivie-

4 Ergebnisse

Tabelle 4.3: Bestimmung der HERV-K-Expression nach Behandlung mit 5DC, TSA und 5DC/TSA

Zelllinie	Behandlung	<i>env</i> -mRNA Erhöhung relativ zur Kontrolle	<i>rec</i> -mRNA Erhöhung relativ zur Kontrolle	<i>np9</i> -mRNA Erhöhung relativ zur Kontrolle
GH	unbehandelt	1,03 ± 0,32	1,02 ± 0,22	1 ± 0,06
	5DC	2,15 ± 0,28	1,78 ± 0,26	1,52 ± 0,45
	TSA	1,2 ± 0,11	0,92 ± 0,06	0,93 ± 0,06
	5DC/TSA	2,62 ± 0,12	1,02 ± 0,19	0,91 ± 0,06
HEK-293	unbehandelt	1,05 ± 0,43	1,3 ± 1,04	1,01 ± 0,15
	5DC	7,97 ± 2,40	33,27 ± 7,94	1,82 ± 0,23
	TSA	1,42 ± 0,58	6,98 ± 5,42	1,96 ± 0,57
	5DC/TSA	40,6 ± 6,59	277,81 ± 36,44	5,66 ± 2,45
SK-MEL-13	unbehandelt	1 ± 0,01	1,01 ± 0,16	1 ± 0,05
	5DC	1,01 ± 0,21	1,15 ± 0,11	1,65 ± 0,10
	TSA	0,79 ± 0,07	0,92 ± 0,13	1,54 ± 0,30
	5DC/TSA	0,78 ± 0,21	1,02 ± 0,11	1,41 ± 0,53
SK-MEL-19	unbehandelt	1 ± 0,08	1,01 ± 0,12	1 ± 0,09
	5DC	1,07 ± 0,06	1,4 ± 0,07	0,85 ± 0,14
	TSA	1,31 ± 0,05	1,74 ± 0,15	0,9 ± 0,05
	5DC/TSA	1,23 ± 0,05	1,82 ± 0,13	1,1 ± 0,20
SchM	unbehandelt	1 ± 0,09	1,64 ± 1,55	1,02 ± 0,22
	5DC	3,21 ± 0,44	5,92 ± 1,40	1,1 ± 0,27
	TSA	0,86 ± 0,19	1,79 ± 0,51	0,46 ± 0,15
	5DC/TSA	1,94 ± 0,21	3,96 ± 0,48	0,69 ± 0,20
SK-MEL-24	unbehandelt	1,16 ± 0,84	1,02 ± 0,24	1 ± 0,11
	5DC	77,36 ± 13,30	146,46 ± 25,29	3,28 ± 0,60
	TSA	5,7 ± 4,49	3,86 ± 2,61	1,31 ± 0,31
	5DC/TSA	35,67 ± 11,61	146,24 ± 15,62	5,08 ± 2,35
SK-MEL-37	unbehandelt	1,05 ± 0,46	1 ± 0,09	1,14 ± 0,64
	5DC	9,59 ± 1,15	5,15 ± 0,24	3,14 ± 1,30
	TSA	2,62 ± 0,19	0,89 ± 0,32	1,61 ± 0,27
	5DC/TSA	6,8 ± 1,35	4,81 ± 0,50	2,63 ± 0,36
RA	unbehandelt	1,04 ± 0,34	1,03 ± 0,32	1,01 ± 0,13
	5DC	2,45 ± 1,30	2,67 ± 0,33	1,74 ± 0,40
	TSA	1,88 ± 0,76	1,29 ± 0,46	1,04 ± 0,22
	5DC/TSA	4,19 ± 1,16	2,66 ± 1,08	1,05 ± 0,43

4.1 Regulation der HERV-K(HML-2) Expression in humanen Melanomen

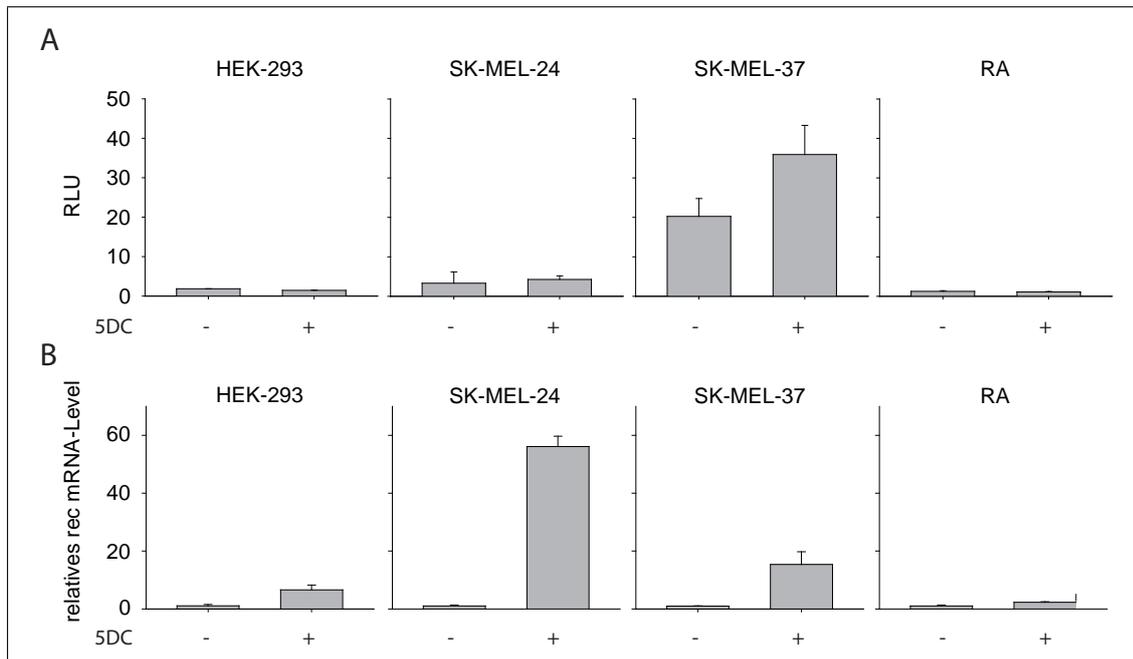


Abbildung 4.9: HERV-K-LTR-Aktivität nach 5DC-Behandlung A) Messung der Promotoraktivität des HERV-K108 5'LTRs in Zellen ohne und mit 5DC-Behandlung. B) Kontrolle der 5DC-Wirkung auf die untersuchten Zelllinien durch Messung des *rec*-mRNA-Niveaus in behandelten und unbehandelten Zellen mittels real-time PCR.

ung von HERV-K (Abbildung 4.9B). Im Gegensatz dazu konnte durch die Ermittlung der Reportergenexpression nur für die Zelllinie SK-MEL-37 eine leichte Erhöhung der LTR-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Probe festgestellt werden (zweifache Erhöhung). Diese spiegelte aber nicht die mittels real-time PCR gemessene zwölffache Erhöhung des *rec*-mRNA-Levels in SK-MEL-37 Zellen wider. Die Zelllinien HEK-293, SK-MEL-24 und RA zeigten keine Veränderung der LTR-Aktivität nach 5DC-Behandlung (Abbildung 4.9A).

4.2 Auswirkung der Rec-Expression auf das Transkriptom humaner Zellen

Die von HERV-K(HML-2) kodierten akzessorischen Proteine Rec und Np9 sind durch eine tumorspezifische Expression charakterisiert und stehen unter Verdacht, am Prozess der Tumorentwicklung beteiligt zu sein. Beispielsweise zeigte die Arbeit von Galli et al. [2005], dass *rec*-transgene Mäuse *in situ* Karzinome ausbilden, welche eine frühe Vorstufe von testikulärem Krebs darstellen. Des Weiteren ist bekannt, dass sowohl Rec als auch Np9 direkt das Promyeloisch Leukämische Zinkfingerprotein (PLZF) binden, seinen transkriptionshemmenden Einfluss auf den *MYC*-Promotor aufheben und somit die Zellproliferation aktivieren können [Denne et al., 2007]. Weitere Auswirkungen von Rec auf den zellulären Transkriptionsapparat sind nicht bekannt. Daher sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Rec auf das Transkriptom der Zelle mittels einer Affymetrix-RNA-Chipanalyse untersucht werden. Als Modellsystem wurde eine künstliche Rec-Expression in HERV-K nicht-exprimierenden HEK-293 Zellen ausgewählt.

4.2.1 Evaluation der Rec-Expression

Die Überexpression des HERV-K(HML-2) kodierten Proteins Rec erfolgte durch eine transiente Transfektion des Rec-Expressionsplasmid pCDNA3-Rec (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Norbert Bannert (Robert Koch-Institut Berlin)) in HEK-293 Zellen. Als Vergleichsprobe wurde eine Transfektion des entsprechenden Leervektors pCDNA3 durchgeführt. Sowohl der optimale Zeitpunkt der Probenahme als auch die Qualität des Expressionssystems mussten dafür in Vorversuchen bestimmt werden.

Kontrolle des Expressionssystems

Die Kontrolle der Spezifität und Funktionalität des Expressionsvektors pCDNA3-Rec erfolgte mittels transients Transfektion von HEK-293 Zellen für 72 h, anschließender Proteinextraktion und Western Blot-Analyse. Die spezifische Detektion des Proteins wurde über ein C-terminales V5-Tag-Epitop mit Hilfe von monoklonalen Anti-V5-Tag Antikörpern realisiert. Untransfizierte Zellen zeigten kein Rec-Proteinsignal, wohingegen mit Zunahme der

4.2 Auswirkung der Rec-Expression auf das Transkriptom humaner Zellen

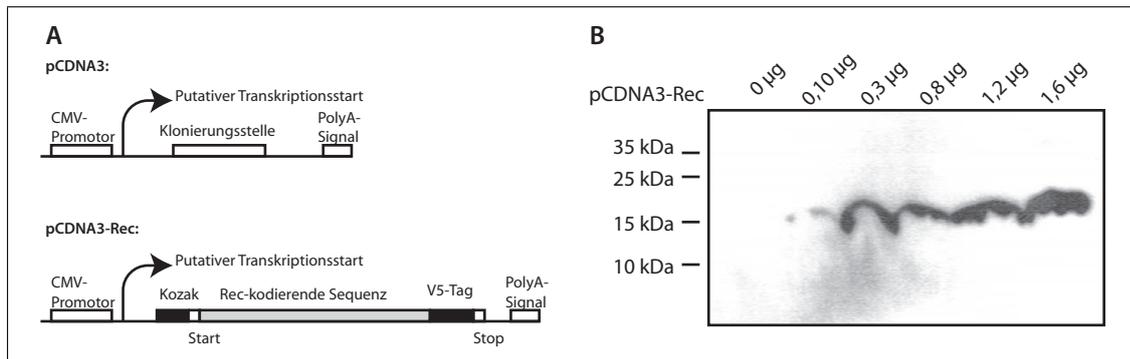


Abbildung 4.10: Rec-Expression nach transients Transfektion von pCDNA3-Rec in HEK-293 Zellen. A) Schematische Darstellung des Aufbaus der Expressionsvektoren pCDNA3 und pCDNA3-Rec. B) Nachweis der Rec-Proteinexpression nach transients Transfektion von pCDNA3-Rec in HEK-293 Zellen mittels Anti-V5-Tag-Antikörper in einer Western Blot-Analyse nach SDS-Gelelektrophorese.

für die Transfektion verwendeten pCDNA3-Rec-Plasmidmenge ansteigende Proteinsignale mit einer molekularen Größe von 15 kDa detektiert werden konnten (Abbildung 4.10).

Rec-Expression im zeitlichen Verlauf

Für die Bestimmung des Zeitpunktes der Probennahme wurden HEK-293 Zellen transient mit den Vektoren pCDNA3-Rec bzw. pCDNA3 transfiziert. Proteinproben wurden zu den Zeitpunkten t=0; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 24; 36; 48; 60 und 72 h nach der Transfektion entnommen, die Proteinkonzentrationen bestimmt, angeglichen und mittels Western Blot-Analyse auf Rec und β -Aktin-Expression untersucht. Die Menge an β -Aktin war in allen Proben nahezu identisch. Demgegenüber war eine Zunahme der Rec-Expression vom Zeitpunkt t=48 h bis t=72 h zu verzeichnen (Abbildung 4.11). Eine Rec-Expression in pCDNA3 transfizierten Zellen ließ sich zu keinem Zeitpunkt beobachten.

Die Untersuchung der Rec-Expression für Zeitpunkte $t \geq 72$ h erfolgte unter Selektionsbedingungen. Hierfür wurden HEK-293 Zellen mit den Vektoren pCDNA3-Rec bzw. pCDNA3 transfiziert und das Zellkulturmedium wurde nach 24 h mit dem Antibiotikum Geneticin (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt. Untransfizierte Zellen wurden parallel dazu ebenfalls mit genetinhaltigem Zellkulturmedium gleicher Konzentration behandelt. Die Probennahme erfolgte dabei zu den Zeitpunkten t=72; 144; 288 und 572 h. Zum Zeitpunkt t=72 h konnten in der Zellkulturschale mit untransfizierten HEK-293 Zellen keine lebenden Zellen mehr detektiert

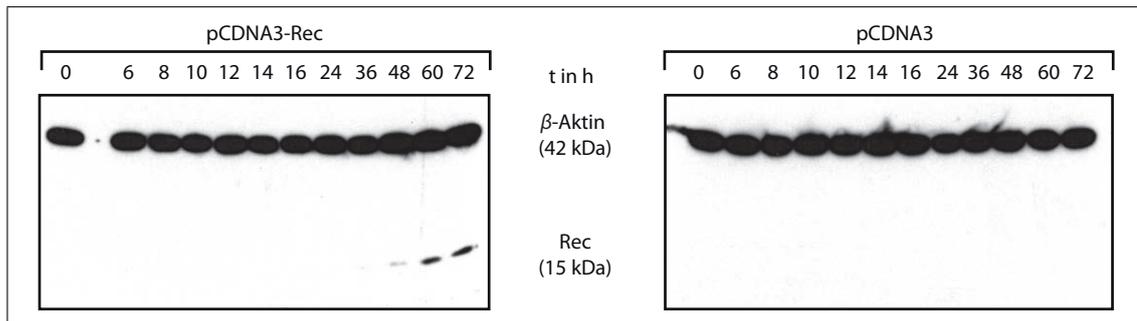


Abbildung 4.11: Rec-Expression im zeitlichen Verlauf nach transients Transfektion von pCDNA3-Rec und pCDNA3 in HEK-293 Zellen. Die Probenahme erfolgte zu den oben angegebenen Zeitpunkten nach Transfektion. Der Nachweis von β -Aktin erfolgte mittels monoklonaler β -Aktin-Antikörper und der von Rec mittels Anti-V5-Tag-Antikörper.

werden. Im Vergleich dazu wuchsen transfizierte HEK-293 Zellen unverändert (pCDNA3-Vektoren besitzen ein konstitutiv exprimiertes Geneticinresistenzgen). Die zu den oben aufgeführten Zeitpunkten entnommenen Proteinproben wurden anschließend mittels Pierce-Assay auf gleiche Proteinkonzentrationen angeglichen und mit Hilfe einer Western Blot-Analyse auf Rec-Expression untersucht. Die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde zudem mittels β -Aktin-Nachweis kontrolliert. Eine Expression des Proteins Rec war dabei in keiner der pCDNA3-Kontrollzellen nachweisbar. Demgegenüber war die Expression des 15 kDa großen Rec-Proteins zu den Zeitpunkten $t=72$; 144 und 288 h nach Transfektion feststellbar, wobei zum Zeitpunkt $t=72$ h die größte Proteinmenge detektiert werden konnte. Die Probe $t=288$ h zeigte eine bereits deutlich herabgesetzte Menge des gebildeten Proteins Rec. Zum Zeitpunkt $t=572$ h war kein Zielprotein mehr nachweisbar (Abbildung 4.12A).

4.2.2 Optimierung der Transfektionseffizienz

Die Optimierung der Transfektionseffizienz erfolgte mit Hilfe des GFP-Expressionsplasmids pmax-GFP in 12-well Zellkulturplatten wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben. Optimiert wurde hierbei das Verhältnis von DNA-Menge zu Transfektionsreagenz. Dabei wurden DNA-Mengen von 0,1; 0,3; 0,8 und 1,6 μg und Lipofectamine-Volumina von 2; 3 und 4 μl verwendet. Die Transfektionseffizienz ergab sich dabei aus dem Verhältnis transfizierter Zellen zur Gesamtzellzahl und hatte ein Maximum ($>90\%$) bei einer DNA-Menge von 0,8 μg und einem Lipofectamine-Volumen von 4 μl (Oberfläche Zellkulturschale 2 cm^2).

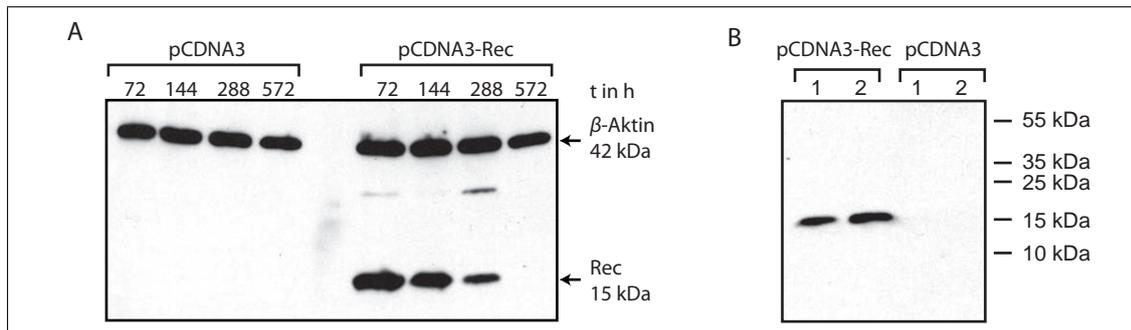


Abbildung 4.12: Western Blot-Analyse der Rec-Proteinexpression in HEK-293 Zellen. A) Rec-Expression im zeitlichen Verlauf für $t=72$ h, 144 h, 288 h und 572 h nach transienter Transfektion von pCDNA3-Rec und pCDNA3 und Geneticinselektion. Nachweis von β -Aktin mittels monoklonaler β -Aktin-Antikörper und Rec mittels Anit-V5-Tag-Antikörper B) Kontrolle der Rec-Proteinexpression in den Proben für die RNA-Chip-Hybridisierung mittels Anti-V5-Tag-Antikörper.

4.2.3 Probengewinnung für die Affymetrix-Chip-Analyse

Für die Gewinnung der Affymetrix-Chip-RNA-Proben wurden HEK-293 Zellen in T25-Flaschen in zwei unabhängigen Ansätzen unter den oben beschriebenen Transfektionsbedingungen jeweils mit dem Vektor pCDNA3-Rec und pCDNA3 transfiziert. Die Probenahme erfolgte nach 72 h. Von jeder Flasche wurde eine Protein- und eine Gesamt-RNA-Probe gewonnen. Die Kontrolle der Rec-Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot-Analyse. In beiden pCDNA3-Rec Proben konnte eine annähernd gleich starke Expression des Rec-Proteins nachgewiesen werden. Die Western Blot-Analyse der Zellen, die mit dem Vektor pCDNA3 transfiziert wurden zeigte kein Rec-Signal (Abbildung 4.12B).

Die Kontrolle der RNA-Qualität wurde mittels Bioanalyzer (Agilent) durchgeführt. Dabei konnte ein RNA-Integritätsindex von $RIN=7,8$ gemessen werden. Damit erfüllten die RNA-Proben die für die Affymetrix-Chip-Analyse notwendigen Qualitätsvoraussetzungen.

Sowohl die Herstellung der markierten Hybridisierungsproben als auch die Chip-Hybridisierung (Affymetrix Genchip U133 plus 2.0) und die Datenaufarbeitung erfolgten durch die Firma Atlas Biolabs GmbH.

4.2.4 Datenanalyse - Bestimmung der Zielgene

Die von der Firma Atlas Biolabs GmbH übermittelten Daten beinhalteten je eine Auswertungstabelle mit den Messdaten der 54.675 analysierten Oligonukleotid-Spots pro Gen-

chip. Der relative Expressionsunterschied zwischen den Proben pCDNA3-Rec und pCDNA3 wurde einzeln für jeden Genchip ermittelt. Dabei erfolgte eine Einstufung der Höhe des Expressionsunterschiedes in *Erhöht*, *Leicht-Erhöht*, *Leicht Verringert*, *Verringert* und *Unverändert*. Des Weiteren wurde die quantitative Veränderung des mRNA-Level als Log₂-Ratio angegeben und eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) für das Ergebnis der Messung des jeweiligen Spots bestimmt. Als weiteres Analysewerkzeug diente die Angabe des *Vorhandensein* oder *Fehlens* der jeweiligen mRNA-Spezies in der Untersuchungsmenge.

Deskriptive Statistik

Anzahl der veränderten Messpunkte nach Rec-Expression Die Affymetrix-Chip Auswertung der ersten Hybridisierung zeigte 4.743 unterschiedliche Spot-Signalstärken nach Rec-Expression. 2.316 Spots zeigten dabei ein erhöhtes mRNA-Level nach Rec-Expression, 275 Spots ein leicht erhöhtes mRNA-Level, 208 Oligonukleotid-Punkte ein leicht verringertes und 1.944 Punkte ein verringertes mRNA-Level. Für 49.932 Messpunkte konnte keine Veränderung festgestellt werden.

Im Vergleich dazu lag die Anzahl an differenziellen Spot-Signalstärken für den zweiten experimentellen Ansatz bei 1.001. Davon wiesen 566 Messpunkte eine erhöhtes mRNA-Level nach Rec-Expression auf, 82 Messpunkte zeigten eine leichte Erhöhung, 69 Messpunkte eine leichte Verringerung und 284 Oligonukleotid-Messpunkte eine Verringerung. Für 53.674 Spots konnte keine Veränderung der Signalstärke festgestellt werden (Abbildung 4.13).

Stärke der Änderung der Genexpression Die Stärke der mittleren Erhöhung der Genexpression betrug für den Affymetrix-Chip 1 $\bar{x}_{\text{Erhöhung}} = 2^1$. Das Maximum der Erhöhung lag bei $x_{\text{Emax}} = 2^{6,5}$ und das Minimum bei $x_{\text{Emin}} = 2^{0,2}$. Die Stärke der mittleren Verringerung der Genexpression betrug für den Affymetrix-Chip 1 $\bar{x}_{\text{Verringerung}} = 2^{-0,46}$ mit einer maximalen Verringerung von $x_{\text{Vmax}} = 2^{-3,5}$ und einer minimalen Verringerung von $x_{\text{Vmin}} = 2^{-0,1}$.

Die Stärke der mittleren Erhöhung der Genexpression betrug für den Affymetrix-Chip 2 $\bar{x}_{\text{Erhöhung}} = 2^{0,53}$. Das Maximum der Erhöhung lag bei $x_{\text{Emax}} = 2^4$ und das Minimum bei $x_{\text{Emin}} = 2^{0,1}$. Die Stärke der mittleren Verringerung der Genexpression betrug für den Affymetrix-Chip 2 $\bar{x}_{\text{Verringerung}} = 2^{-1,05}$ mit einer maximalen Verringerung von $x_{\text{Vmax}} = 2^{-4,8}$ und

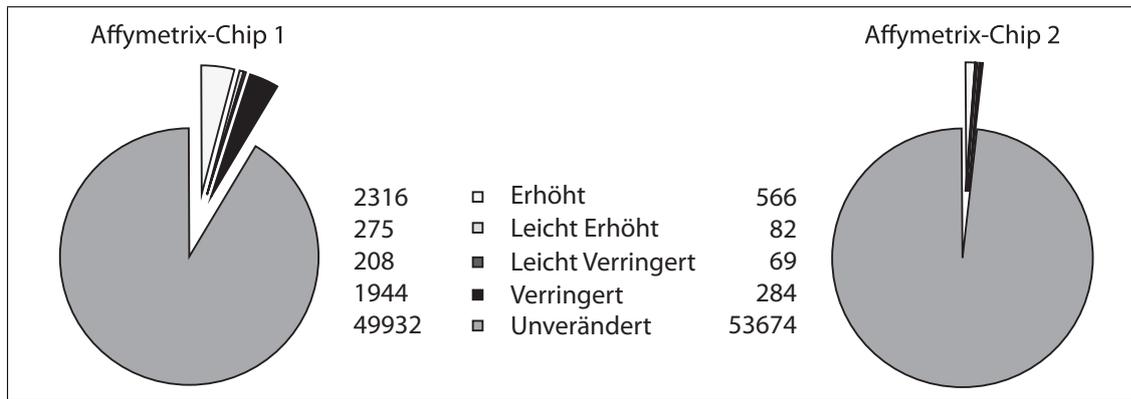


Abbildung 4.13: Häufigkeitsdarstellung der mittels Affymetrix-Genchip-Analyse ermittelten Meßpunkte mit erhöhter, leicht erhöhter, leicht verringerter, verringerter und unverändert Signalstärke nach Rec-Expression für Genchip 1 und 2.

einer minimalen Verringerung von $x_{vmin} = 2^{-0,2}$ (Abbildung 4.14).

Überschneidungsmenge Chip 1 - Chip 2 Die Auswertung der Affymetrix-Chip Daten zeigte 2.591 erhöhte/leicht-erhöhte Messpunkte für Chip 1 und 648 erhöhte/leicht-erhöhte Messpunkte für Chip 2. Der Überschneidungsbereich dieser Messpunktmengen betrug 173 Spots. Dies entspricht 6,7% von Chip 1 und 27% von Chip 2.

Für den Affymetrix-Chip 1 konnten 2.152 Messpunkte und für den Affymetrix-Chip 2 353 Messpunkte mit verringerter/leicht-verringert Signalstärke detektiert werden. Der Überschneidungsbereich dieser Messpunktmengen betrug fünf Spots. Dies entspricht 0,23% von Chip 1 und 1,4% von Chip 2 (Abbildung 4.15).

Charakterisierung der Messpunkte des Überschneidungsbereichs nach ihrer biologischer Identität Für die Charakterisierung der Messpunkte nach ihrer biologischen Identität wurden nur die Messpunkte des Überschneidungsbereichs (erhöht/leicht-erhöht und verringert/leicht-verringert) ausgewählt. Eine weitere Datenreduktion erfolgte durch die Anwendung des Selektionskriteriums *Vorhanden* für die erhöhten Messpunkte nach Rec-Expression und für die verringerten Messpunkte ohne Rec-Expression. Dabei ergaben sich für die Datenmenge der Messpunkte mit erhöhter Signalstärke 144 Einträge und für die Datenmenge der Messpunkte mit verringerter Signalstärke vier Einträge. Die Charakterisierung der biologischen Identität erfolgte im Anschluss durch Literatur- und Datenbankrecherchen. Für die Datenmenge der Messpunkte mit erhöhter Signalstärke wurden 56 bekannte Prote-

4 Ergebnisse

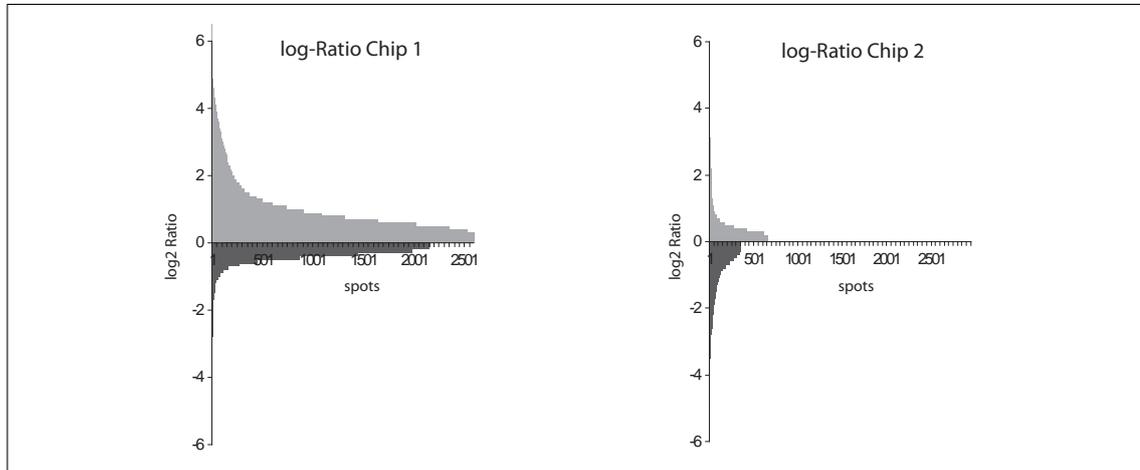


Abbildung 4.14: Stärke der Änderung der Genexpression nach Rec-Expression für Genchip 1 und 2.

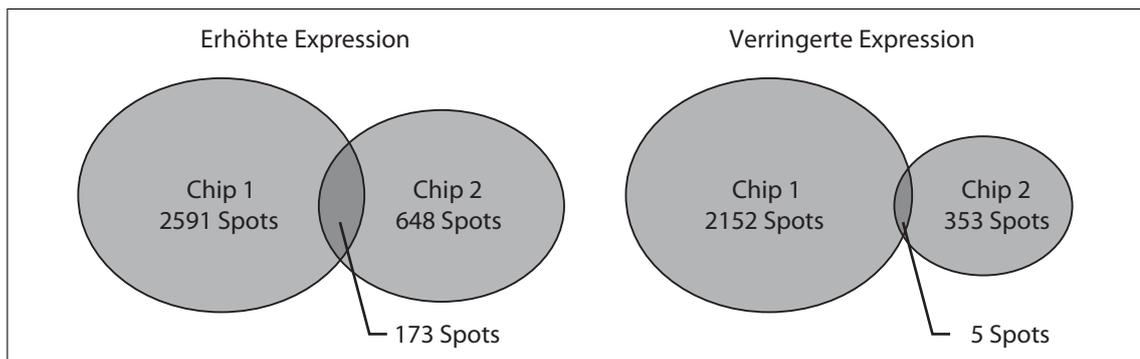


Abbildung 4.15: Überschneidungsmenge von Spots mit gleicher Tendenz der Genexpressionsveränderung des Affymetrix-Chip 1 und 2 (Proportionen nicht exakt dargestellt).

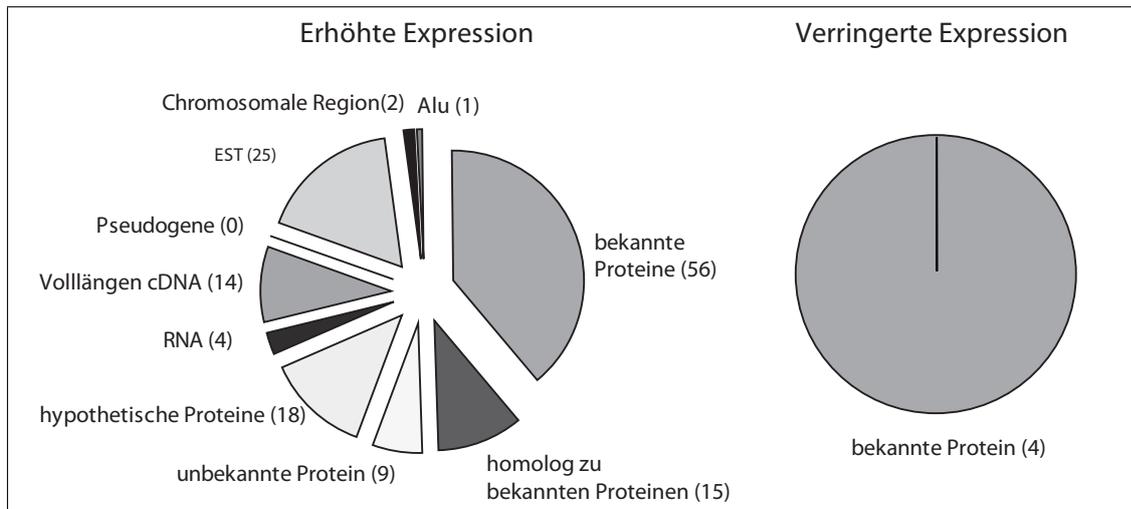


Abbildung 4.16: Bestimmung der biologischen Identität der Messpunkte mit differenziellen Signalstärken und Darstellung ihrer Häufigkeitsverteilung.

ine, 15 Proteine mit Homologien zu bekannten Proteinen, neun unbekannte Proteine, 18 hypothetische Proteine, vier RNAs, 14 Volllängen cDNAs, 25 EST-Sequenzen, zwei chromosomale Regionen und eine Alu-Sequenz ermittelt. Die Datenmenge der Messpunkte mit verringerter Signalstärke bestand aus vier bekannten Proteinen (Abbildung 4.16).

Auswahl der Zielgene des Überschneidungsbereichs

Die Bestimmung der differenziell exprimierten Gene nach Rec-Expression auf Grundlage der Affymetrix-Chipdaten erfolgte nach den folgenden Kriterien:

1. Messpunkt muss die Deklaration *erhöhte/leicht erhöhte* Signalstärke oder *verringerte/leicht verringerte* Signalstärke aufweisen
2. Messpunkt mit *erhöhter/leicht erhöhter* Signalstärke muss bei der Rec-Expressionsprobe ein Hybridisierungssignal aufweisen (*Vorhanden*)
3. Messpunkt mit *verringertes/leicht verringertes* Signalstärke muss bei der pCDNA3-Probe ein Hybridisierungssignal aufweisen (*Vorhanden*)
4. Messpunkte müssen für Chip1 und Chip2 die gleiche differenzielle Expressionstendenz (*erhöht/leicht erhöht oder verringert/leicht-verringert*) aufweisen
5. Messpunkte müssen ein bekanntes Protein/Gen repräsentieren

4 Ergebnisse

Die Filterung des Datenpools mit Hilfe der oben aufgeführten Kriterien ergab dabei eine Liste mit 60 Einträgen, wovon nach Abzug doppelter Einträge 53 differenziell exprimierte Gene erhalten werden konnten. Diesen Genen wurde mittels einer weiteren Datenbankanalyse eine biologische Funktion zugeordnet und entsprechend dieser Funktion in Tabelle 4.4 auf Seite 86 zusammengefasst. Der Hauptanteil dieser Gene besaß transkriptions- oder translationsregulatorische Funktionen (30%). Daneben entfielen 17 Prozent auf humane Spleißfaktoren und weitere 13 Prozent auf Signaltransduktionsproteine. RNA-Bindeproteine, wie beispielsweise die zwei paraloge Gene MDA5 und RIG-I, stellten 7,5 Prozent der differenziell regulierten Gene nach Rec-Expression dar. Fünf Prozent entfielen auf Gene des Ubiquitin-Proteindegradationsnetzwerks. 23 Prozent der differenziell regulierten Gene konnten keiner übergeordneten Kategorie zugewiesen werden. Diese Gene wurden unter Sonstiges zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Differenziell exprimierte Gene Kombination Chip 1 und Chip 2

Gen Name	Funktion	log2-Ratio	
		Chip1	Chip2
Transkriptions-/Translationsfaktoren:			
Histone Deacetylase 3 (<i>HDAC3</i>)	Nukleosommodifikation	1,8	0,9
SRY-box 30 (<i>SOX30</i>)	Transkriptionsfaktor	1,4	0,6
v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog	Transkriptionsfaktor	1,2	0,5
Activating transcription factor 3 (<i>ATF3</i>)	Transkriptionsfaktor	1,1	0,4
Embryonic ectoderm development protein	Transkriptionsfaktor	1,0	0,6
Homo sapiens, zinc finger protein 256	Transkriptionsfaktor	0,8	0,6
Interferon regulatory factor 7 (<i>IRF7</i>)	Transkriptionsfaktor	0,8	0,5
Weakly similar to S47072 finger protein HZF10	Transkriptionsfaktor	0,8	0,3
RNA polymerase I transcription factor RRN3	Transkriptionsfaktor	0,7	0,3
TBP-binding (negative cofactor 2)	Transkriptionsfaktor	0,7	0,3
Zinc finger protein (<i>ZNF91</i>)	Transkriptionsfaktor	0,6	0,4
DNA directed RNAP II polypeptide J-related gene	Transkriptionsfaktor	0,6	0,4
Zinc finger protein 195 (<i>ZNF195</i>)	Transkriptionsfaktor	0,5	0,3
Zinc finger protein 24 (<i>KOX17</i>)	Transkriptionsfaktor	0,4	0,4
CpG island-associated gene (<i>BRD2</i>)	Transkriptionsfaktor	0,4	0,3
Eukaryotic translation initiation factor 5 (<i>EIF-5A</i>)	Translationsfaktor	0,4	0,3

Spleißfaktoren:

4.2 Auswirkung der Rec-Expression auf das Transkriptom humaner Zellen

Splicing factor prolineglutamine rich	Spleißen	1,4	0,4
Cyclin L1 β	Spleißen	0,9	0,5
hnRNP-Q	RNA Bindung	0,7	0,4
hnRNP-H1 (H)	Spleißen	0,7	0,3
hnRNP-A1	Spleißen	0,6	0,4
Pinin	Spleißen	0,6	0,3
Splicing factor, arginineserine-rich 7 (<i>SF-9G8</i>)	Spleißen	0,5	0,7
PTB-associated splicing factor <i>FOX2</i>	RNA Bindung	0,5	0,3
CRE-associated protein 1 (<i>LUC7A</i>)	Spleißen	0,3	0,5

RNA Bindeproteine:

Homo sapiens RNA helicase (RIG-I)	RNA Helikase	1,2	0,3
RNA helicase-DEAD box protein 116 (<i>MDA5</i>)	RNA Helikase	0,6	0,3
RNA-binding protein TIA-1 (<i>TIA-1</i>)	RNA Bindung	0,9	0,5
Nuclear factor of activated T-cells (<i>NFAR</i>)	RNA Bindung	0,7	0,3

Signaltransduktion:

Human MAP kinase kinase MEK5c	Signaltransduktion	1,4	1,1
Highly similar to protein kinase A anchoring protein	Signaltransduktion	1,0	0,5
Transient receptor protein 1 (<i>Trp1</i>)	Signaltransduktion	0,9	0,5
Homo sapiens C-type lectin	Signaltransduktion	0,7	0,8
G protein, beta polypeptide 2-like 1	Signaltransduktion	0,5	0,2
Receptor Tyrosine Kinase	Signaltransduktion	-0,2	-0,3
Tyrosine Protein Kinase	Signaltransduktion	-0,4	-0,3

Proteindegratation

Interferon-stimulated protein (<i>ISG15</i>)	Ubiquitinähnliche Funktion	0,8	0,4
Ubiquitin specific protease 1	Deubiquitinierung	0,5	0,3
UBX domain-containing 1	Proteindegratation	0,4	0,4

Sonstiges

Topoisomerase (DNA) I	DNA-Modifikation	1,4	0,7
mRNA containing U19H snoRNA	Katalytische RNA	1,3	0,3
Chondroitin sulfate proteoglycan 6	Zellzyklus	1,1	0,6
Epithelial protein lost in neoplasm beta	Sonstiges	0,9	0,6

4 Ergebnisse

Myosin phosphatase, target subunit 1	Sonstiges	0,9	0,3
PMCH	Hormon	0,9	0,4
Natural killer-tumor recognition sequence	erleichtert NK-Zielerkennung	0,9	0,5
Cystathionase	Enzym	0,7	0,7
CYP3A5	Enzym/Drug-Metabolismus	0,7	0,6
Phosphatidic acid phosphatase type 2A	Enzym	0,7	0,5
Metallothionein 1X	Enzym	-0,4	-0,4
Integrin alpha chain, alpha 6	Integrin	-0,5	-0,3
Crystallin, beta B2	Strukturprotein/Linse	0,5	0,6
Growth arrest specific transcript 5	snoRNA	0,5	0,2

Zielgene Affymetrix-Chip 1

Da die RNA-Proben der ersten Chip-Hybridisierung eine deutlich stärkere Antwort auf die Erhöhte Expression von Rec zeigten als die RNA-Proben der zweiten Chip-Hybridisierung, wurde zudem eine Liste an Genen erstellt, welche bei der Analyse des Affymetrix-Chip 1 *Erhöht*, *Leicht-Erhöht*, *Verringert* oder *Leicht-Verringert* waren. Ferner mussten diese Gene die Voraussetzung erfüllen, bei einem erhöhten Auftreten in der pCDNA3-Rec-Probe bzw. bei einer verringerten Abundanz in der pCDNA3-Probe als *Vorhanden* eingestuft zu sein (Tabelle E.1 auf Seite XLIX).

4.2.5 Kontrolle der differentiellen Expression der Zielgene mittels Real-time PCR-Analyse

Auf Grundlage der Datenanalyse der Genchip 1-Daten und des Überlappungsbereiches von Genchip 1 und Genchip 2 wurden Zielgene für eine Bestätigung der differentiellen Expression mittels real-time PCR ausgewählt und PCR-Primer gegen das 3'Ende der mRNAs entworfen. Als Matrize für die quantitative PCR-Reaktion dienten cDNA-Proben, welche mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern in einer reversen Transkriptionsreaktion aus den Gesamt-RNA-Pools der Chip-Hybridisierungen 1 und 2 sowie eines dritten Reproduktionsversuches synthetisiert wurden. Die Spezifität der PCR-Reaktionen wurde für jedes Primerpaar und jede Reaktion mittels einer Schmelzkurvenanalyse sichergestellt. Die Normalisierung der Expressionsergebnisse erfolgte gegen die Haushaltsgene β -Glucuronidase und β -Aktin (beide Gene zeigten in der Affymetrix-Chipanalyse keine Veränderung nach Rec-Expression). Die

4.2 Auswirkung der Rec-Expression auf das Transkriptom humaner Zellen

Stärke der relativen Expression des jeweiligen Gens innerhalb des pCDNA3-Rec RNA-Pools gegenüber der Stärke der Expression innerhalb des pCDNA3 RNA-Pools ist als Expressionsfaktor in Tabelle 4.5 angegeben.

Tabelle 4.5: Bestimmung des Regulationsgrades der Rec-Zielgene mittels real-time PCR. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit Hilfe der Haushaltsgene *GUSB* und *ACTB*. RNA-Pool I und RNA-Pool II entsprechen den für die Affymetrix-Chip-Analysen 1 und 2 verwendeten Gesamt-RNAs. RNA-Pool III entstammt einem Reproduktionsversuch. Erhöhte Expressionen wurden mit einem dunkelgrauen Hintergrund und verringerte Expression mit einem hellgrauen Hintergrund dargestellt.

Gen	RNA-Pool I		RNA-Pool II		RNA-Pool III	
	<i>GUSB</i>	<i>ACTB</i>	<i>GUSB</i>	<i>ACTB</i>	<i>GUSB</i>	<i>ACTB</i>
Differenziell exprimierte Gene Chip 1:						
FGF-18	2,34 ±0,08	3,20 ±1,26	2,80 ±0,12	2,34 ±0,10	1,90 ±0,40	1,68 ±0,35
MALAT	0,82 ±0,18	1,18 ±0,32	1,37 ±0,26	1,14 ±0,22	0,66 ±0,07	0,59 ±0,06
ISGF	0,82 ±0,59	3,51 ±2,84	1,20 ±0,14	1,00 ±0,11	1,12 ±0,00	1,00 ±0,00
CCL7	1,00 ±0,11	1,54 ±1,04	0,85 ±0,11	0,71 ±0,10	1,76 ±0,44	1,57 ±0,39
Differenziell exprimierte Gene Chip 1 und 2:						
SOX-30	1,64 ±0,16	1,25 ±0,08	1,82 ±0,30	1,45 ±0,21	1,40 ±0,18	1,58 ±0,20
DNA TopoI	1,16 ±0,13	0,88 ±0,08	1,22 ±0,20	0,97 ±0,14	1,18 ±0,20	1,33 ±0,23
hCAP	1,20 ±0,11	0,92 ±0,05	1,23 ±0,13	0,98 ±0,06	1,15 ±0,19	1,30 ±0,21
EED	1,36 ±0,17	1,04 ±0,05	1,60 ±0,17	1,27 ±0,06	0,95 ±0,08	1,07 ±0,09
Cyclin L1β	1,81 ±0,20	1,39 ±0,11	1,77 ±0,22	1,41 ±0,13	1,38 ±0,61	1,56 ±0,69
ZNF256	1,81 ±0,24	1,38 ±0,15	2,00 ±0,30	1,56 ±0,27	1,37 ±0,25	1,54 ±0,29
NFAR	3,64 ±0,65	2,79 ±0,45	6,90 ±3,71	5,50 ±2,91	1,05 ±0,48	1,18 ±0,54
RRN3 TIF-1	0,92 ±0,25	0,94 ±0,27	2,06 ±0,65	1,60 ±0,53	1,23 ±0,43	1,38 ±0,49
ZNF91	3,83 ±1,18	3,91 ±1,25	1,61 ±0,48	1,26 ±0,39	1,39 ±0,06	1,60 ±0,07
PSF	2,17 ±0,55	2,22 ±0,59	3,05 ±1,41	2,38 ±1,13	1,24 ±0,13	1,43 ±0,15
MDA-5	1,53 ±0,60	1,56 ±0,63	1,58 ±0,20	1,14 ±0,14	1,14 ±0,17	1,31 ±0,20
SF-9G8	0,81 ±0,49	0,83 ±0,51	1,25 ±0,15	0,91 ±0,10	1,02 ±0,26	1,17 ±0,30
FOX2	0,63 ±0,13	0,65 ±0,14	0,71 ±0,13	0,52 ±0,09	0,99 ±0,08	1,14 ±0,09
KOX17	0,99 ±0,30	1,01 ±0,32	1,53 ±0,20	1,11 ±0,14	1,33 ±0,29	1,53 ±0,33
BRD2	1,00 ±0,66	1,03 ±0,68	0,59 ±0,08	0,43 ±0,05	1,08 ±0,22	1,24 ±0,25
ATF3	2,06 ±0,60	1,63 ±0,28	2,18 ±0,20	1,58 ±0,05	1,19 ±0,05	1,36 ±0,05
DR1	2,11 ±1,46	2,15 ±0,51	1,31 ±0,17	0,95 ±0,11	0,97 ±0,18	1,11 ±0,20
hnRNP-A1	1,35 ±0,32	1,07 ±0,16	1,10 ±0,15	0,80 ±0,10	1,08 ±0,10	1,24 ±0,11
ZN195	1,43 ±0,36	1,14 ±0,10	1,52 ±0,20	1,11 ±0,14	1,82 ±0,60	2,09 ±0,68

Die mit Hilfe der real-time PCR ermittelten Unterschiede der relativen Expression der Affymetrix-Chip Zielgene können nur als gering eingestuft werden. So lag der durchschnittliche Faktor der Gene mit erhöhter Expression bei $\bar{x}_{\text{Erhöhung}} = 1,9$ und der durchschnittliche Faktor der Gene mit verringerter Expression bei $\bar{x}_{\text{Verringerung}} = 0,68$. Die maximale Erhöhung konnte für das Gen NFAR mit einem Faktor von $x_{\text{NFAR}} = 6,9 \pm 3,71$ festgestellt werden. Für den Großteil der Affymetrix-Chip-Zielgene (61%) ließ sich keine differenzielle Expres-

sion mittels real-time PCR nachweisen. Demgegenüber stehen die Gene FGF18, SOX30, ZNF256, PSF und ATF3, welche in allen drei untersuchten RNA-Proben eine differenzielle Expression nach real-time PCR-Analyse zeigten. Die Gene Cyclin L1 β , NFAR, ZNF91 und FOX2 wurden in mindestens zwei der drei RNA-Pools mittels real-time PCR als differenziell exprimiert bestätigt. Eine detaillierte Darstellung der Funktion der differenziell exprimierten Gene und deren möglicher Einfluss auf die Zelle findet sich in Kapitel 5.2.3 auf Seite 122.

4.2.6 Analyse der Einflussnahme ausgewählter Rec-Zielgene auf die Expression von HERV-K(HML-2)

Durch eine nähere Charakterisierung der Affymetrix-Zielgene hinsichtlich ihrer biologischen Funktion konnte ein enger Zusammenhang zwischen den unterschiedlich exprimierten Spleißfaktoren und Prozessen des retroviralen alternativen Spleißens hergestellt werden. So ist ein Großteil der differenziell exprimierten Spleißfaktoren in Mechanismen des zellulären, alternativen Spleißens involviert und Proteine, wie beispielsweise das heterogene nukleare Ribonukleoprotein H1 (hnRNP-H1), das heterogene nukleare Ribonukleoprotein A1(hnRNP-A1), der Spleißfaktor Arginine-Serine-reich 7 (SF-9G8) und der Spleißfaktor Proline-Glutamine-reich (PSF) sind direkt am Spleißen der retroviralen RNAs von HIV und/oder HTLV1/2 beteiligt [Black et al., 1995; Dodon et al., 2002; Schaub et al., 2007; Ropers et al., 2004; Jacquenet et al., 2005].

Für eine funktionelle Bestätigung einer möglichen Beteiligung der Proteine hnRNP-A1 und SF-9G8 am alternativen Spleißen der HERV-K(HML-2) mRNAs sollte daher der Einfluss einer Überexpression dieser Proteine auf das HERV-K mRNA-Niveau in HERV-K exprimierenden Zellen untersucht werden. Des Weiteren galt es, mittels C-terminaler mCherry-Fusionsproteine Lokalisationsstudien der Spleißfaktoren mit Rec-GFP durchzuführen.

Klonierung und Expression der Proteine hnRNP-A1 und SF-9G8

Als Grundlage für die PCR-basierte Klonierung (Primerpaare siehe Tabelle C.2) diente ein HEK-293 cDNA-Pool. Die PCR-Produkte wurden anschließend über die Schnittstellen *XhoI* und *ApaI* in die Vektoren pCDNA4B und pmCherry-N1 kloniert und die erfolgreiche Klonierung wurde mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. Die Kontrolle der CMV-

4.2 Auswirkung der Rec-Expression auf das Transkriptom humaner Zellen

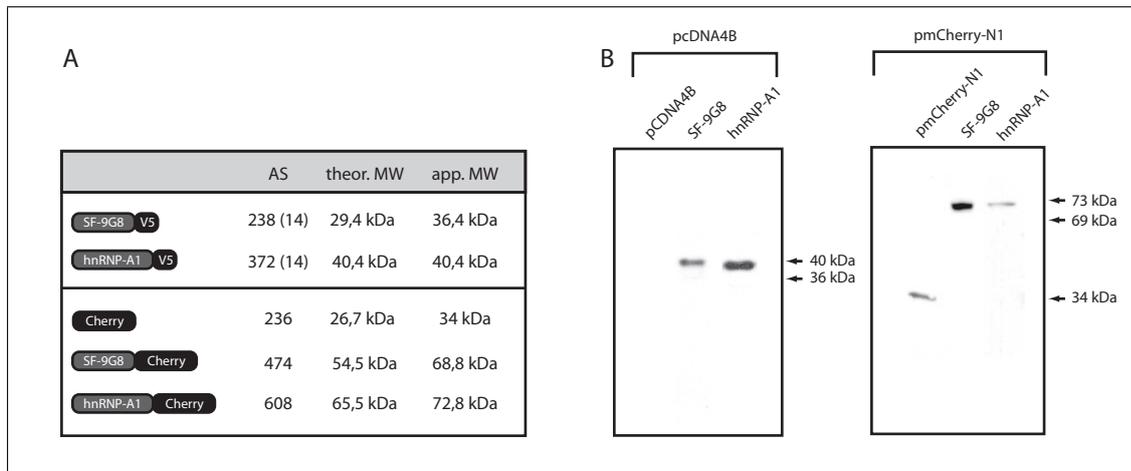


Abbildung 4.17: Expression der Spleißfaktoren SF-9G8 und hnRNP-A1 in HEK-293 Zellen. A) Schematische Darstellung der Fusionsproteine, der Anzahl der Aminosäuren (AS) (Zahlenwerte in Klammern entsprechen der Anzahl der AS für das V5-Tag), des theoretischen Molekulargewichtes (theor. MW) und des apparenten Molekulargewichtes (app. MW). B) Nachweis der V5-Tag-Fusionsproteine mit Hilfe eines Anti-V5-Tag-Antikörpers (links) und der mCherry-Fusionsproteine mittels Anti-dsRed-Antikörper(rechts).

Promotor gesteuerten Proteinexpression erfolgte in humanen Zellen mittels transients Transfektion und anschließender Western Blot-Analyse. Die Detektion der pCDNA4-Expressionsprodukte wurde dabei mit Hilfe von Anti-V5-Tag Antikörpern realisiert. Die Detektion der pmCherry-Fusionsproteine erfolgte über Anti-dsRed-Antikörper.

Die Expressionsprodukte der Expressionssysteme pCDNA4B und pmCherry-N1 konnten durch spezifische Proteinbanden in Höhe der theoretischen Molekulargewichte für hnRNP-A1 bzw. der in der Literatur beschriebenen apparenten Molekulargewichte für SF-9G8 (35 kDa [Cavaloc et al., 1994]) und Cherry (34 kDa - Herstellerangabe) nachgewiesen werden, wobei das apparente Molekulargewicht von SF-9G8 um ca. 4 kDa erhöht war (Abbildung 4.17).

Einfluss der SF-9G8- und hnRNP-A1-Expression auf das *env*-mRNA-Level von HERV-K(HML-2)

Die Untersuchung der Einflussnahme einer verstärkten Expression der Proteine SF-9G8 und hnRNP-A1 auf das mRNA-Level von HERV-K(HML-2) wurde in den HERV-K-exprimierenden Zelllinien GH und SK-MEL-19 durchgeführt. Nach 72-stündiger transients Transfektion der pCDNA4B-Expressionskonstrukte wurde das mRNA-Level der Spleißva-

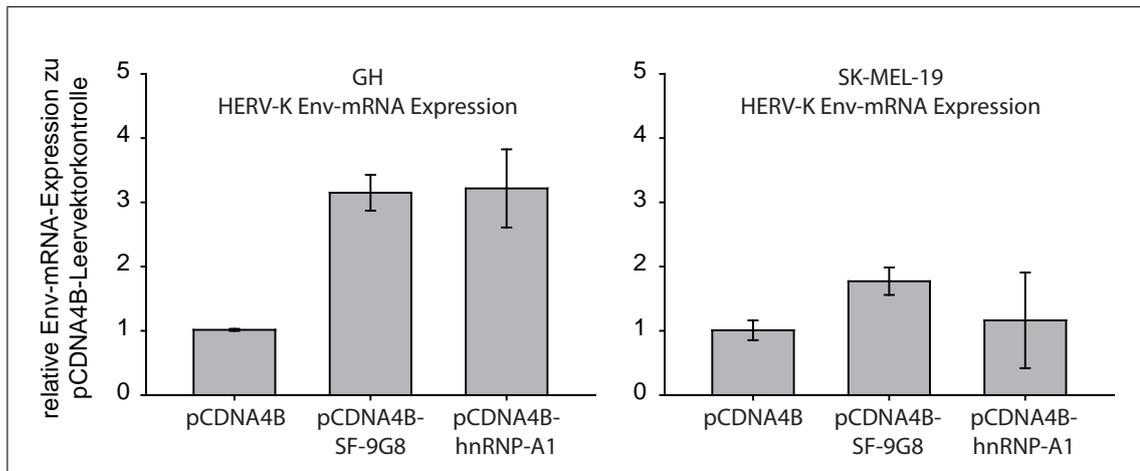


Abbildung 4.18: Einfluss der Spleißfaktoren SF-9G8 und hnRNP-A1 auf das HERV-K *env*-mRNA-Niveau. Die relative Quantifizierung des *env*-mRNA-Niveaus erfolgte mittels SYBR-Green real-time PCR nach 72-stündiger Expression der humanen Spleißfaktoren SF-9G8 und hnRNP-A1 gegenüber der Leervektorkontrolle in den HERV-K exprimierenden Zelllinien GH und SK-MEL-19.

riante *env* mittels real-time RT-PCR in Relation zur Leervektorkontrolle quantifiziert.

Dabei zeigte sich, dass das Protein SF-9G8 im Vergleich zur Leervektorkontrolle in den Zelllinien GH und SK-MEL-19 eine Erhöhung des *env*-mRNA-Levels hervorrief (GH-Zellen 3-fache Erhöhung, SK-MEL-19-Zellen 1,9-fache Erhöhung). Das Protein hnRNP-A1 zeigte nur in GH-Zellen eine Erhöhung des *env*-mRNA-Niveaus um den Faktor 3, wohingegen in SK-MEL-19-Zellen keine signifikante Veränderung der *env*-Expression nach verstärkter hnRNP-A1 Expression gemessen werden konnte (Abbildung 4.18).

Lokalisation der Spleißfaktoren SF-9G8 und hnRNP-A1

Für Lokalisationsstudien der Proteine SF-9G8 und hnRNP-A1 dienten die in Kapitel 4.2.6 beschriebenen Expressionsvektoren pmCherry-N1-SF-9G8 und pmCherry-N1-hnRNP-A1, welche den jeweiligen Spleißfaktor mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry als C-terminales Fusionsprotein exprimierten. Für die Herstellung von Vergleichspräparaten kam zudem das Plasmid pmCherry-N1 zur Anwendung, welches das Protein mCherry ohne Fusionsanteil bildet. Als Rezipientenzelllinie für die transiente Transfektion der Plasmide wurde die Zelllinie HeLa-TZMbl ausgewählt. Gründe hierfür waren die gute Adhärenz und flächige Morphologie der Zellen. Die Präparate wurden nach 48-stündiger Inkubationszeit fixiert und anschließend mittels konfokaler-Laserscanning-Mikroskopie (cLSM) dokumen-

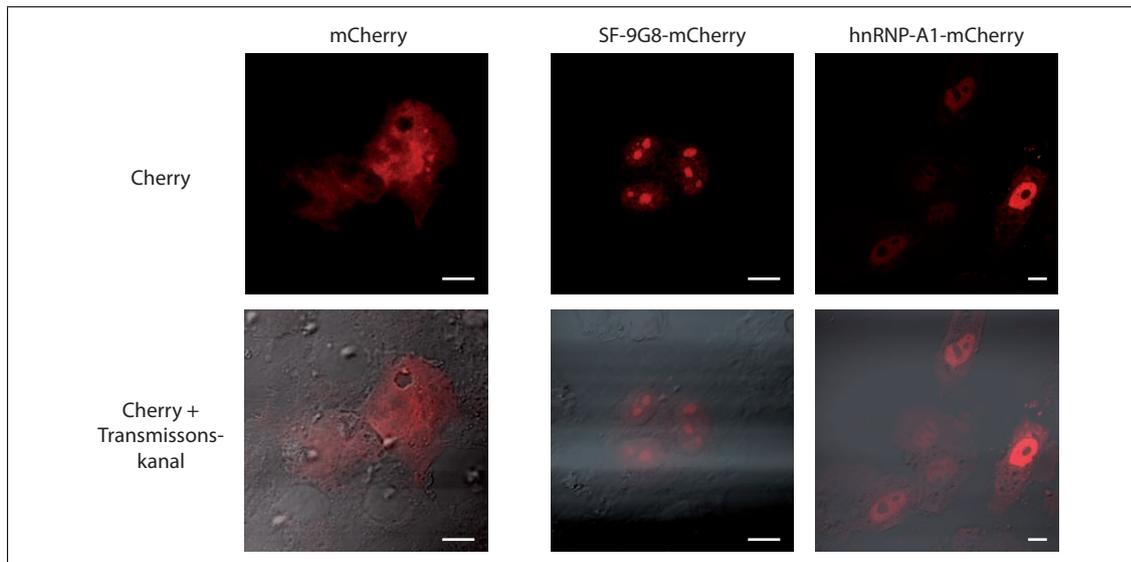


Abbildung 4.19: cLSM-Abbildung der exprimierten Spleißfaktor-mCherry-Fusionsproteine. Im oberen Teil der Abbildung sind die Aufnahmen der mCherry-Lichtemission dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sind die überlagerten Aufnahmen der mCherry-Lichtemission und des Transmissionskanals aufgezeigt. Der Längsmarker (weißer Balken) entspricht 10 μm .

tiert. Dabei zeigte sich eine diffuse Lokalisation des Proteins mCherry im gesamten Zytoplasma und im Zellkern (keine Lokalisation in den Nukleoli). Im Gegensatz dazu konnte das Fusionsprotein SF-9G8-mCherry fast ausschließlich in den Nukleoli lokalisiert werden. Deutlich schwächere Fluoreszenzsignale wurden zudem im restlichen Zellkern und im Zytoplasma der Zelle detektiert. Das Protein hnRNP-A1-mCherry ließ sich ebenfalls vorwiegend im Zellkern nachweisen. Das Protein war dabei in kleinen Vesikeln im gesamten Zellkern mit deutlicher Ausnahme der Nukleoli lokalisiert (Abbildung 4.19). Der Nachweis der Kernlokalisierung erfolgte mittels DAPI-Kernfärbung und der Aufzeichnung des Transmissionssignals (DAPI-Färbung aufgrund der schwachen Foto-Dokumentation hier nicht aufgeführt).

Klonierung und Expression der HERV-K(HML-2) Proteine Rec und Np9

Die Herstellung des Rec-GFP Expressionsvektors erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Bannert (ZBS4 - Robert Koch-Institut Berlin). Hierfür wurde die Rec-Gensequenz an die Codonbenutzung der Mammalia angepasst, um die Translationsstärke der mRNA zu erhöhen. Die Kontrolle der Expression erfolgte mittels Western Blot-Analyse durch Mit-

4 Ergebnisse

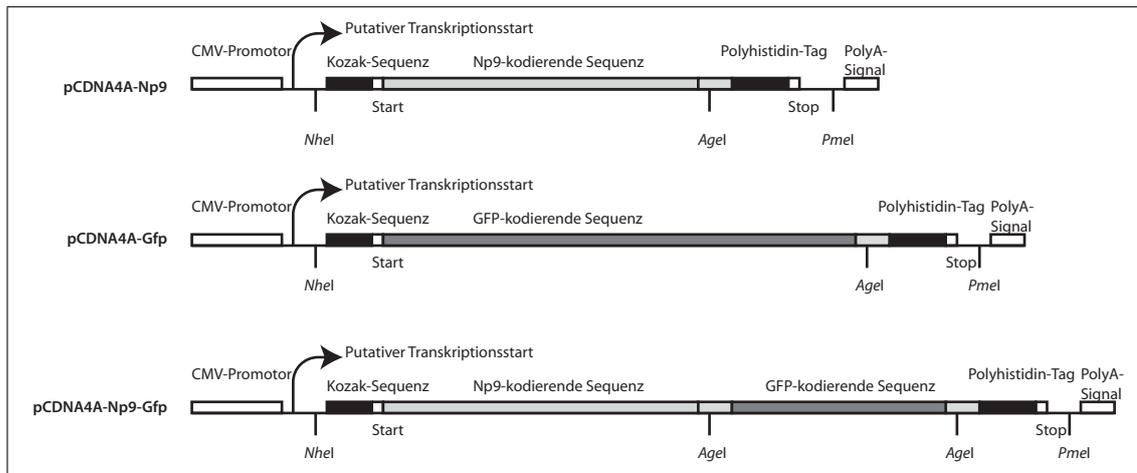


Abbildung 4.20: Schematische Übersicht der Np9, GFP und Np9-GFP Expressionvektoren. Die proteinkodierenden Sequenzen sind am 3'Ende zusätzlich mit einer, für ein Poly-Histidin-Tag kodierenden Sequenz ausgestattet, welche eine einfache Detektion der Proteine mit Hilfe von Anti-His-Tag-Antikörpern im Western Blot ermöglicht.

arbeiter der AG Bannert. Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs der Expression zeigten keine Veränderung des Fluoreszenzsignals und der Lokalisation des Proteins für die Zeitpunkte $t=12$ h; 24 h und 48 h nach Transfektion (hier nicht gezeigt).

Für die Klonierung des Np9-GFP-Fusionsproteins wurde die Np9 Aminosäuresequenz von HERV-K5q33.3 an die Codonbenutzung der Mammalia angepasst und der DNA-Doppelstrang anschließend mittels *de novo* Gensynthese hergestellt (siehe Kapitel 3.3.13). Darauf folgend konnte die *np9*-Gensequenz über die Schnittstellen *NheI* und *AgeI* in den Vektor pCDNA4A kloniert werden. Die Kontrolle der erfolgreichen *Np9*-Klonierung wurde mittels DNA-Sequenzierung realisiert. Das so erzeugte pCDNA4A-Np9-Konstrukt stand anschließend für die Klonierung des Np9-GFP-Fusionsproteins zur Verfügung. Hierfür wurde die GFP-kodierende DNA-Sequenz mittels PCR (Primerpaar GFP pVLTH siehe Tabelle C.2) aus dem Vektor pLVTHM amplifiziert und dann über die Schnittstelle *AgeI* in den Vektor eingeführt. Die Kontrolle der erfolgreichen Np9-GFP-Klonierung erfolgte ebenfalls mit Hilfe der DNA-Sequenzierung. Neben der Herstellung des Np9-GFP-Fusionsprotein-Vektors wurde zudem ein pCDNA4A-GFP-Expressionvektor für Kontrollversuche kloniert (Primer FW GFP-Kozak und REV GFP pVLTH siehe Tabelle C.2) (Abbildung 4.20).

Die Expressionskontrolle der Np9-Vektoren erfolgte in HeLa-Zellen, da neben dem Proteinnachweis mittels Western Blot-Analyse auch eine mikroskopische Kontrolle der Np9-GFP-Expression durchgeführt wurde. HeLa-Zellen wurden hierfür transient mit den Vek-

toren pCDNA4A-Np9, pCDNA4A-GFP und pCDNA4A-Np9-GFP transfiziert. Die Entnahme der Proteinproben und die Herstellung der mikroskopischen Präparate erfolgten zu den in Abbildung 4.21 angegebenen Zeitpunkten. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden mittels Pierce-Protein-Assay quantifiziert und gleiche Proteinmengen wurden aufgetragen. Die spezifische Detektion der exprimierten Proteine erfolgte über ein C-terminales Poly-Histidin-Tag mittels monoklonaler Anti-His-Antikörper. Dabei konnte keine Proteinexpression in Zellen, welche mit dem Plasmid pCDNA4A-Np9 transfiziert wurden, nachgewiesen werden. Die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins GFP war mikroskopisch nach sechs Stunden detektierbar (Daten nicht aufgeführt) und mittels Western Blot-Analyse zu den Zeitpunkten $t=12$ h und $t=24$ h mit einer Größe von 27 kDa nachweisbar. Das Fusionsprotein Np9-GFP konnte mikroskopisch nach sieben Stunden detektiert werden. Dabei veränderte sich die Lokalisation des Proteins im Verlauf der Zeit. Nach neun Stunden ließ sich eine deutliche Färbung des Zellkerns beobachten, welche zu den Zeitpunkten $t=10$ h und $t=11$ h in eine Vesikularisierung innerhalb des Kerns überging. Nach 12 bzw. 24-stündiger Transfektion nahm die Kernfärbung zugunsten der Färbung des Zytoplasmas ab und eine vesikulär erscheinende Lokalisation des Np9-GFP Proteins war nur noch in wenigen Zellen erkennbar. In der Western Blot-Analyse zeigte sich eine sehr schwache Expression des Fusionsproteins nach neun Stunden. Eine deutliche Expression des Proteins war nach zehn bzw. elf Stunden sichtbar, wobei beim Zeitpunkt $t=11$ h eine zusätzliche schwache Proteinbande auf einer Höhe von 27 kDa auftrat (entspricht der Größe des GFP-Einzelproteins). Zwölf Stunden nach Transfektion kam es zu einer Abschwächung des Np9-GFP-Signals und zu einer Verstärkung der Proteinbande bei 27 kDa. Zudem war eine weitere Proteinbande bei 32 kDa erkennbar. Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich nur noch eine sehr geringe Expression des Fusionsproteins, wohingegen die Proteinbande bei 27 kDa noch nachweisbar war. In weiteren Western Blot-Analysen konnte mit Hilfe eines Anti-GFP-Antikörpers deutlich veranschaulicht werden, dass die Bande bei 27 kDa dem GFP-Einzelproteins entsprach und die Bande bei 32 kDa ebenfalls den GFP-Proteinteil besaß.

Lokalisation der HERV-K(HML-2) Proteine Rec und Np9

Die Identifikation der Lokalisation der Proteine Rec-GFP und Np9-GFP in HeLa-TZMbl-Zellen erfolgte nach transients Transfektion der Plasmide pCDNA3-Rec-GFP (48 h) und pCDNA4A-Np9-GFP (10 h) mittels konfokaler-Laserscanning-Mikroskopie. Als Vergleichs-

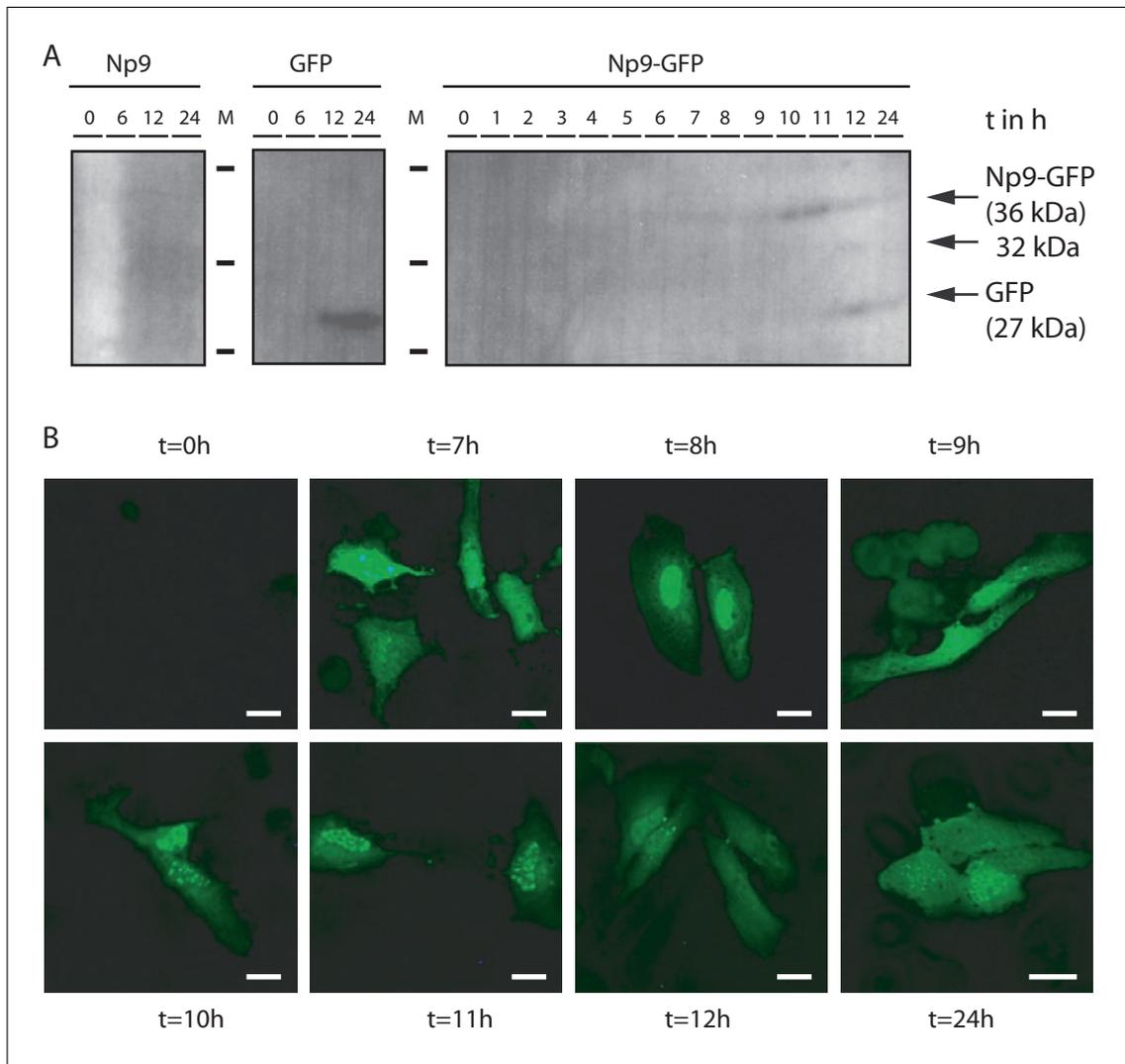


Abbildung 4.21: Untersuchung zur Expression von Np9, GFP und Np9-GFP. Nach transienter Transfektion der Plasmide pCND44A-Np9, pCND44A-GFP und pCND44A-Np9-GFP wurden im zeitlichen Verlauf Proteinproben entnommen und mikroskopische Präparate angefertigt. A) Western Blot-Analyse der Proteinproben durch den Nachweis des C-terminalen Poly-His-Tags. B) Epifluoreszenzaufnahmen der Np9-GFP exprimierenden HeLa-Zellen im zeitlichen Verlauf. Der Längenmarker (weißer Balken) entspricht 10 μ m.

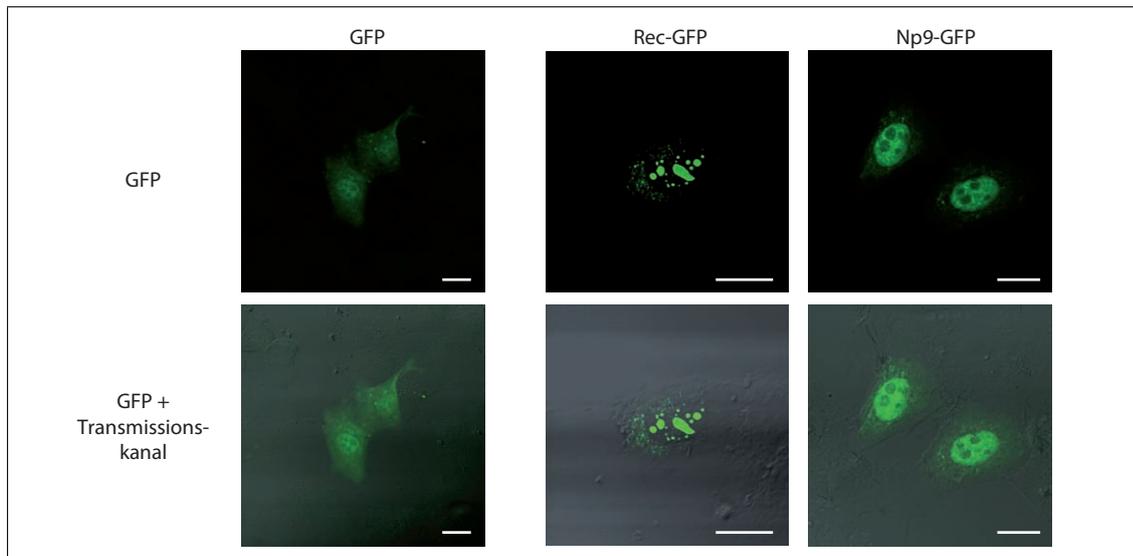


Abbildung 4.22: cLSM-Abbildung der exprimierten HERV-K(HML-2) Fusionsproteine Rec-GFP und Np9-GFP. Im oberen Teil der Abbildung sind die Aufnahmen der GFP-Lichtemission dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sind überlagerten Aufnahmen der GFP- Lichtemission und des Transmissionskanals aufgezeigt. Der Längenmarker (weißer Balken) entspricht 10 µm.

kontrolle erfolgte eine Transfektion des Plasmides pCDNA4A-GFP. Während das Protein GFP eine gleichmäßige Färbung des Zytoplasmas und des Zellkerns (Färbung der Nukleoli schwächer) hervorrief, zeigte das Fusionsprotein Rec-GFP eine deutliche Lokalisation in den Nukleoli und in kleineren subnuklearen Regionen. Des Weiteren konnten schwache zytoplasmatische Fluoreszenzsignale detektiert werden. Im Vergleich zum Fusionsprotein Rec-GFP zeigte das Protein Np9-GFP keine bzw. nur eine sehr schwache Lokalisation in den Nukleoli. Der Hauptanteil des exprimierten Proteins konnte diffus bis vesikulär im Zellkern lokalisiert gefunden werden. Auch das Np9-GFP-Protein wies eine geringe zytoplasmatische Lokalisation auf.

Kolokalisationsstudien der Proteine SF-9G8/hnRNP-A1 mit Rec/Np9

Für Kolokalisationsstudien der Spleißfaktoren SF-9G8 und hnRNP-A1 mit den Proteinen Rec und Np9 wurden die jeweiligen Expressionsplasmide in gleichen Anteilen in HeLa-TZMbl-Zellen transient transfiziert. Der Zeitpunkt der Präparatgewinnung lag für die Np9-Kolokalisationsstudie bei 10 h und für das Rec-Kolokalisationsexperiment bei 48 Stunden nach Transfektion.

Die Np9-GFP transfizierten Zellen wiesen dabei die gleiche Hauptlokalisierung des Fusionsproteins wie in den Einzeltransfektionsexperimenten auf (Zellkern, ausgenommen der Nukleoli). Der Spleißfaktor SF-9G8 war überwiegend in den Nukleoli lokalisiert, zeigte aber eine leicht diffusere Organisation als nach einer Einzelexpression. Der Spleißfaktor hnRNP-A1 konnte in der exakt gleichen zellulären Position wie in den Einzeltransfektionsexperimenten gefunden werden (Zellkern, ausgenommen der Nukleoli). Durch eine Überlagerungen der Einzelaufnahmen (Cherry/GFP) ließ sich sehr deutlich darstellen, dass das Protein Np9-GFP eine invertierte Lokalisation zu dem Spleißfaktor SF-9G8 aufweist (schwache Kolokalisation im Zytoplasma und Teilen des Kernplasmas). Demgegenüber zeigte die Überlagerung der Np9-GFP Fluoreszenzsignale mit den hnRNP-A1-Fluoreszenzsignalen eine hohe Kolokalisation innerhalb des Zellkerns. Für beide Proteine konnte eine starke Lokalisation im Kernplasma detektiert werden, wohingegen fast kein Protein in den Nukleoli nachgewiesen wurde.

Die Rec-GFP-Lokalisation zeigte sich auch im Kotransfektionsexperiment unverändert im Vergleich zur Einzeltransfektion (Hauptlokalisierung in den Nukleoli und subnuklearen Bereichen). Demgegenüber war der Spleißfaktor SF-9G8 im Kotransfektionsexperiment mit Rec-GFP deutlich diffuser lokalisiert als in der Einzelexpression. Der Hauptanteil des Proteins befand sich aber dennoch in den Nukleoli des Zellkerns. Die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale verdeutlichte eine Kolokalisation der beiden Proteine in den Nukleoli der Zelle. Für das Protein hnRNP-A1 konnte im Kotransfektionsexperiment exakt die gleiche Lokalisation wie nach Einzeltransfektion identifiziert werden (Zellkern mit Ausnahme der Nukleoli). Daher zeigte sich im Überlagerungsbild der Np9-GFP-Fluoreszenzsignale mit den hnRNP-A1-Signalen eine inverse Organisation der beiden Proteine.

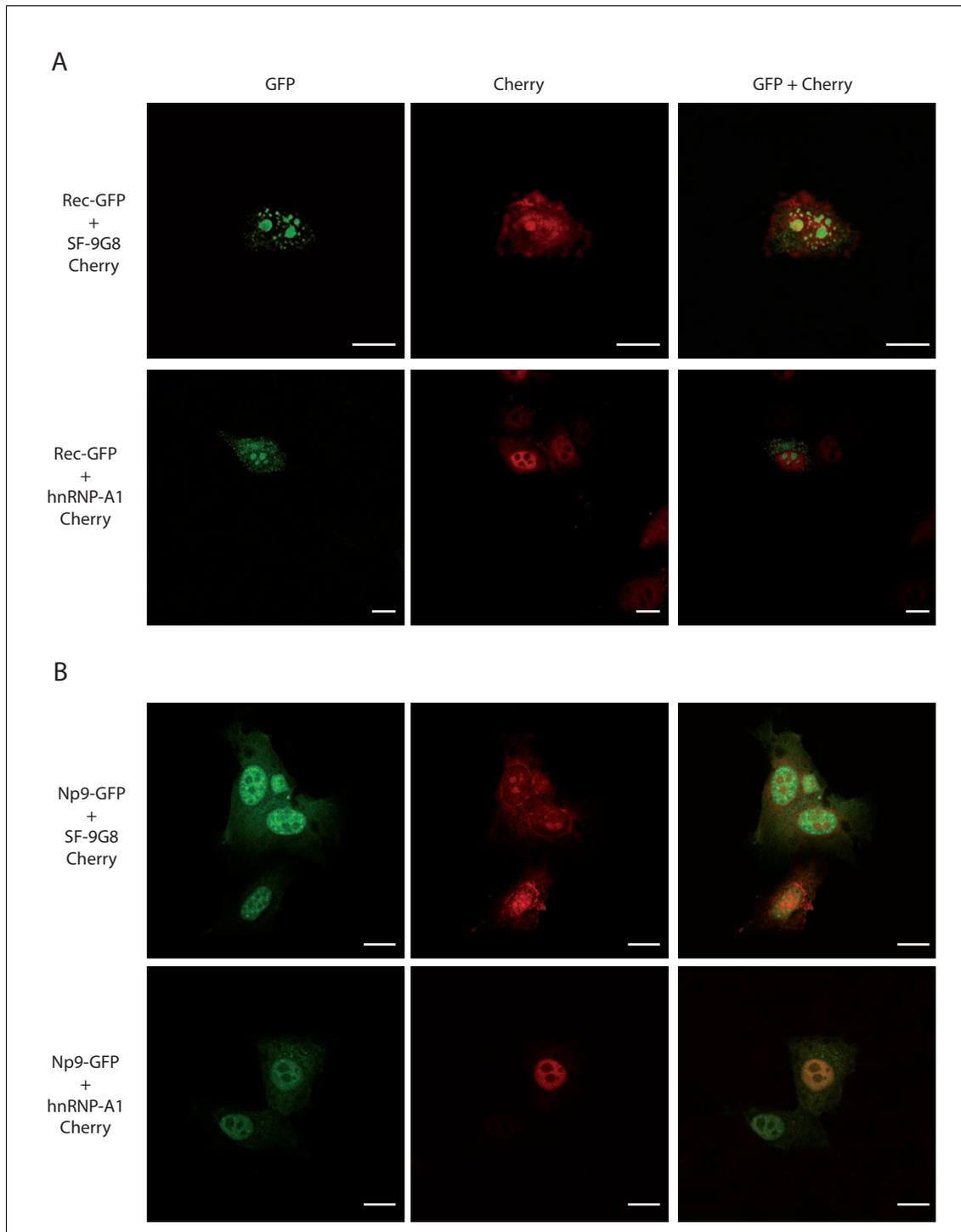


Abbildung 4.23: cLSM-Abbildung der Kotransfektion von Rec-GFP, Np9-GFP und SF-9G8-Cherry, hnRNP-A1-Cherry. Im linken Teil der Abbildung sind die Aufnahmen der GFP-Lichtemission dargestellt. Im mittleren Teil der Abbildung sind die Cherry-Lichtemissionen und im rechten Teil die überlagerten Aufnahmen der GFP- und Cherry-Lichtemission aufgezeigt. A) Expression von Rec-GFP und SF-9G8-Cherry / hnRNP-A1-Cherry B) Expression von Np9-GFP und SF-9G8-Cherry / hnRNP-A1-Cherry. Der Längenmarker (weißer Balken) entspricht 10 µm.

5 Diskussion

Das humane Genom besteht zu 7,8% aus Retrovirus-abgeleiteten LTR-Elementen [Lander et al., 2001; Venter et al., 2001]. Der Großteil dieser Sequenzen wurde dabei im Laufe der Evolution aufgrund von Mutationen, Deletionen und Rekombinationsereignissen inaktiviert. Dennoch können für einige wenige Vertreter der humanen endogenen Retroviren offene Leserahmen für virale Proteine, funktionstüchtige Promotoren und intakte Funktionselemente der Genexpressionsmaschinerie gefunden werden. Die Einflussnahme dieser retroviralen Elemente auf zelluläre Abläufe ist dabei sehr unterschiedlich. Neben der Veränderung der zellulären Genexpression (beispielsweise durch die Bereitstellung retroviraler Promotoren, Polyadenylierungssignale oder Spleißstellen) ist auch die Übernahme von viralen Proteinfunktionen durch die Zelle bekannt (Übersicht siehe Kapitel 1.3.4 auf Seite 9). Zudem werden die retroviralen Elemente und deren Genprodukte mit der Ausbildung von Krankheiten in Verbindung gebracht (Kapitel 1.3.4). Besonderes Interesse gilt hierbei den Genprodukten der jüngsten und intaktesten humanen endogenen Retrovirusfamilie K(HML-2), welche unter Verdacht stehen, ein tumorförderndes Potential zu besitzen [Boese et al., 2000a; Denne et al., 2007; Galli et al., 2005]. Die Expression von HERV-K(HML-2) lässt sich dabei im hohen Maß in Tumoren, wie beispielsweise Teratokarzinomen, humanen Brusttumoren, Nierenkarzinomen, testikulären und ovaren Tumoren sowie in Melanomen nachweisen [Büscher et al., 2005, 2006; Herbst et al., 1996, 1998; Löwer et al., 1984; Muster et al., 2003; Phelps, 1997; Wang-Johanning et al., 2003].

5.1 Regulation der humanen endogenen Retroviren

K(HML-2) in Melanomen

Von besonderem Interesse ist die Expression von HERV-K(HML-2) RNA und der viralen Proteine in humanen Melanomen. Eine von Hahn et al. [2008] durchgeführte Studie

zum serologischen Nachweis von HERV-K Antikörpern in Melanompatienten enthüllte eine Korrelation der HERV-K Expression mit dem Stadium der Erkrankung nach AJCC und eine damit verbundene potentielle Verwendung der HERV-K Expression als Marker für Melanome. Zudem zeigt die Arbeit von Serafino et al. [2009] einen HERV-K abhängigen Übergang von adhären wachsenden Melanomzellen zu nicht-adhären wachsenden Zellen, welcher mit einem erhöhten Proliferationspotential einhergeht. Für eine molekulare Charakterisierung der Ursache der HERV-K(HML-2) Expression in humanen Melanomen wurde in dieser Arbeit die transkriptionelle Regulation von HERV-K-Proviren in humanen Melanomzelllinien untersucht.

5.1.1 Etablierung von Melanom-Zelllinien für die Untersuchung der transkriptionellen Regulation von HERV-K(HML-2)

Für die Untersuchung der transkriptionellen Regulation von HERV-K(HML-2)-Proviren in Melanomen sollten HERV-K exprimierende und HERV-K nicht-exprimierende Modellzelllinien identifiziert und etabliert werden. Hierfür wurden elf humane Melanomzelllinien mittels RT-real-time PCR auf die Expression der HERV-K Spleißvarianten *env*, *rec* und *np9* untersucht und deren Expression in Relation zu den von Büscher [2006] charakterisierten Zelllinien GH und HEK-293 gesetzt.

Für fünf humane Melanomzelllinien wurden dabei HERV-K mRNA-Level ermittelt, welche auf dem Niveau der HERV-K exprimierenden Teratokarzinomzelllinie GH lagen. Diese Zelllinien wurden als HERV-K exprimierend eingestuft. Vier der elf untersuchten Melanomzelllinien zeigten hingegen keine Expression der HERV-K mRNA-Spezies *rec* und/oder *env* und für weitere zwei Zelllinien wurden HERV-K mRNA Expressionen auf dem Niveau von HEK-293 Zellen (basale HERV-K Expression) gefunden. Diese Zelllinien wurden daher als HERV-K nicht-exprimierend bewertet.

Die in dieser Arbeit detektierten HERV-K-Expressionsniveaus für die Zelllinien GH, HEK-293 und SK-MEL-28 deckten sich mit den durch Büscher [2006] ermittelten HERV-K mRNA-Quantitäten. Zudem konnten erstmals Melanomzelllinien mit HERV-K Expressionen auf dem Niveau von GH-Zellen ermittelt werden. Die durch Büscher [2006] aufgezeigten Expressionen von HERV-K in Melanomgeweben lagen mehrheitlich auf einem geringen Niveau. Jedoch konnten auch Gewebeproben identifiziert werden, welche eine Expression der humanen endogenen Retroviren K auf dem Level von SK-MEL-28 Zellen zeigten. Dies

verdeutlicht eine Verwendbarkeit der hier untersuchten Melanomzelllinien als Modellsysteme für die Untersuchung der Regulation der Expression der humanen endogenen Retroviren in humanen Melanomen. Dennoch ist eine Übertragung der Daten aus Zellkulturexperimenten auf die Situation im Tumor aufgrund unterschiedlicher Kultur- und Wachstumsmilieus nur bedingt möglich und sollte, wenn experimentell möglich, mit Hilfe von *in vivo* Experimenten verifiziert werden.

5.1.2 HERV-K(HML-2) exprimierende Zelllinien besitzen eine stark erhöhte LTR-Promotoraktivität

Die Regulation der Transkriptionsinitiation humaner Gene erfolgt zum einen über die Bereitstellung aktivierter Transkriptionsfaktoren (TFs) und zum anderen über die Zugänglichkeit der TFs und der RNA-Polymerase zum Promotor. Beide Mechanismen können dabei unabhängig voneinander oder in Kombination auf die Transkriptionsstärke des Promotors Einfluss nehmen. Beispielsweise unterliegt das Cancer/Testis Antigen *preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME)* einer rein epigenetischen Geninaktivierung über CpG-Methylierung und Histondeacetylierung in Ca-Ski-Zellen [Schenk et al., 2007], wohingegen das Tumor-Suppressorgen *INK4b (p15)* sowohl über DNA-Methylierung als auch (im Falle einer Hypomethylierung des Promotorbereichs) über das Fusionsprotein CBF β -SMMHC transkriptionell inhibiert werden kann [Markus et al., 2007]. Die Untersuchung der methylierungsunabhängigen Promotoraktivität der HERV-K 5'LTR in Melanomzellen erfolgte mit Hilfe eines Reportergenassays. Hierfür wurde ein LTR- getriebener Luziferaseexpressionsvektor transient in HERV-K exprimierende und HERV-K nicht-exprimierende Melanom- und Kontrollzelllinien transfiziert und die Promotorstärke wurde über die Höhe der Luziferaseaktivität quantifiziert. Die Messung der Grundexpression erfolgte über einen promotorfreien Luziferaseexpressionsvektor und die Messung der allgemeinen Transkriptionsstärke der Zelllinie mit Hilfe eines SV40-getriebenen Luziferaseexpressionsvektors. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine hohe LTR-Promotoraktivität nur in Zellen mit hohen HERV-K mRNA-Niveaus auftrat (Aktivität des LTR-Luziferasevektors deutlich erhöht gegenüber der Aktivität des SV-40-Kontrollvektors). Zelllinien mit einem basalen Level an HERV-K Expression wiesen demgegenüber LTR-Promotorstärken auf, welche deutlich unterhalb der Promotoraktivität des SV-40-Promotors lagen. Diese Ergebnisse verweisen auf einen hohen Regulationsgrad der Expression der HERV-K-Proviren auf der Ebene

der Transkriptionsinitiation über das Vorhandensein oder Fehlen von Transkriptionsfaktoren. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus Promotoranalysen in Teratokarzinom- und Brustkrebs-Zelllinien, welche eine Beteiligung der TF YY1, Ap-1 und Sp1 an der Initiation der HERV-K Transkription aufzeigen [Knössl et al., 1999; Kraft, 2004; Kwun et al., 2002]. Aufgrund der in diesem Experiment verwendeten unmethylierten Luziferasevektoren und der kurzen Transfektionszeiten von 60 Stunden können epigenetische Einflüsse auf die Modulation der Promotorstärke in diesem Versuchsablauf vernachlässigt werden.

5.1.3 Hohe LTR-Promotoraktivitäten sind kein allgemeines Charakteristikum von Melanomzellen

Durch das Auffinden hoher, Transkriptionsfaktor-abhängiger Promotorstärken in HERV-K exprimierenden Melanomzelllinien ergab sich die Frage, ob erhöhte Level an HERV-K transaktivierenden Faktoren ein generelles Phänomen von Melanomzellen sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurden zehn weitere humane Melanomzelllinien, welche im Vorhinein nicht auf HERV-K Expression untersucht worden waren, mit Hilfe des in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Luziferase-Reporterassays auf ihre LTR-Promotorstärke getestet. Dabei konnte für keine der untersuchten Zelllinie eine erhöhte LTR-Aktivität gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass eine hohe LTR-Promotoraktivität kein allgemeines Charakteristikum von Melanomzellen ist und wahrscheinlich erst im Verlauf der Tumorprogression aufgrund veränderter zellulärer Signalwege generiert wird. Ein Beleg hierfür findet sich beispielsweise in der Arbeit von Serafino et al. [2009]. Hierbei zeigte sich eine HERV-K Aktivierung in Melanomzellen erst nach länger andauernder Kultivierung und als Antwort der Zelle auf Stress.

Untersuchungen mit Melanomzelllinien unterschiedlicher Krankheitskategorien (AJCC I-IV) könnten in Folgeexperimenten weitere Einblicke über den Zeitpunkt und die Ursache der HERV-K Promotoraktivierung geben.

5.1.4 Die Hauptregulation der HERV-K Transkription erfolgt über einen U3-Enhancerbereich

Eukaryotische Gene sind durch hochkomplexe Promotorstrukturen gekennzeichnet, welche Bindestellen für eine Vielzahl unterschiedlicher Transkriptionsaktivatoren oder -inhibitoren

aufweisen, die im Zusammenspiel die Transkriptionsinitiation des Gens regulieren. Für eine nähere Charakterisierung des Promotoraufbaus und der Promotorbenutzung der HERV-K-Proviren wurden 5' und 3' LTR-Deletionskonstrukte erstellt und deren Aktivität in der Teratokarzinomzelllinie GH und der Melanomzelllinie SK-MEL-13 untersucht.

Die Erstellung der Promotordeletionskonstrukte erfolgte dabei unter Berücksichtigung bekannter TF-Bindesequenzen im HERV-K 5'LTR. Für die Charakterisierung des U5-Bereichs des proviralen LTRs wurde ein vollständiges LTR-Luziferasekonstrukt und ein ab Basenpaar +800 trunkierter LTR-Luziferasevektor verwendet. Dabei konnte sowohl für die Teratokarzinomzelllinie GH als auch für die Melanomzelllinie SK-MEL-13 eine deutlich höhere Luziferaseaktivität für das 3' trunkierte LTR-Luziferasekonstrukt gemessen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Funktionalität eines von Domansky et al. [2000] identifizierten und durch Ruda et al. [2004] näher charakterisierten negativen regulatorischen Elements (NRE) im Bereich von +890 bis +968bp für Melanomzellen. Dieses Element ist in einer Vielzahl von humanen Zelllinien aktiv, besitzt eine Bindestelle für ein noch unbekanntes nukleares Protein und wirkt vermutlich auf die Assemblierung und Elongation der Transkriptionsmaschinerie ein [Ruda et al., 2004].

Neben dem NRE am 3' Ende des U5-Bereichs des 5'LTRs ist ein 267 Basenpaar großer Enhancerbereich am 5'Ende des U3-Bereichs bekannt. Dieser besitzt eine putative Enhancer-Core-Sequenz bei Basenpaar +81 und ein stromaufwärts dazu gelegenes Glucocorticoid-Responseelement (GRE) [Ono, 1986]. Zudem wurde durch Knössl et al. [1999] in Tera2 und GH Zellen eine funktionelle Yin Yang 1 (YY1) Bindestelle im Bereich von +62 - +83bp identifiziert und durch Kwun et al. [2002] eine funktionelle AP-1 Bindestelle beschrieben. Beim Vergleich der Promotoraktivität der LTR-Luziferasekonstrukte +1 - +800bp und +267 - +800bp zeigte sich für den trunkierten LTR ein deutlicher Verlust der Promotorstärke von 80 Prozent für die Zelllinie GH und 75 Prozent für die Zelllinie SK-MEL-13. Somit konnte der Hauptregulationsbereich des retroviralen LTRs in Melanomzellen im U3-Enhancerbereich identifiziert werden. Aussagen über die an der Enhancerwirkung beteiligten Transkriptionsfaktoren ließen sich nicht treffen. Dennoch ist eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors YY1 wahrscheinlich, da sowohl in der Arbeit von Knössl et al. [1999] als auch in der Veröffentlichung von Kwun et al. [2002] durch Mutationen des YY1-Sequenzmotivs eine Reduktion der Promotoraktivität gemessen werden konnte. Zudem zeigten Microarraydaten ein erhöhtes Level an YY1 mRNA in SK-MEL-28 Zellen im Vergleich zu gesunder Haut [Su et al., 2004].

Die Aktivierung von HERV-K(HML-2) über die AP-1 Bindestelle ist in Tera-2 Zellen erst nach zusätzlichen Stimuli möglich (Infektion mit Herpes simplex Virus Typ 1). Mutationen der Bindestelle führten ohne zusätzliche Aktivierung zu einer 85-prozentigen Rest-Aktivität [Kwun et al., 2002]. Daher ist in GH-Zellen eher von einer YY1-Enhancerwirkung als von einer AP-1 vermittelten Transkriptionssteigerung auszugehen. Dennoch kann sowohl für GH-Zellen als auch für SK-MEL-13 Zellen die Beteiligung von AP-1 oder weiterer Transkriptionsfaktoren nicht ausgeschlossen werden.

Eine zusätzliche Deletion des U3-Bereichs um weitere 189 Basenpaare wies in keiner der untersuchten Zelllinien eine signifikante Veränderung der Promotorstärke auf. Das kürzeste LTR-Luziferasekonstrukt +616 - +800bp zeigte eine noch vorhandene, aber gegenüber dem Konstrukt +456 - +800bp verringerte Promotorleistung. Dies impliziert zum einen, dass der HERV-K Minimalpromotor im Bereich von 600 - 800bp lokalisiert ist und zum anderen die Existenz weiterer regulatorischer Elemente im Bereich von +456 - 616bp, welche sowohl in GH-Zellen als auch in SK-MEL-13 Zellen für die Initiation der Transkription verwendet werden.

Ein zusätzlich transkriptionsaktivierender Bereich wurde stromaufwärts des HERV-K108 5'LTR identifiziert (-283 - +1bp). Dieser Bereich erhöht die HERV-K Promotorstärke um den Faktor 1,5. Eine *in silico* Analyse der DNA-Sequenz auf das Vorhandensein putativer TF-Bindestellen deckte unter anderem eine zusätzliche YY1-Bindestelle auf. Die Beteiligung dieser oder anderer Bindestellen an der Regulation der HERV-K Promotorstärke kann nur durch Nachfolgeuntersuchungen geklärt werden. Generell konnte festgestellt werden, dass die Promotornutzung von HERV-K(HML-2) in der Teratokarzinomzelllinie GH und der Melanomzelllinie SK-MEL-13 sehr identisch verläuft. Der Hauptregulationsbereich lag dabei im U3-Enhancerbereich des 5'LTR.

5.1.5 DNA-Methylierung inhibiert direkt die HERV-K Promotoraktivität

Neben der Regulation der Promotorstärke humaner Gene mittels aktivierter TF spielt zudem die Zugänglichkeit der TF und der RNAP II zum Promotor eine entscheidende Rolle. Die Regulation der *Öffnung* oder *Schließung* von Promotorbereichen erfolgt dabei über Mechanismen der DNA-Methylierung und/oder Histonmodifikationen (siehe Kapitel 1.5). Retroelemente liegen in somatischen Zellen überwiegend in einem methylierten und transkriptionell inaktivierten Zustand vor [Yoder et al., 1997]. Auch die Regulation der Transkription

der HERV-K(HML-2)-Proviren in Teratokarzinomen erfolgt über DNA-Methylierung [Lavie et al., 2005].

Für die Untersuchung der methylierungsabhängigen Regulation von HERV-K(HML-2) in humanen Melanomen wurde ein HERV-K LTR-Luziferase-Reportergenkonstrukt differenziell methyliert und die Luziferaseaktivität wurde nach transienter Transfektion in HERV-K exprimierenden Melanomzelllinien gemessen. Dabei zeigte sich eine direkte Abhängigkeit der Promotorstärke vom Methylierungsgrad des 5'LTR in allen untersuchten Zelllinien. Vollständige CpG-Methylierung führte zu einem basalen Expressionsniveau auf dem Level von HERV-K nicht-exprimierenden Zelllinien. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Lavie et al. [2005], welche eine direkte methylierungsabhängige Regulation von HERV-K in der Teratokarzinomzelllinie Tera-1 aufzeigten. Da die in diesen Experimenten verwendeten Luziferasevektoren auch eine Methylierung des möglicherweise ebenfalls methylierungssensitiven Vektorrückgrates aufwiesen, wurde mittels *Patch-Methylierung* nur der LTR-Bereich des Plasmides aufmethyliert und die Promotoraktivität bestimmt. Dabei ergab sich eine deutliche Reduktion der Promotorstärke gegenüber dem unmethylierten Vergleichsvektor. Die Herabsetzung der LTR-Aktivität erreichte aber keine basalen Level. Ursache hierfür ist mit hoher Wahrscheinlichkeit eine unvollständige *in vitro* Methylierung des LTR-Fragmentes (siehe Abbildung 4.1.6). Die Ergebnisse verdeutlichen eine sehr starke direkte Abhängigkeit der HERV-K Promotorstärke vom Methylierungsgrad des LTR in Melanomzellen.

5.1.6 Erhöhte CpG-Demethylierung korreliert mit erhöhter HERV-K mRNA Expression in Melanomzelllinien

Aufgrund der direkten Abhängigkeit der LTR-Promotoraktivität vom CpG-Methylierungsgrad im Luziferaseexperiment sollte der zelluläre Methylierungsstatus der humanen endogenen Retroviren K(HML-2) in den Kontrollzelllinien GH und HEK-293, sowie in vier humanen Melanomzelllinien ermittelt werden. Für eine umfassende Analyse wurden zehn Vollängen-Proviren und zwei solo-LTRs ausgewählt und mittels methylierungssensitiver Restriktionsendonukleasen im U3, R und U5-Bereichs des 5'LTR auf CpG-Methylierung untersucht.

Interessanterweise konnten für alle Zelllinien, unabhängig vom HERV-K Expressionsprofil, unmethylierte 5'LTRs detektiert werden. Eine Ursache hierfür liegt vermutlich in

der unterschiedlichen chromosomalen Lokalisationen der untersuchten LTRs, in Verbindung mit einem zelltypspezifisch unterschiedlichen Transkriptionsstatus der den LTR umgebenden Gene bzw. des chromosomalen Abschnittes (heterochromatische DNA vs. euchromatische DNA).

Des Weiteren ließ sich feststellen, dass in den HERV-K exprimierenden Zelllinien GH und SK-MEL-13 fast alle untersuchten 5'LTRs in einem demethylierten Zustand vorlagen. Dies deutet auf eine genomweite DNA-Demethylierung, bzw. eine genomweite Demethylierung von HERV-K 5'LTRs hin. Die Ursache für globale Demethylierung kann in einer gestörten Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus liegen, beispielsweise durch einen Funktionsverlust der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) [Brenner and Fuks, 2006]. Der Verlust der Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus und globale Demethylierung sind dramatische Veränderungen für die Zelle und können zu einer verstärkten Expression von Onkogenen und zu chromosomaler Instabilität führen [Howard et al., 2008]. Dies impliziert eine mögliche Erklärung für die schlechte Prognose von Melanompatienten mit HERV-K Expression.

Eine Besonderheit dieser Experimente stellte die Zelllinie SchM dar. Diese Melanomzelllinie zeigte eine hohe Expression von HERV-K(HML-2) mRNA und eine hohe Promotoraktivität im Luziferaseassay. Dennoch konnten in dieser Zelllinie nur wenige unmethylierte HERV-K 5'LTRs identifiziert werden. Dies bedeutet zum einen, dass die hohen Niveaus an HERV-K mRNA das Resultat einer hohen transkriptionellen Aktivität der wenigen, unmethylierten HERV-K Proviren im Genom sind und zum anderen, dass die HERV-K aktivierenden Transkriptionsfaktoren keinen Einfluss auf den Methylierungsgrad stark methylierter HERV-K 5'LTRs nehmen. Die Demethylierung von HERV-K kann demnach eher als ein passiver Prozess verstanden werden, welcher vermutlich auf einen Verlust oder eine Schädigung der zellulären Mechanismen zur Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters zurückzuführen ist.

Durch eine Gesamtbetrachtung der HERV-K LTR-Methylierung in Melanomzellen konnte dennoch eine klare Korrelation zwischen geringer HERV-K Methylierung und erhöhter HERV-K Expression, bzw. hoher HERV-K Methylierung und geringer HERV-K Expression aufgezeigt werden, was die Hypothese der methylierungsabhängigen Regulation von HERV-K(HML-2) in Melanomzellen unterstreicht.

5.1.7 HERV-K108 besitzt ein differenzielles Methylierungsmuster im U5-Bereich und im 5'UTR

Für eine detaillierte Analyse des Methylierungsstatus der 5'LTR von HERV-K(HML-2) wurde das Provirus HERV-K108 mittels Bisulfit-Sequenzierung (BSS) näher untersucht. HERV-K108 wurde als Modellprovirus ausgewählt, da es in den Veröffentlichungen von Büscher [2006], Flockerzi et al. [2008] und Ruprecht et al. [2008] als aktiv transkribierter Locus beschrieben wurde. Zudem konnte in dieser Arbeit erstmals mittels Chromatin-Immunopräzipitation gegen die DNA-abhängige RNA-Polymerase II die Aktivität von HERV-K108 in GH-Zellen und die Inaktivität in HEK-293 Zellen auf dem Niveau der Transkriptionsinitiation bestätigt werden (siehe Kapitel 4.1.8). Diese Methode der Ermittlung aktiver Proviren im humanen Genom in Kombination mit Sequenzierungsanalysen der nächsten Generation könnte eine neue Möglichkeit der Analyse LTR-initiiertes mRNA-Expression in Tumoren darstellen.

Das mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung ermittelte Methylierungsmuster des 5'LTR in HEK-293 Zellen zeigte eine nahezu vollständige CpG-Methylierung des 5'LTR. Demgegenüber konnte in GH-Zellen eine deutliche Demethylierung des 5'LTRs verzeichnet werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die bereits mittels methylierungssensitiver Restriktionsendonukleasen festgestellte Korrelation zwischen Methylierung und geringer HERV-K Expression und Demethylierung und hoher HERV-K Expression. LTR-Bereiche mit selektiver Methylierung oder Demethylierung konnten für diese Zellen nicht aufgefunden werden.

Für eine Analyse des Methylierungsstatus nicht transformierter Zellen wurden DNA-Proben von HERV-K nicht-exprimierenden PBMCs und humanen embryonalen Stammzellen (Zelllinie 9.2 differenziert/undifferenziert und I3 undifferenziert) ausgewählt. Alle vier Proben zeigten einen nahezu vollständig methylierten HERV-K108 5'LTR. Retroelemente werden während der Blastozystendifferenzierung *de novo* methyliert und transkriptionell inhibiert [Yoder et al., 1997]. Humane embryonale Stammzellen entstammen der inneren Zellmasse des Blastozysten und besitzen ebenfalls einen hohen CpG-Methylierungsgrad [Jaenisch, 1997]. Daher gehen die ermittelten BSS-Ergebnisse für HERV-K(HML-2) in den untersuchten DNA-Proben einher mit der in der Literatur beschriebenen Stilllegung von Retroelementen in somatischen Zellen während der Blastozystenentwicklung.

Melanozyten entstammen den Zellen der Neuralleiste und sind somit den somatischen Abkömmlingen der inneren Zellmasse des Blastozysten zuzuordnen, welche - wie oben be-

schrieben - einer *de novo* Methylierung unterliegen [Jaenisch, 1997; Wilkie et al., 2002]. Die Untersuchung des Methylierungsgrades von HERV-K 5'LTRs mit Hilfe von methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen zeigte eine starke Methylierung in Melanomzelllinien mit geringer HERV-K Expression. Ferner konnte man in diesen Zelllinien eine tendenziell geringere Methylierung im U3-Bereich gegenüber einer stärkeren Methylierung in der R-U5-Region erkennen (siehe Tabelle 4.2). Die Analyse des Methylierungsgrades von HERV-K108 mittels BSS enthüllte eine große Anzahl unmethylierter CpG-Dinukleotide im U3- und 5'-R-Bereich des proviralen LTR. Differenzielle Methylierung konnte nur am 3'Ende des R-Bereichs sowie im U5 und 5'UTR beobachtet werden. Putative methylierungssensitive Regulationssequenzen des HERV-K 5'LTRs könnten somit nur stromabwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegen. Aufgrund des Fehlens von Enhancer-Sequenzen im U5-Bereich des LTRs (siehe Kapitel 4.1.4) ist eine Inhibition der Bindung von Transaktivatoren durch CpG-Methylierung in deren DNA-Bindesequenzen wenig wahrscheinlich. Prinzipiell besteht die Möglichkeit einer stärkeren Bindung eines Transkriptioninhibitors an das negative regulatorische Element am 3' Ende des U5-Bereiches im Falle einer CpG-Methylierung. Diese Funktionalität ist für die Gruppe der Methyl-CpG-Bindeproteine (MBD1, MBD2, MBD3 und MeCP2) beschrieben, welche bevorzugt an methylierte CpG-Konsensussequenzen binden. MeCP2 übt seinen inhibitorischen Einfluss zudem über Veränderungen der Histonmodifikationen aus, indem es als Plattform für Histondeacetylasen oder Histonmethyltransferasen fungiert und somit Promotorstrukturen in heterochromatische Komplexe umwandelt [Bird, 2002]. Inwiefern der U5-Bereich des 5'LTRs bzw. der 5'UTR eine methylierungsabhängige Regulationsfunktion ausübt, könnte Gegenstand zukünftiger Experimente sein. Die Ermittlung der Auswirkungen einer differenziellen Methylierung auf die Promotoraktivität mit der Hilfe von „Patch-Methylierungsassays“ könnte hierbei neue Erkenntnisse hinsichtlich einer direkten Beeinflussung der Methylierung auf die Transkriptionsfaktorbindefähigkeit geben. Alternativ ließe sich dieser Nachweis auch über einen „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ mit methylierten und unmethylierten Sonden führen [Smet et al., 1996].

5.1.8 Die Expression von HERV-K(HML-2) kann in Melanomzellen durch das demethylierende Agens 5DC stimuliert werden

5-aza-2'-deoxycytidin (5DC) ist ein Nukleotidanalogen, welches während der DNA-Replikation in den DNA-Tochterstrang eingebaut wird. Die Inkorporation von 5DC in den Gegenstrang eines methylierten CpG-Dinukleotides verhindert die anschließende Aufmethylierung der CpG-Dublette durch die DNA-Methyltransferase 1, wodurch es zu einem unspezifischen, genomweiten Verlust von CpG-Methylierung kommt [Christman, 2002].

Die Behandlung der Kontrollzelllinien GH und HEK-293 mit dem demethylierenden Agens 5DC führte zu einer geringen Erhöhung des HERV-K mRNA-Niveaus in GH-Zellen und zu einer starken Erhöhung in HEK-293 Zellen. GH-Zellen zeigten sich bei der Betrachtung des Methylierungsgrades der 5'LTR weitgehend unmethyliert. Die nur leichte Erhöhung des retroviralen mRNA-Levels kann daher auf eine nur geringfügige, zusätzliche Demethylierung der proviralen DNA zurückgeführt werden. Demgegenüber wies die durch einen hohen Methylierungsgrad gekennzeichnete Zelllinie HEK-293 eine hohe Stimulation der HERV-K mRNA-Expression auf. Diese erreichte aber nicht das Niveau von GH-Zellen, was sehr wahrscheinlich in einem Mangel an HERV-K aktivierenden Transkriptionsfaktoren begründet ist (siehe Kapitel 4.1.3).

Ein identisches Bild konnte für die in dieser Arbeit untersuchten Melanomzelllinien festgestellt werden. HERV-K exprimierende Melanomzelllinien, welche ein geringes Maß an LTR-Methylierung besaßen, wurden mit Hilfe einer 5DC-Behandlung nur geringfügig zur HERV-K Expression stimuliert. Im Vergleich dazu zeigten HERV-K nicht-exprimierende, methylierte Melanomzelllinien eine deutliche Steigerung der HERV-K Expression nach der Behandlung mit 5DC. Diese deutliche Expressionssteigerung konnte aber auch in diesen Zelllinien das HERV-K mRNA-Level nicht auf das Niveau der HERV-K exprimierenden Zelllinien anheben.

Die Ursache hierfür kann aber nicht in einer unvollständigen Demethylierung der 5'LTRs gefunden werden, da für den in dieser Arbeit gewählten Behandlungszeitraum (72 Stunden) von einer ca. 75-prozentigen genomweiten Demethylierung ausgegangen werden kann [Stresemann and Lyko, 2008], was zu einer minimalen Promotoraktivität von 50 Prozent gegenüber unmethylierten LTR-Fragmenten führt (Vergleich Kapitel 4.1.5). Für die Zelllinie SK-MEL-24, welche die größte Stimulation nach 5DC-Behandlung aufwies (ca. 100-fache Erhöhung gegenüber unbehandelter Zellen), konnte nach der genomweiten Demethylierung

lediglich 0,1 Prozent des *env*- und *rec*-mRNA-Levels von SK-MEL-13 Zellen nachgewiesen werden. Daher ist das deutlich erhöhte, aber im Vergleich zu SK-MEL-13 noch immer geringe HERV-K mRNA-Niveau in diesen Zellen, auf DNA-Demethylierung in Verbindung mit einem geringen Level an HERV-K transaktivierenden Faktoren zurückzuführen.

Eine Besonderheit dieser Versuchsreihe stellte die Zelllinie SchM dar. SchM ist charakterisiert durch ein hohes Level an LTR-Promotoraktivität und LTR-Methylierung. Nach der Behandlung mit 5DC wurde für diese Zelllinie im Gegensatz zu den anderen HERV-K exprimierenden Zelllinien eine deutliche Stimulation der HERV-K Expression detektiert. Dies kann auf eine Demethylierung von HERV-K 5'LTRs in Kombination mit einem hohen Niveau an HERV-K spezifischen Transkriptionsfaktoren zurückgeführt werden. Damit veranschaulichte diese Zelllinie nochmals die methylierungsabhängige Regulation von HERV-K(HML-2) in Melanomen.

5.1.9 Die Expression von HERV-K(HML-2) kann in Melanomzellen nicht durch den HDAC-Inhibitor TSA stimuliert werden

Neben der epigenetischen Regulation der Transkriptionsinitiation über DNA-Methylierung erfolgt die Modulation der Transkriptionsstärke auch über Modifikationen der Histone. Für die Untersuchung des Einflusses der Histonacetylierung auf die LTR-Promotorstärke wurde die Expressionsveränderung nach der Behandlung von humanen Zelllinien mit dem Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin A (TSA) untersucht. TSA ist eine Hydroxaminsäure, welche die Histondeacetylasen (HDAC) der Klasse I und II inhibiert. Die Inhibition von HDACs führt zu einer genomweiten Hyperacetylierung von Histonen und damit zu einer Aktivierung von Genen [Howell et al., 2009].

Die TSA-Behandlung der Zelllinie HEK-293 ergab eine deutliche Erhöhung der *rec*-mRNA-Spezies und eine leichte Erhöhung der Expression von *np9*-mRNA. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Götzinger et al. [1996], welche eine Steigerung der Gag-Proteinexpression in Tera-1 Zellen nach einer Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor N-Butyrat aufzeigten. Das mRNA-Niveau von *env* blieb relativ unverändert. Alle getesteten Melanomzelllinien zeigten keine oder lediglich eine sehr geringe Veränderung von *env*, *rec* und *np9*.

Diese Ergebnisse veranschaulichten zum einen, dass HERV-K(HML-2) Proviren potentiell über den epigenetischen Mechanismus der Histonacetylierung reguliert werden können

(siehe HEK-293 Zellen), zeigten aber andererseits, dass Hypoacetylierung in 5'LTRs von Melanomzellen entweder nicht vorhanden ist oder ihr keine regulative Rolle zukommt. Eine Untersuchung des Histonacetylierungs- und Histonmethylierungsstatus der HERV-K 5'LTRs mittels Chromatin-Immunpräzipitation könnte hierzu neue Erkenntnisse liefern.

5.1.10 5DC beeinflusst nicht das Level HERV-K-LTR-aktivierender Transkriptionsfaktoren

Aufgrund der unspezifischen und genomweiten Wirkungsweise von 5DC in humanen Zellen wurde der Einfluss einer 5DC-Behandlung auf eine potentielle Aktivierung von HERV-K-spezifischen Transkriptionsfaktoren untersucht (siehe Kapitel 4.1.10). Hierbei konnte keine zusätzliche Aktivierung der HERV-K Promotoraktivität und somit keine verstärkte Expression oder Aktivierung von HERV-K-spezifischen TF detektiert werden. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die nach 5DC-Behandlung gemessene Erhöhung der HERV-K mRNA-Expression auf eine LTR-Demethylierung zurückgeführt werden kann, was die methylierungsabhängige Regulation von HERV-K Proviren im humanen Genom unterstreicht.

5.1.11 Zusammenfassung, klinische Bedeutung und Ausblick

Die Expression von HERV-K(HML-2) wurde als ein unabhängiger Marker für eine reduzierte Überlebenschance in Melanompatienten der Krankheitsklasse I-III nach AJCC beschrieben [Hahn et al., 2008]. Die in dieser Arbeit gemessenen Expressionen von HERV-K(HML-2) in Melanomzelllinien befanden sich erstmals auf dem Niveau von Teratokarzinomen, dem Hauptexpressionsort von HERV-K(HML-2). Die Ursache für hohe Level an HERV-K mRNA in humanen Melanomzellen liegt dabei in einem zweistufigen Aktivierungsmechanismus. Zum einen bedarf es einer Erhöhung an aktivierten Transkriptionsfaktoren, welche am 5'Ende des U3-Bereichs des proviralen LTRs binden und die HERV-K-Transkription aktivieren und zum anderen ist eine Demethylierung der HERV-K 5'LTRs erforderlich, welche vermutlich auf einen Verlust der Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus durch die Zelle zurückzuführen ist. Beide Prozesse vollziehen sich nach aktuellem Kenntnisstand unabhängig voneinander. Dies bedeutet ferner, dass ein hohes Level an HERV-K mRNA in Melanomzellen wahrscheinlich keinen Marker für einen frühen

Zeitpunkt der Tumorentwicklung darstellt, sondern ein Merkmal fortgeschrittener Tumorentwicklung ist.

Aufgrund des Auffindens einer Vielzahl demethylierter 5'LTRs in HERV-K exprimierenden Melanomzellen ist für diese Zellen ein genomweiter Verlust der CpG-Methylierung von Retroelementen und zellulären CpG-Inseln wahrscheinlich. Eine globale Hypomethylierung der genomischen DNA ist mit drastischen Veränderungen der Zelle assoziiert. Eine mögliche Folge wäre die Aktivierung von methylierten Onkogenen. Dies ist beispielsweise für die Gene *Cyclin D2* und *R-Ras* in Magenkarzinomen [Nishigaki et al., 2005; Oshimo et al., 2003], für die Gene *SNCG/BCSG1* in Mammakarzinomen [Gupta et al., 2003], für *WNT5A*, *CRIP1* und *S100P* in Prostatakarzinomen [Wang et al., 2007] und für *MAGEA1* und *PRAME* in Melanomen [Schenk et al., 2007; Sigalotti et al., 2004; Smet et al., 1996] beschrieben. Zudem ist genomweite Demethylierung mit genomischer Instabilität durch eine Reaktivierung von transponierbaren Elementen verbunden [Howard et al., 2008]. Neben der für die HERV-K(HML-2) Proteine beschriebenen potentiell tumorfördernden Wirkung könnten somit auch die oben beschriebenen Mechanismen eine Ursache der schlechten Prognose in HERV-K exprimierenden Melanompatienten darstellen.

Der Methylierungsstatus von HERV-K 5'LTRs könnte zudem ebenfalls als möglicher Tumormarker verwendet werden. Die Analyse des Methylierungsstatus von im Blut zirkulierender, freier genomischer DNA aus Melanomzellen kann als prognostisches Mittel für ein Anschlagen der Therapie oder der Detektion eines Rezidives verwendet werden [Mori et al., 2005]. Hierbei könnte der repetitive Charakter der HERV-K Proviren und solo-LTRs einen zusätzlichen Sensitivitätsvorteil gegenüber Genen mit nur einer Kopie pro haploiden Genom haben.

Eine weitere klinische Bedeutung könnte der 5DC-vermittelten Stimulation der HERV-K Expression zukommen. 5DC (Decitabin) ist ein von der FDA zugelassenes Agens zur Behandlung des myelodysplastischen Syndroms. Zudem wird es als Chemotherapeutikum in klinischen Phasen erprobt [Appleton et al., 2007]. Für den Fall einer Verwendung der HERV-K-Expression als Tumormarker während und nach einer Chemotherapie mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren ergeben sich potentielle Veränderungen hinsichtlich des Expressionsmusters von HERV-K(HML-2). Vermutlich könnten wenige Tage nach Beginn der Therapie erhöhte Level an demethylierter HERV-K-DNA oder HERV-K-Antikörpern im Blut der Patienten nachgewiesen werden. Diese Antwort würde bei einer erfolgreichen Therapie im Laufe der Zeit abflachen und könnte bei einem Rezidiv erneut aufkommen.

Eine weitere interessante Fragestellung wäre, inwiefern eine HERV-K Methylierung oder Demethylierung mit dem Erfolg oder Misserfolg einer 5DC-basierten Chemotherapie korreliert. Möglicherweise zeigen Patienten mit demethylierten HERV-K Proviren (in den Tumorzellen) keine Respons gegenüber 5DC aufgrund einer bereits vorliegenden globalen Demethylierung. Eine Vorabuntersuchung auf HERV-K-Methylierung könnte damit einen möglichen Behandlungserfolg prognostizieren und einen potentiellen Einsatz des Chemotherapeutikums und der damit verbundenen Nebenwirkungen in Patienten mit einer geringen Responswahrscheinlichkeit ausschließen.

Die in dieser Arbeit auf molekularer Ebene aufgezeigte tumorspezifische Expression von HERV-K(HML-2) und die in einigen Melanompatienten aufgefundene humorale Immunantwort gegen die HERV-K Proteine Gag und Env [Büscher et al., 2005; Hahn et al., 2008] verdeutlichen eine potentielle Verwendbarkeit dieser Proteine als tumorspezifische Antigene in der Krebs-Immunotherapie. Hierbei könnte beispielsweise in HERV-K exprimierenden Melanompatienten mittels einer Expressionsvektor-basierten GeneGun-Immunisierung, AAV- oder Foamyvirus-Applikation eine zellvermittelte Immunantwort gegen die Proteine der endogenen Retroviren eingeleitet werden und somit zu einer Tumorreduktion beitragen.

Nicht zuletzt bedarf es einer weiteren intensiven Erforschung der zellulären Veränderung nach einer Reaktivierung der humanen endogenen Retroviren in Tumorzellen oder in gesunden Geweben. Mögliche Eingriffe der viralen Proteine in zelluläre Signalwege oder Veränderungen des Transkriptoms könnten neue Ansätze für die Entwicklung anti-tumoraler Wirkstoffe liefern.

5.2 Auswirkung der Rec-Expression auf das Transkriptom humaner Zellen

Die Expression retroviraler Proteine kann über die Wechselwirkungen der viralen Genprodukte mit zellulären Faktoren zu Veränderungen innerhalb der Wirtszelle führen. Diese Veränderungen betreffen beispielsweise den Zellzyklus [Kundu et al., 1998; Poon et al., 1998], die Zellmorphologie [Lifson et al., 1986], die Funktion des angeborenen Immunsystems [Baca et al., 1994], die Expression von Oberflächenproteinen oder die Regulation der Transkriptions- und Translationsmaschinerie [Emerman and Malim, 1998]. Die Modifikationen der zellulären Abläufe durch virale Faktoren können dabei auch mit der Ausbildung

pathologischer Veränderungen einhergehen (siehe Kapitel 1.3.4).

Das HERV-K(HML-2)-kodierte Protein Rec ist ein RNA-Bindeprotein, welches am Export ungespleißter, viraler mRNA aus dem Kern beteiligt ist [Boese et al., 2000b]. Zudem interagiert Rec mit dem zellulären Transkriptionsfaktor Promyelozytisches Leukämie Zinkfinger Protein (PLZF) und besitzt ein zelltransformierendes Potential [Boese et al., 2000a]. *Rec*-transgene Mäuse zeigen eine gestörte Keimzellentwicklung und neigen zur Ausbildung von *in situ* Karzinomen, einem frühen Marker für testikulären Krebs [Galli et al., 2005]. Die Arbeit von Denne et al. [2007] enthüllte des Weiteren, dass Rec den transkriptionshemmenden Einfluss von PLZF aufheben und damit die PLZF-vermittelte Inhibition des *MYC*-Promotors herabsetzen kann.

Für die Ermittlung weiterer Rec-vermittelter Veränderungen des Transkriptom humaner Zellen sollten Rec exprimierende und Rec nicht-exprimierende Zellen auf genomweite Expressionsunterschiede mittels einer Affymetrix-Genchipanalyse untersucht werden.

5.2.1 Etablierung eines Modellsystems für die Analyse der Auswirkung der Rec-Expression auf das Transkriptom humaner Zellen

Gewinnung von Vergleichsproben

Die Vergleichsanalyse zweier Transkriptome mittels Affymetrix-Genchip-Hybridisierung erfordert zwei nahezu vollständige mRNA-Pools, welche sich möglichst nur in dem zu untersuchenden Faktor unterscheiden. Für die Analyse des Einflusses des Rec-Proteins auf das humane Transkriptom galt es, im Vorfeld verschiedene Vergleichsstrategien gegeneinander abzuwägen, um eine möglichst exakte Rec-Antwort zu identifizieren. So bestand zum einen die Möglichkeit des Vergleiches von HERV-K exprimierenden und HERV-K nicht-exprimierenden Tumorproben oder Tumorzelllinien. Zum anderen gab es die Option der Generierung eigener Untersuchungsproben durch eine Überexpression von Rec in HERV-K nicht-exprimierenden Zellen oder einer Herunterregulation von Rec in HERV-K exprimierenden Zellen.

Die Verwendung von Tumormaterial besitzt den Vorteil der Abbildung der *in vivo* Situation des Rec-Einflusses auf zelluläre Gene. Demgegenüber ergibt sich bei der Verwendung von Tumorproben das Problem der Heterogenität des Materials. Tumore sind zwar das Resultat aus klonalem Wachstum und Selektion, bestehen aber auch aus Zellen, die den Tumor

umgeben (beispielsweise Fibroblasten, Endothel- und Immunzellen oder Tumorzellen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad) [Hanahan and Weinberg, 2000]. Dies würde zu einer Herabsetzung oder Verwischung eines Rec-spezifischen Signals führen. Eine mögliche Lösung dieses Problems bestünde in der Verwendung von humanen Tumorzelllinien, was aber mit dem Verlust der *in vivo*-Situation einhergehen würde. Zudem stellte sich hierbei die Frage nach der Wahl einer geeigneten Vergleichsprobe. Bei der Verwendung von unterschiedlichen Tumorzelllinien (mit und ohne HERV-K-Expression) könnten unterschiedlich regulierte Gene nicht ausschließlich auf die Expression oder das Fehlen des Rec-Proteins zurückgeführt werden. Die Identifikation von nicht Rec-beeinflussten, unterschiedlich regulierten Genen wäre nur durch aufwendige Vergleichsuntersuchungen einer Vielzahl unterschiedlicher Tumorzelllinien möglich.

Eine alternative Strategie zur Erzeugung von Rec +/- Vergleichsproben lag in der Verwendung von HERV-K nicht-exprimierenden Tumorzelllinien und der ektopischen Rec-Expression mittels eukaryotischer Expressionsplasmide oder in einer Stilllegung der Rec-Expression in HERV-K exprimierenden Zelllinien mittels der Methode der RNA-Interferenz. Da in der Literatur keine Rec-siRNA-Sequenzen beschrieben waren und in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe keine funktionstüchtige siRNA etabliert werden konnte, wurde die Strategie der ektopischen Expression des Untersuchungsgens *rec* gewählt. Als Rec-negative Vergleichsprobe sollte aufgrund des Fehlens von dominant negativen *rec*-Mutanten ein identisches Expressionsplasmid ohne den für das Rec-Protein kodierenden Leserahmen eingesetzt werden. Der Vorteil dieses System liegt in der Verwendung sehr identischer Ausgangszellen und somit in dem Erhalt einer sehr spezifischen Antwort der Zelle auf das eingebrachte Untersuchungsgen. Zudem gestalten sich die Probengewinnung und die Durchführung von Reproduktionsversuchen sehr einfach. Ein Nachteil der Strategie besteht im *in vitro* Charakter des Versuches und der damit verbundenen schwierigen Übertragung der Ergebnisse auf die Situation im Organismus.

HEK-293 Zellen als Modellsystem für die Rec-Expression

Da bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Modellzelllinien für die genomweite Untersuchung der Rec-vermittelten Genexpressionveränderungen etabliert wurden, sollte in einem weiteren Schritt ein geeignetes Untersuchungssystem gefunden werden. Grundvoraussetzungen für dieses Modellsystem waren:

1. Eine möglichst geringe HERV-K Expression der Zielzelle.
2. Hohe Transfektionseffizienzen.
3. Eine hohe Expression des Transgens.
4. Eine effiziente Gewinnung von RNA-Proben mit hoher Qualität.

Hierbei stellte sich die Frage der Verwendung primärer Zellen oder transformierter Zelllinien. Primäre Zellen haben den Vorteil des Vorhandenseins intakter Genome und Genexpressionsmuster und würden somit Aussagen über Rec-vermittelte Veränderungen in frühen Stadien des Transformationsprozesses hervorbringen. Ein entscheidender Nachteil von primären Zellen ist deren geringe Transfektionseffizienz und eine damit einhergehende Verschlechterung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses. Ferner zeigte sich in den Untersuchungen zur Regulation von HERV-K(HML-2) in Melanomen eine HERV-K-Expression erst nach mehrfaktoriellen Veränderungen der Zellen (genomweite Demethylierung und Aktivierung von HERV-K spezifischen Transkriptionsfaktoren (siehe Kapitel 4.1 und 5.1)), welche kein Merkmal von primären Zellen darstellen. Die Detektion der im natürlichen System auftretenden Rec-Antwort wäre somit aufgrund einer falschen Konstitution der Zelle wenig wahrscheinlich. Daher wurde die Verwendung von humanen Tumorzelllinien präferiert.

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293 ist eine Adenovirus-5 transformierte Epithel-Zelllinie mit einem hypotriploiden Chromosomensatz [Graham et al., 1977]. Diese Zelllinie ist gekennzeichnet durch eine geringe HERV-K-Expression (siehe Kapitel 4.1.1), ein intaktes HERV-K LTR-Methylierungsmuster (Kapitel 4.1.7), eine gute Transgenexpression (Kapitel 4.2.1), hohe Transfektionseffizienzen (Kapitel 4.2.2) und eine einfache Probenengewinnung mit hohen RNA-Qualitäten (Kapitel 4.2.3). Daher wurde für die Realisierung der in dieser Arbeit erstmals durchgeführten Affymetrix-Chip-Experimente auf die humane Zelllinie HEK-293 zurückgegriffen.

Einbringung des Transgens in humane Zellen

Für die ektopische Expression von Rec in HEK-293 Zellen wurde die Methode der transienten Transfektion von Expressionsplasmiden gewählt. Die transiente Transfektion von DNA mittels Lipofectamine zeigte für HEK-293 Zellen eine sehr hohe, für RNA-Chip-Experimente ausreichende Transfektionseffizienz von ca. 90%. Von einer Verwendung anderer Methoden der DNA-Übertragung in eukaryotische Zellen, wie beispielsweise der Calcium-Phosphat-Präzipitation, der Elektroporation oder der DNA-Transduktion mit Hilfe von

viralen Partikeln, wurde abgesehen, da diese Methoden zu keiner deutlichen Erhöhung der Anzahl transgener Zellen geführt hätten. Zudem bestand bei der Verwendung von Transduktionssystemen die Gefahr einer Interferenz der Rec-Antwort mit den Proteinen des viralen Vektors.

Bestimmung des Zeitpunktes der Probennahme

Die Bestimmung des Zeitpunktes der optimalen Probennahme erfolgte auf der Grundlage der Rec-Protein-Expressionsstärke. Hierbei zeigte sich die stärkste Expression des Proteins zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Transfektion. Für die Detektion der Rec-Expressionsstärke nach 72 Stunden wurden transfizierte Zellen mittels Geneticin-Selektion auf ein erfolgreiches Einbringen plasmidärer DNA selektiert. Eine erfolgreiche Selektion transfizierter Zellen konnte in den Plasmid-transfizierten Kulturschalen beobachtet werden (Wachstum von ca. 90% der Zellen), wohingegen ein Absterben nahezu aller Zellen in Kulturschalen ohne Transfektion von Geneticin-Resistenz-Plasmiden zu verzeichnen war. Dennoch wurde im Vergleich zu nicht-selektierten Zellen keine weitere Erhöhung der Rec-Expression nach 72 Stunden gemessen. Im Verlauf der weiteren Kultivierung der Zellen zeigte sich stattdessen ein vollständiger Verlust der Rec-Expression. Dies ist vermutlich auf eine CpG-Methylierung des vektoriiellen Promotors durch humane DNA-Methyltransferasen zurückzuführen [Doerfler, 2006]. Von einer möglichen Reaktivierung des Promotors durch demethylierende Agenzien wurde aufgrund der genomweiten, ungerichteten Wirkung dieser Substanzen und dem damit verbundenen Verlust einer Rec-spezifischen Antwort abgesehen.

Da in der Literatur keine weiteren Abhängigkeiten der Rec-Proteinfunktion von zellulären Stimuli bekannt waren und fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen mit Rec-GFP-Fusionsproteinen eine kontinuierliche Expression und keine zellzyklusabhängige Regulation des Proteins aufzeigten (eigene Beobachtungen und persönliche Mitteilung von Dr. Norbert Bannert, RKI-Berlin), wurde der Zeitpunkt 72 Stunden nach Transfektion für die Probennahme ausgewählt.

5.2.2 Analyse der Affymetrix-Chipdaten

Die Affymetrix-Chip Analyse zeigt eine deutlich stärkere Rec-Antwort für das Expressionsexperiment 1 im Vergleich zum Experiment 2

Für die Detektion differenziell regulierter Gene nach einer Rec-Expression in HEK-293 Zellen kam der Genchip U133 plus 2.0 der Firma Affymetrix zur Anwendung, welcher Oligonukleotidsonden gegen nahezu alle derzeit bekannten humanen RNA-Spezies besitzt. Für die Reduktion falsch positiver Ergebnisse, wurde dieses Experiment im Duplikat durchgeführt unter Verwendung von zwei Affymetrix-Genchips für die Hybridisierung und Datengewinnung.

Eine erste deskriptive Analyse der beiden Chip-Datenmengen zeigte eine deutlich stärkere Antwort auf die Rec-Expression für Chip 1 im Vergleich zu Chip 2. So konnten für den RNA-Chip 1 (RNA-Pool Rec +/- 1) fünfmal mehr Messpunkte mit unterschiedlichen Signalstärken detektiert werden als für den RNA-Chip 2 (RNA-Pool Rec +/- 2). Messpunkte, welche für beide Chips eine identische Regulationstendenz aufwiesen (herauf- oder herunterreguliert), zeigten des Weiteren im überwiegenden Teil der Fälle für den Genchip 1 eine höhere Signalstärke als für den Genchip 2. Dies lässt vermuten, dass die Modulation der Genexpression durch Rec in den Parallelexperimenten leicht unterschiedlich verlief. Eine Ursache hierfür könnte in einem vorzeitigen Abklingen der Rec-Expression und einer damit verbundenen Reduktion der Rec-Antwort für Genchip 2 liegen. Möglich erscheint auch eine geringere Rec-Transfektionseffizienz im zweiten Experiment und eine daraus resultierende schwächere Respons der Zelle auf das retrovirale Protein Rec.

Folglich ergab sich bei der Auswahl der Rec-Zielgene aus dem Überlappungsbereich der differenziell regulierten Spots beider Experimente ein Verlust von Rec-beeinflussten mRNA-Spezies aus dem unteren Datenbereich (Gene mit schwacher differenzieller Expression) für Experiment 1. Zudem war durch ein mögliches Auftreten von falsch negativen Messpunkten auch mit einem Verlust von unterschiedlich regulierten Genen des oberen Datenbereichs zu rechnen. Daher wurden neben der Betrachtung des Überlappungsbereichs der zwei Hybridisierungsexperimente auch Gene ausgewählt, welche eine differenzielle Regulation nur für den ersten Genchip aufwiesen.

Detektion geringer Regulationsstärken der differenziell exprimierten Gene.

Der Schwerpunkt der Auswahl der differenziell exprimierten Gene lag auf dem Überschneidungsbereich der Datenmengen der beiden Chip-Hybridisierungen. Dabei zeigten die Gene dieses Datenpools lediglich sehr geringe relative Expressionsveränderungen. Die höchste Rec-vermittelte Expressionsveränderung wurde für das Gen Histondeacetylase 3 gemessen und lag bei einem Faktor von $x_{\text{Chip1}} = 2^{1,8}$. Eine mögliche Ursache für die geringen relativen Expressionsunterschiede könnte in einer schwachen Einflussnahme von Rec auf den Transkriptionsapparat der Zelle liegen. Eine andere Erklärung fand sich in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Rec. Hierbei konnte nach GFP- und Rec-GFP-Transfektion eine homogene Expression des Grün-Fluoreszierenden-Proteins in nahezu allen Zellen des Zellpools detektiert werden, wohingegen Rec-GFP in lediglich einem Prozent der Zellen gefunden wurde. Somit zeigte Rec trotz sehr hoher Transfektionseffizienzen eine stark heterogene Expression im Zellverband. Die Ursachen hierfür sind zur Zeit nicht geklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Der Nachweis einer Rec-Expression in nur wenigen Zellen des Zellpools bedeutet darüber hinaus, dass die Expressionsunterschiede für eine individuelle, Rec-exprimierende Zelle wahrscheinlich sehr hoch sind. Eine Anreicherung von Zellen mit hohen Rec-Proteinmengen vor der Probengewinnung könnte hierbei für eine Verbesserung der Signalstärke sorgen. Dies wäre beispielsweise über eine FACS-Sortierung möglich.

Die Gene *FGF18*, *ATF3*, *SOX30*, *ZNF91*, *ZNF256*, *PSF*, *FOX2*, *Cyclin L1 β* und *NFAR* zeigen in der real-time PCR-Analyse eine schwache differenzielle Regulation

Für die Verifikation der differenziell regulierten Gene wurden Primerpaare gegen die 3'Enden der jeweiligen mRNAs entworfen. Hierbei konnten 23 funktionale Oligonukleotidpaare gegen die in Tabelle 4.5 auf Seite 89 aufgeführten humanen Gene etabliert werden. Die Primerpaare für die Detektion der mRNA-Spezies RNA-Helikase 1, humane MAP kinase kinase MEK5c, heterogenes nukleares Ribonukleoproteins Q, v-jun, eukaryotischer Translations-Initiationsfaktors *EIF-5A* und Integrin alpha chain alpha 6 amplifizierten keine oder mehrere DNA-Produkte und standen daher nicht für eine Quantifizierung mittels real-time PCR zur Verfügung.

Für 61% der untersuchten Zielgene (14 von 23) konnte keine differenzielle Regulation nachgewiesen werden. Eine Ursache hierfür findet sich vermutlich in den geringen Expres-

sionsunterschieden der differenziell exprimierten Gene. Der Großteil der mRNA-Spezies zeigte eine Regulation von $x_{\text{Chip1}} < 2^1$ und lag damit im Bereich der Detektionsgrenze der real-time PCR. Somit können die mittels real-time PCR nicht verifizierten, differenziell exprimierten Gene nicht mit absoluter Sicherheit als von Rec unbeeinflusst betrachtet werden.

Vier putative Rec-Zielgene konnten mittels real-time PCR für mindestens zwei der drei untersuchten RNA-Pools als differenziell reguliert bestätigt werden. Weitere fünf Zielgene wiesen eine differenzielle Regulation in allen drei untersuchten RNA-Vergleichsproben auf. Diese Proteine können funktionell in Transkriptionsfaktoren (FGF18, ATF3, SOX30, ZNF91 und ZNF256) und RNA-Bindeproteine/Spleißfaktoren (PSF, FOX2, Cyclin L1 beta, NFAR) untergliedert werden.

5.2.3 Biologische Funktion der Rec-vermittelten, differenziell regulierten Gene

Der Fibroblasten Wachstumsfaktor 18

Der Fibroblasten Wachstumsfaktor 18 (FGF18) gehört zur Gruppe der Fibroblasten Wachstumsfaktoren, welche aus 22 Mitgliedern besteht. Den humanen Fibroblasten Wachstumsfaktoren kommen essentielle Funktionen im normalen Zellwachstum, der Morphogenese, der Gewebereparatur und der Angiogenese zu [Ornitz and Itoh, 2001].

FGF18 besitzt eine mitogene Wirkung während der Embryonalentwicklung und der Knochen- und Knorpelbildung. Ein Verlust des Proteins geht mit Knochenfehlbildungen in der Maus einher [Hajihosseini and Heath, 2002; Liu et al., 2007; Ohbayashi et al., 2002]. Eine Überexpression dieses Wachstumsfaktors konnte zudem in kolorektalen Karzinomen beobachtet werden [Shimokawa et al., 2003]. *FGF18* ist ein im WNT-Signalweg gesteuertes Gen und ein direktes Zielgen von β -Catenin [Shimokawa et al., 2003]. Des Weiteren stimuliert der Fibroblasten Wachstumsfaktor 18 das Wachstum von NIH3T3-Zellen und besitzt eine onkogene Wirkung im kolorektalen Karzinom über autokrine und parakrine Effekte [Shimokawa et al., 2003; Sonvilla et al., 2008]. Außerdem wird dem Fibroblasten Wachstumsfaktor 18 eine Rolle in der Testisentwicklung und Funktionen in Pre-Sertolizellen zugeschrieben [Cory et al., 2007].

Interessante Funktionszusammenhänge bestehen zwischen der Gruppe der FGF und der Familie der Sex determination region Y (Sry)-box-Transkriptionsfaktoren. Die Fibroblasten

Wachstumsfaktoren spielen eine Rolle in der Entwicklung der männlichen Reproduktionsorgane. Hierbei zeigte sich, dass das Protein SRY die Expression des Proteins Sry-box9 (SOX9) induziert, welches seinerseits zur Aktivierung von FGF9 und damit zur Unterdrückung des WNT4-Signalweges führt. Dieser Signalweg führt in Pre-Sertoli-Zellen zu einer Stabilisierung der Testisentwicklung [Cotton et al., 2008]. Interessanterweise befindet sich unter den Rec-aktivierten Genen auch das in den Testis exprimierte Protein Sry-box30 (SOX30). Während FGF9 den WNT4-Signalweg hemmt, zeigt sich *FGF18* als Zielgen im WNT-Signalweg. Möglicherweise besitzt FGF18 daher eine antagonistische Wirkungsweise zur Funktion des Proteins FGF9 und ist die Ursache und/oder das Resultat einer erhöhten SOX30 Expression. Eine Rec-vermittelte Aktivierung des WNT-Signalweges konnte aber aus dem Affymetrix-Datenpool nicht abgeleitet werden.

Eine erhöhte Expression des Wachstumsfaktors FGF18 könnte einen weiteren Faktor für eine Aktivierung der Proliferation und somit einen Selektionsvorteil für Rec-exprimierende Tumorzellen darstellen. Untersuchungen zur Expression von FGF18 in HERV-K exprimierenden und nicht-exprimierenden Tumorproben könnten hierbei die Rolle des Rec-Proteins in der Aktivierung von FGF18 aufzeigen und somit eine mögliche tumorfördernde Wirkungsweise näher charakterisieren.

Sex determining region Y-box 30 (SOX30)

SOX30 ist ein wenig charakterisiertes Protein der Sry-box Familie. Aufgrund seiner testisspezifischen Expression wird diesem Protein eine Rolle in der männlichen Keimzellentwicklung zugesprochen. SOX30 besitzt eine high mobility group (HMG) box, welche eine DNA-Bindung und DNA-Biegung ermöglicht. Darüberhinaus wirkt es über die DNA-Konsensussequenz ACAAT als transkriptioneller Aktivator [Osaki et al., 1999]. Eine exakte Bindestelle des Transkriptionsfaktors kann im 5'LTR von HERV-K(HML-2) in unmittelbarer Nähe zum putativen Transkriptionsstartpunkt gefunden werden (Basenpaare +736 bis +740). Da jedoch Konsensussequenzen mit fünf Basenpaaren relativ häufig im Genom zu finden sind (statistisch alle 1024 bp), ist eine SOX30 vermittelte Transaktivierung von HERV-K(HML-2) nicht zwingend zu erwarten. LTR-Reportergen-Assays mit mutierten Bindestellen für den TF SOX30 könnten neue Informationen zu einer Beteiligung des Transkriptionsfaktors an der HERV-K Transaktivierung aufzeigen.

Sry-box-Proteine sind ferner dafür bekannt, mit weiteren Transkriptionsfaktoren die tran-

skriptionelle Aktivität der Linsengene β - und $\delta 1$ -*Crystallin* zu regulieren [Kamachi et al., 1995, 1998]. Interessanterweise findet sich in der Liste der Rec-aktivierten Gene auch das Gen β -*Crystallin2*, welches für Komponenten der humanen Linse kodiert. Das Auffinden des potentiellen Sry-box-Zielgens β -*Crystallin2* als differenziell reguliertes Gen unterstreicht eine putative Aktivierung von SOX30 durch Rec und bringt SOX30 in Verbindung mit der Linsenentwicklung beim Menschen.

Aufgrund der wenigen Informationen zu der Funktion und den Zielgenen des Transkriptionsfaktors SOX30 ist eine Vorhersage der Auswirkung einer stärkeren Expression auf die Zelle nur schwer möglich. Da jedoch SOX-Proteine an Differenzierungsprozessen der Zelle [Cotton et al., 2008] und an der Regulation von Mitgliedern der FGF-Familie beteiligt sind [Ambrosetti et al., 1997; Cotton et al., 2008], kann eine transformierende Rolle des Proteins nicht ausgeschlossen werden.

Der Aktivierende Transkriptionsfaktor 3 (ATF3)

ATF3 ist ein Mitglied der ATF/CREB-Familie mit basischen Leucin-Zipper DNA-Bindedomänen. Das mRNA-Level ist in vielen Zellen niedrig oder nicht vorhanden, kann aber eine hohe Induktion als Folge von zellulärem Stress erfahren [Hai et al., 1999]. Die Auswirkungen einer ATF3-Expression sind dualer Natur und können zum einen in Zellzyklusstop und Apoptose und zum anderen in Zellüberleben und Proliferation resultieren [Miyazaki et al., 2009]. Eine Überexpression von ATF3 in Mäusen ohne vorherige Schwangerschaft verursacht die Ausbildung von Zellveränderungen in einer oder mehreren Brustdrüsen. Eine Überexpression von ATF3 in Mäusen mit vorheriger Schwangerschaft führt zur Bildung von Brustkrebs [Wang et al., 2008].

Interessanterweise ist *ATF3* ein *MYC*-Zielgen [Tamura et al., 2005] und könnte somit über eine Rec-vermittelte PLZF-Inaktivierung und einer damit verbundenen stärkeren *MYC* Expression transkriptionell aktiviert sein. Des Weiteren bildet ATF3 als heterodimerer Komplex mit dem Protoonkogen c-jun (ebenfalls heraufreguliert) den Transkriptionsfaktor AP-1 [Hess et al., 2004]. Eine potentielle positive Rückkopplung auf die Promotoraktivität von HERV-K ergibt sich aus der Arbeit von Kwun et al. [2002], welche eine aktive AP-1 Bindestelle im HERV-K 5'LTR aufzeigt.

Die Beteiligung von ATF3 an der Entwicklung von Brustkrebs und das Auffinden erhöhter *ATF3*-mRNA Level in Prostatakarzinomen [Pelzer et al., 2006] und in Hodgkin Reed-

Sternberg Zellen [Janz et al., 2006], verleihen diesem Protein onkogene Eigenschaften. Von einer Rec-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors könnte somit auch in diesem Fall eine tumorfördernde Wirkung ausgehen.

Die Zinkfingerproteine ZNF91 und ZNF256

Die Zinkfingerproteine 91 (ZNF91) und 256 (ZNF256) gehören zur Gruppe der Krüppel-assoziierten(KRAP)-Zinkfingerproteine. Beide Proteine sind gekennzeichnet durch eine N-terminale KRAP-Domäne, welche transkriptionsregulierende Funktionen besitzt. Des Weiteren verfügen die Proteine ZNF91 und ZNF256 über C-terminale, in Tandemwiederholungen angeordnete Zinkfinger-Proteindomänen, die eine Bindung der Proteine an DNA ermöglichen.

ZNF91 zeigt eine natürliche Expression im Thymus, in PBMCs und speziell in T-Lymphozyten. Zudem konnten hohe *ZNF91*-mRNA Niveaus in Teratokarzinomen, Neuroblastomen und Glioblastomen gefunden werden [Bellefroid et al., 1993]. ZNF91 ist ein Repressor des FC γ RIIB Promotors und bindet die DNA-Sequenz AATTTGTTTGCC [Nishimura et al., 2001]. Eine putative ZNF91-DNA-Bindestelle mit 75-prozentiger Identität konnte im 5' U3-Enhancerbereich des HERV-K 5'LTR gefunden werden (+92 - +103 bp). Diese Bindestelle befindet sich in unmittelbarer Umgebung zu einer funktionalen YY1-Bindestelle (+62 - +83 bp) [Knössl et al., 1999] und könnte damit einen Einfluss auf die Transkriptionsstärke von HERV-K(HML-2) nehmen. Aufgrund der relativ unbekanntenen Funktion von ZNF91 sind weitere Auswirkungen einer Rec-vermittelten ZNF91-Expressionserhöhung nur schwer vorhersagbar.

ZNF256 zeigt eine erhöhte Expression in haematopoetischen Zellen, im Gehirn, Testis und Knochenmark [Han et al., 1999]. Eine Induktion des Transkriptionsfaktors über den GDNF-red-Signalweg ist bekannt. Zudem interagiert ZNF256 mit dem KRAP-assoziierten Protein 1 (KAP-1) und erlangt dadurch die Funktion eines transkriptionellen Repressors mit Zellproliferation induzierenden Eigenschaften [Suzuki et al., 2008]. Somit könnte auch ZNF256 potentiell tumorfördernde Eigenschaften haben und zu einer Rec-vermittelten Tumorprogression beitragen. Des Weiteren besitzt ZNF256 wie auch FGF18 eine potentielle Funktion bei der Knorpelbildung [Imabayashi et al., 2003].

Polypyrimidintrakt-Bindeprotein assoziierter Spleißfaktor 2 (PSF)

Neben den oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren zeigten sich nach der Rec-Expression in HEK-293 Zellen zahlreiche humane Spleißfaktoren differenziell exprimiert. Hierzu zählte auch das Protein PSF, welches als heterodimerer Komplex mit p54^{nrb} an den Polypyrimidintrakt humaner mRNAs binden kann [Dong et al., 1993; Patton et al., 1991]. Zudem interagiert PSF mit der U5-snRNA [Peng et al., 2002] und spielt eine Rolle im zweiten Schritt der Spleißreaktion [Gozani et al., 1994]. Dies impliziert eine mögliche Einflussnahme von Rec auf den Vorgang des Spleißens humaner Gene und der viralen RNA.

Interessanterweise zeigten Krishnan and Zeichner [2004] eine 2,37-fache Erhöhung des *PSF*-mRNA-Niveaus in der späten Phase des HIV-Replikationszyklus. Des Weiteren ist PSF ein bekannter Gegenspieler des Rec-homologen HIV-1 Genproduktes Rev. PSF bindet an *cis*-aktive regulatorische Elemente (INS) innerhalb der Rev-abhängigen *gag*- und *env*-mRNAs von HIV und verhindert dadurch deren Expression. Zudem besitzt PSF eine RNA-Export- und -Zurückhaltefunktion für Transportvorgänge vom Zellkern ins Zytoplasma. Rev ist dabei in der Lage, die Bindung von PSF an INS Elemente aufzuheben und somit die *gag*- und *env*-Translation zu verstärken [Zolotukhin et al., 2003].

Eine funktionale Bedeutung von PSF im Replikationszyklus von HERV-K erscheint im Hinblick auf die Funktionen von PSF in späten Phasen der HIV-Replikation wahrscheinlich. Eine Rec-vermittelte Aktivierung der *gag*- und *env*-Translation durch Aufhebung der Bindung von PSF an die virale RNA, ist denkbar. Zudem könnte eine verstärkte Expression von PSF oder eine Interferenz von Rec mit der natürlichen Funktion von PSF einen Einfluss auf zelluläre mRNA Spezies nehmen und pathogene Veränderungen der Zelle hervorrufen.

In weiterführenden Experimenten könnten *cis*-aktive Bereiche innerhalb der HERV-K mRNA-Sequenz identifiziert und der Einfluss einer verstärkten PSF-Expression auf die Expression und Translation der HERV-K *gag*- und *env*-mRNA untersucht werden.

RNA binding motif protein 9 (FOX2)

FOX2 ist ein RNA-Bindeprotein, welches die intronische Konsensussequenz UGCAUG erkennt [Ponthier et al., 2006]. Ein perfektes Bindemotiv konnte innerhalb der HERV-K Voll-längen-mRNA an Position +5132 - +5137 im Pol-Leserahmen (1302 Basenpaare stromauf-

wärts vom SA1) detektiert werden. Somit stellt die HERV-K Vollängen-mRNA ein putatives Ziel-Molekül für FOX2 dar.

Zu den Organen mit einer hohen FOX2 Expression zählen das Gehirn, das Herz und der Skelettmuskel. FOX2 ist ein essentieller Regulator für gewebsspezifisches Spleißen, welcher in Abhängigkeit von der Lokalisation der Bindestelle eine inhibierende oder aktivierende Wirkung auf den Prozess des Spleißens ausübt [Zhang et al., 2008]. Beispielsweise zeigt FOX2 eine aktivierende Wirkung auf des Spleißens von Exon 1b (Exonexclusion) der mRNA von Protein 4.1R [Ponthier et al., 2006]. Eine inhibierende Wirkung auf das Spleißens von Exon IIIc (Exoninclusion) konnte für die mRNA des FGF-Rezeptor2 beobachtet werden. Hierbei kooperiert FOX2 mit hnRNP-H (ebenfalls differenziell reguliert) und hnRNP-R und inhibiert die Funktion der SR-Proteine (Spleißverstärker) [Mauger et al., 2008].

Somit könnte die verringerte Expression von FOX2 zu einem erhöhten Spleißens der HERV-K Vollängen-mRNA führen, was der Funktion des akzessorischen Proteins Rec (Export ungespleißter viraler RNA) entgegenwirken würde. Die reduzierte Expression des Proteins FOX2 stellt womöglich eine Antwort der Zelle auf eine Rec-vermittelte Erhöhung ungespleißter oder wenig gespleißter Transkriptvarianten dar. Eine veränderte Proteinmenge des Spleißfaktors könnte auch in diesem Beispiel einen Einfluss auf das alternative Spleißens und damit die Proteinfunktion zellulärer Genprodukte nehmen.

Cyclin L1 β

Cyclin L1 β ist ein alternatives Spleißprodukt des Gens Cyclin L1, welches auf dem Chromosom 3q25.32 lokalisiert ist. Cyclin L1 β besitzt eine N-terminale Cyclin-Box, weist aber im Vergleich zum Vollängen-Genprodukt Cyclin L1 einen C-terminalen Verlust der RS-Domäne auf.

Cyclin L1 β bildet mit der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) ^{p110} und SR-Proteinen ternäre Komplexe und nimmt durch eine Erhöhung des Intronspleißens einen Einfluss auf den Prozess des alternativen Spleißens [Loyer et al., 2008].

Interessanterweise zählt zu den SR-Proteinen, welche mit Cyclin L1 β komplexieren, das Protein SF-9G8, welches in das Spleißens von HIV-Transkripten involviert ist [Jacquet et al., 2005] und ebenfalls nach Rec-Expression mittels Affymetrix Genchip-Analyse als differenziell reguliert gefunden werden konnte.

Die Erhöhung des alternativen Spleißproduktes Cyclin L1 β könnte ein Beleg dafür sein, dass Rec den zellulären Spleißapparat beeinflusst und verändert. Zudem ist Cyclin L1 β als Spleißfaktor selbst in der Lage, einen Einfluss auf den Prozess des alternativen Spleißens zu nehmen. Die Komplexbildung von Cyclin L1 β mit dem Spleißverstärker SF-9G8 lässt eine Aktivierung von Exonspleißen vermuten und würde somit wieder der Funktion von Rec entgegenwirken.

Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen 90kDa (NFAR)

NFAR ist ein alternatives Spleißprodukt des Gens Interleukin-enhancer-binding- factor 3 (*ILF3*). Anderen alternativen Spleißprodukten dieses Gens (beispielsweise das dsRNA-Bindeprotein 76 (DRBP76) oder TCP80) konnte im Gegensatz zu NFAR keine differenzielle Regulation nach Rec-Expression nachgewiesen werden.

NFAR besitzt zwei C-terminale Bindedomänen für doppelsträngige RNA (DRBD 1 und DRBD 2) [Agbottah et al., 2007]. DRBD-Proteine binden doppelsträngige RNA und besitzen Funktionen als Transkriptionsfaktoren. Zudem sind sie in Prozesse des RNA-Spleißens, des RNA-Editierens und des RNA-Exports involviert. NFAR verfügt außerdem über ein Leucin-reiches Nukleares Exportsignal (NES), welches Ähnlichkeiten zur NES-Konsensussequenz von HIV-1 Rev aufweist [Urcuqui-Inchima et al., 2006].

NFAR ist ein Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Eine Überexpression des Proteins führt dabei zu einer Induktion von Interferon-Zielgenen [Krasnoselskaya-Riz et al., 2002]. Des Weiteren resultiert aus dem Verlust von NFAR eine erhöhte Replikation des Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV) und Influenza-Viren [Pfeifer et al., 2008]. NFAR ist zudem in die Transkription und Stabilisierung der Interleukin 2 (*IL-2*)-mRNA involviert [Pei et al., 2008; Shim et al., 2002].

Weitere Auswirkungen von NFAR sind für das Humane Immundefizienz-Virus 1 beschrieben. So inhibiert NFAR in Rev-exprimierenden HeLa-Zellen die Expression von RRE-Reportergen, interagiert und kolokalisiert mit Rev und beeinflusst die Expression und den Transport von RRE-mRNAs in Zellen ohne Rev-Expression [Urcuqui-Inchima et al., 2006]. Des Weiteren inhibiert NFAR die Tat-abhängige Aktivierung von HIV-1-LTRs [Agbottah et al., 2007].

Eine erhöhte Expression von NFAR in Rec-exprimierenden Zellen könnte somit, in Analogie zu HIV-1, zu einer Herabsetzung der HERV-K Expression führen.

Des Weiteren könnte NFAR als Bestandteil der angeborenen Immunabwehr ein Interferon-Antwort der Zelle auslösen. Anzeichen hierfür finden sich in einer Erhöhung der mRNA-Level der DEAD-box-RNA-Helikasen RIG-1 und MDA-5. *RIG-1* und *MDA-5* sind paraloge Gene, deren Proteinprodukte virale doppelsträngige RNA erkennen und in der Auslösung von Immunantworten gegen Viren beteiligt sind [Sarkar et al., 2008]. MDA-5 induziert die Expression der Transkriptionsfaktoren Interferon regulatory factor 3 (IRF3) und 7 (IRF7) [Kawai et al., 2005]. *IRF7* zeigte sich ebenfalls nach Rec-Expression transkriptionell erhöht und ist beteiligt an der Aktivierung von Interferon-Promotoren [Erickson and Gale, 2008]. Ein Interferon-Zielgen mit differenzieller Regulation nach Rec-Expression ist das Interferon- α -induzierbare-Protein (*ISG15*) (ebenfalls heraufreguliert). ISG15 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein mit antiviraler Wirkung, welches aber keine destabilisierenden Eigenschaften besitzt und auf die Zielproteine STAT1, JAK1 und RIG-1 übertragen werden kann [Zhao et al., 2005].

Die Auswirkungen von NFAR auf den Transport und die Expression von HERV-K-mRNA und eine mögliche Auslösung einer Interferon-Antwort sollten in weiterführenden Untersuchungen aufgeklärt werden. Für den Fall einer Rec-stimulierten Interferon-Antwort der Zelle, wäre eine HERV-K Expression in Tumorzellen möglicherweise aufgrund der antitumoralen Wirkung der α -Interferone (antiproliferative Wirkung und Stimulation von Natürlichen-Killerzellen) vorteilhaft für den Organismus.

Die Rec aktivierten Transkriptionsfaktoren besitzen zellproliferative Eigenschaften, die Rec beeinflussten Spleißfaktoren wirken der Rec-Funktion entgegen

Die mittels Affymetrix-Chip und real-time PCR ermittelten Rec-Zielgene zeigten geringe Unterschiede hinsichtlich ihres Aktivierungs- oder Repressionsgrades. Dennoch konnten durch eine detaillierte Betrachtung der biologischen Funktionen der Proteine, funktionelle Zusammenhänge der Genprodukte untereinander aufgedeckt werden. Zudem zeigten sich starke Homologien der hier ermittelten Rec-Antwort zu den in der Literatur beschriebenen Einflüssen des HIV-1 kodierten Proteins Rev.

Gesamtheitlich lässt sich feststellen, dass die Rec-aktivierten Transkriptionsfaktoren Eigenschaften zur Induktion der Zellproliferation besitzen und die transkriptionell aktivierten, bzw. inaktivierten Spleißfaktoren der Funktion des akzessorischen Proteins Rec entgegenwirken.

5.2.4 Analyse der Einflussnahme ausgewählter Rec-Zielgene auf die Expression von HERV-K(HML-2)

Die Spleißfaktoren SF-9G8 und hnRNP-A1 beeinflussen das *env*-mRNA-Level von HERV-K(HML-2) und Rec kolokalisiert mit SF-9G8, aber nicht mit hnRNP-A1

Ungefähr ein Fünftel der mittels Affymetrix-Chipanalyse als differenziell reguliert identifizierten Gene gehörten zur Gruppe der humanen Spleißfaktoren (9 von 53). Vier dieser Gene zeigten nach einer detaillierten Charakterisierung ihrer biologischen Funktion eine Beteiligung bei alternativen Spleißprozessen der retroviralen RNA von HIV-1 und/oder HTLV1/2. Daher sollte für zwei Spleißfaktoren eine Einflussnahme auf den Spleißvorgang der HERV-K *env*-mRNA untersucht werden. Hierfür wurden die Leserahmen der Proteine SF-9G8 und hnRNP-A1 in Expressionsvektoren kloniert, in HERV-K exprimierenden Zellen überexprimiert und das *env*-mRNA-Level mittels real-time PCR bestimmt. Dabei zeigte sich, dass sowohl das Protein SF-9G8 als auch das Protein hnRNP-A1 in GH-Zellen zu einer Erhöhung des *env*-mRNA-Niveaus beitragen. In der Melanomzelllinie SK-MEL-19 konnte dieser Einfluss lediglich für den Spleißfaktor SF-9G8 beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen sich als Anzeichen für eine Wechselwirkung von Rec mit SF-9G8 und hnRNP-A1 interpretieren.

Für eine nähere Charakterisierung der Art der Wechselwirkungen zwischen Rec und den Spleißfaktoren (direkt oder indirekt) wurden Kolokalisationsexperimente mit Rec-GFP und SF-9G8-mCherry/hnRNP-A1-mCherry durchgeführt. Hierbei ließ sich keine Kolokalisation von Rec und hnRNP-A1 nachweisen, was gegen eine direkte Wechselwirkung der beiden Proteine spricht. SF-9G8 zeigte demgegenüber eine Kolokalisation mit Rec in den Nucleoli und zudem eine diffusere Anordnung im Zellkern. Daher ist eine direkte Wechselwirkung von Rec mit SF-9G8 wahrscheinlich und sollte in weiterführenden Experimenten mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), Immunopräzipitation oder RNA-Bindeassays bestätigt werden.

Die biologische Bedeutung von SF-9G8 und hnRNP-A1 und eine mögliche Einflussnahme auf die Expression von HERV-K

SF-9G8 gehört zur Familie der SR-Proteine. Die Funktionalität des Proteins ist variabel. Über die Bindung an *cis*-aktive Sequenzen innerhalb ungespleißter mRNAs fördert es den

Prozess des alternativen Spleißens. Zudem ist SF-9G8 ein Kern-Zytoplasma RNA-Transportprotein [Cáceres et al., 1998; Huang and Steitz, 2001] und stimuliert die Translation von ungespleißter RNA [Swartz et al., 2007]. SF-9G8 erhöht des Weiteren das Spleißen von HIV-1 Transkripten, was zu einem erhöhten *tat*- und herabgesetzten *env*- und *gag*-mRNA-Level führt [Jacquet et al., 2005]. SF-9G8 findet sich außerdem in T-Zellen nach HIV-1 Infektion transkriptionell herunterreguliert [Ryo et al., 2000].

Das Auffinden erhöhter SF-9G8 Level nach Rec-Expression und erhöhter HERV-K *env*-mRNA-Niveaus nach SF-9G8 Expression verweist hierbei auf eine gegensätzliche Verwendung des zellulären Spleißfaktors im Replikationszyklus von HERV-K im Vergleich zu HIV-1. Eine mögliche Ursache hierfür lässt sich in einer unterschiedlichen Anordnung der *cis*-aktiven SF-9G8-Bindesequenz innerhalb der viralen RNAs finden.

Auch eine Funktion von SF-9G8 als Shuttle-Protein für virale RNA erscheint im Hinblick auf die veränderte Lokalisation des Spleißfaktors nach Rec-Expression denkbar.

hnRNP-A1 gehört zur Familie der heteronuklearen Ribonukleoproteine, welche an pre-mRNA binden und im RNA-Metabolismus eine Rolle spielen. HnRNP-Proteine sind bekannte Gegenspieler von SR-Proteinen, wirken aber nicht nur spleißinhibierend, sondern können Spleißen auch verstärken [Krecic and Swanson, 1999]. Neben dem Einfluss von hnRNP-A1 auf zelluläre mRNAs zeigt das Protein auch regulative Funktionen im HIV-1 RNA-Metabolismus. Beispielsweise bindet hnRNP-A1 an das INS-Element innerhalb der p17-*gag* mRNA und ist in der Lage, über eine Kooperation mit Rev den Export ungespleißter RNA aus dem Kern zu fördern [Najera et al., 1999]. Des Weiteren reguliert hnRNP-A1 den Spleißprozess von *tat*, indem es das Herausspleißen des letzten Introns über eine spezifische Intron-Silencer-Sequenz (ISS) inhibiert [Tange et al., 2001]. Ein gesteigertes HERV-K *env*-mRNA Level könnte demnach auch durch die Bindung von hnRNP-A1 an ein ISS im zweiten Intron von HERV-K und einer damit verbundenen Inhibition des Rec-Spleißens erfolgen. Eine hnRNP-A1 Konsensussequenz (UAGGG(U/A)) kann innerhalb der HERV-K_{CON} Sequenz 80 Basenpaare stromaufwärts vom SA1 (innerhalb des Pol-Leserahmens) und 233 Basenpaare stromabwärts von SD2 (innerhalb des Env-Leserahmens) gefunden werden.

Auch hier bedarf es weiterführender Analysen, um die molekularen Wechselwirkungen dieser Proteine mit der viralen RNA aufzuklären.

5.2.5 Np9 zeigte eine invertierte Expression im Vergleich zu Rec

Np9 ist das akzessorische Protein von HERV-K(HML-2) Typ1-Proviren (siehe Kapitel 1.3.5). N-terminal besitzen Rec und Np9 die gleichen 14 Aminosäuren, weichen aber aufgrund einer Leserahmenverschiebung nach dem SA2 C-terminal voneinander ab. Interessanterweise kodiert der stromabwärts vom SA2 gelegene Np9-Leserahmen im Vergleich zu Rec und Env für eine deutlich erhöhte Anzahl an Aminosäuren. Beide Proteine (Rec und Np9) binden trotz ihrer unterschiedlichen C-Termini das Protein PLZF und inhibieren dessen Funktion als Transkriptionsfaktor.

Das Protein Np9 zeigte in dieser Arbeit, wie auch schon durch Armbruester et al. [2004] beschrieben, eine geringe Stabilität. Eine Np9-Expression konnte ohne GFP-Fusionsanteil mittels Western Blot-Analyse nicht nachgewiesen werden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten für Np9-GFP eine im Vergleich zu Rec-GFP inverse Lokalisation im Kernplasma und nicht in den Nukleoli. Interessanterweise befinden sich die nuklearen Lokalisationssignale von Np9 im Np9-spezifischen Leserahmen [Armbruester et al., 2004], welcher zudem mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für die inverse Lokalisation der Proteine verantwortlich ist. Das Offenhalten des Np9-spezifischen, dritten Leserahmens in HERV-K Typ1 und 2 Proviren erlaubt die Überlegung einer ursprünglichen Verwendung dieser proteinkodierenden Sequenz durch HERV-K-Typ2 Proviren, beispielsweise über die Verwendung eines noch unbekanntes Spleißdonors innerhalb der viralen RNA.

Die Kerngängigkeit des Proteins, die Expression in Tumorzellen und die Interaktion mit PLZF und der RING-Typ E3 Ubiquitin-Ligase LNX qualifizieren Np9 für weitere Untersuchungen bezüglich der Auswirkung auf das Transkriptom humaner Zellen. Für Expressionsanalysen könnten die in dieser Arbeit generierten Vektoren verwendet werden.

6 Zusammenfassung / Summary

6.1 Zusammenfassung

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt waren die Regulation der Expression der humanen endogenen Retroviren K(HML-2) in humanen Melanomen und die Auswirkungen des von HERV-K-kodierten Proteins Rec auf das Transkriptom der Zelle völlig unbekannt. Gleichwohl existierte eine Vielzahl an Untersuchungen über die Expression des endogenen Retrovirus in humanen Tumorproben. Aufgrund der klinischen Bedeutung von HERV-K und der möglichen Verwendung als Tumormarker sollte dieses genetische Element auf seine transkriptionelle Regulation in humanen Melanomzelllinien untersucht werden und weiterhin auf seinen möglichen Einfluss auf das Transkriptom der Zelle.

Die in dieser Arbeit aufgezeigten Ergebnisse zur transkriptionellen Regulation der humanen endogenen Retrovirusfamilie K(HML-2) in humanen Melanomzelllinien verweisen auf einen zweistufigen Aktivierungsprozess der HERV-K-Expression. Hierbei bedarf es zum einen der Aktivierung von HERV-K spezifischen Transkriptionsfaktoren, welche über den U3-Enhancerbereich des LTRs die Aktivität des retroviralen Promotors erhöhen, und zum anderen bedarf es einer Aufhebung der CpG-Methylierung innerhalb der Promotorsequenz von HERV-K(HML-2). Wie in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, vollziehen sich beide Aktivierungsschritte zeitlich und funktionell unabhängig voneinander. Der Nachweis genomweiter Demethylierung von HERV-K 5'LTRs in Melanomzellen lässt auf eine Störung der Aufrechterhaltung des Methylierungsgrades der zellulären genomischen DNA schließen und könnte aufgrund der damit in Verbindung gebrachten Erhöhung von chromosomaler Instabilität und einer möglichen Aktivierung von Onkogenen eine Ursache für die schlechte Prognose von Melanompatienten mit HERV-K Expression darstellen.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit der Einfluss des HERV-K Genproduktes Rec auf den zellulären Transkriptionsapparat untersucht. Hierfür wurde in der HERV-K nicht-expri-

mierenden Zelllinie HEK-293 eine Rec-Expression mittels eukaryotischer Expressionsplasmide durchgeführt und die daraus resultierende zelluläre Antwort mit Hilfe einer Affymetrix-RNA-Chip-Analyse ermittelt. Die Verifikation der Affymetrix-Chipdaten mittels RT-real-time PCR ergab eine differenzielle Regulation für fünf humane Transkriptionsfaktoren mit zellproliferativem Charakter (FGF18, ATF3, SOX30, ZNF91, ZNF256) und vier Spleißfaktoren (PSF, FOX2, Cyclin L1 β , NFAR), welche an Prozessen des zellulären alternativen Spleißens beteiligt sind. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression der Spleißfaktoren SF-9G8 und hnRNP-A1 einen Einfluss auf das HERV-K *env*-mRNA-Niveau ausübt. Die Aktivierung von proliferationsfördernden Transkriptionsfaktoren und alternativen Spleißfaktoren könnte die Ursache für pathogene Veränderungen in HERV-K Rec-exprimierenden Zellen darstellen.

6.2 Summary

Until now, transcriptional regulation of HERV-K(HML-2) proviruses in human melanomas was unclear. Especially the impact of the HERV-K accessory protein Rec on the gene expression profile of human cells was unknown. Nevertheless, there are several reports about expression of the human endogenous retrovirus K(HML-2) in human malignant diseases. The clinical importance of HERV-K and the possible function as a tumour marker for malignant melanomas made this genetic element interesting for further investigations.

In this work, the genetic and epigenetic transcriptional regulation of HERV-K in human melanoma cell lines was investigated. Analysis of the 5'LTR promoter area showed that high levels of HERV-K expression were the result of increased levels of activated transcription factors and that transcription factor binding sites were located at the U3 region. Also the 5'LTR showed to be rich in CpG dinucleotides. Using various assays, a clear inverse correlation between methylation level and expression of HERV-K specific mRNA could be found. These results suggest a two-step activation mechanism leading to HERV-K transcription by transcription factor activation and 5'LTR demethylation. As it was shown in this work, both steps of transcription activation occur temporally und functionally independent. These results also implicate that the poor prognosis of melanoma patients with HERV-K expression could be due to a genome wide demethylation of retroviral elements which is associated with chromosomal instability and oncogene activation.

Furthermore, the impact of the accessory protein Rec on the gene expression profile of human cells was investigated. Therefore, the Rec protein was expressed in HEK-293 cells, known to express HERV-K on a very basal level. Following, changes on the cellular transcriptome were analyzed by expression array analysis. Verification of differentially regulated genes was done by the use of quantitative RT-real-time PCR. Thereby, five transcription factors (FGF18, ATF3, SOX30, ZNF91, ZNF256), known to activate cell proliferation, showed to be up-regulated and four splicing factors (PSF, FOX2, Cyclin L1 β , NFAR), known to regulate the process of alternative splicing, were changed in expression. Besides, an over-expression of the human splicing factors SF-9G8 and hnRNP-A1 in cell lines expressing HERV-K resulted in increased HERV-K env-mRNA levels. This activation of transcription factors and splicing factors after Rec expression could be a possible cause for pathogenic changes in HERV-K expressing cells.

A Literaturverzeichnis

- Agbottah, E. T., Traviss, C., McArdle, J., Karki, S., Laurent, G. C. S., and Kumar, A. 2007. Nuclear Factor 90(NF90) targeted to TAR RNA inhibits transcriptional activation of HIV-1. *Retrovirology*, 4:41.
- Akopov, S. B., Nikolaev, L. G., Khil, P. P., Lebedev, Y. B., and Sverdlov, E. D. 1998. Long terminal repeats of human endogenous retrovirus K family (HERV-K) specifically bind host cell nuclear proteins. *FEBS Lett*, 421(3):229–233.
- Ambrosetti, D. C., Basilico, C., and Dailey, L. 1997. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol Cell Biol*, 17(11):6321–6329.
- Appleton, K., Mackay, H. J., Judson, I., Plumb, J. A., McCormick, C., Strathdee, G., Lee, C., Barrett, S., Reade, S., Jadayel, D., Tang, A., Bellenger, K., Mackay, L., Setanoians, A., Schätzlein, A., Twelves, C., Kaye, S. B., and Brown, R. 2007. Phase I and pharmacodynamic trial of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine and carboplatin in solid tumors. *J Clin Oncol*, 25(29):4603–4609.
- Armbruster, V., Sauter, M., Krautkraemer, E., Meese, E., Kleiman, A., Best, B., Roemer, K., and Mueller-Lantzsch, N. 2002. A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res*, 8(6):1800–1807.
- Armbruster, V., Sauter, M., Roemer, K., Best, B., Hahn, S., Nty, A., Schmid, A., Philipp, S., Mueller, A., and Mueller-Lantzsch, N. 2004. Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X. *J Virol*, 78(19):10310–10319.
- Attwood, J. T., Yung, R. L., and Richardson, B. C. 2002. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci*, 59(2):241–257.

- Baca, L. M., Genis, P., Kalvakolanu, D., Sen, G., Meltzer, M. S., Zhou, A., Silverman, R., and Gendelman, H. E. 1994. Regulation of interferon-alpha-inducible cellular genes in human immunodeficiency virus-infected monocytes. *J Leukoc Biol*, 55(3):299–309.
- Bannert, N. and Kurth, R. 2006. The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 7:149–173.
- Bellefroid, E. J., Marine, J. C., Ried, T., Lecocq, P. J., Rivière, M., Amemiya, C., Poncelet, D. A., Coulie, P. G., de Jong, P., and Szpirer, C. 1993. Clustered organization of homologous KRAB zinc-finger genes with enhanced expression in human T lymphoid cells. *EMBO J*, 12(4):1363–1374.
- Berger, S. L. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 12(2):142–148.
- Best, S., Tissier, P. L., Towers, G., and Stoye, J. P. 1996. Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature*, 382(6594):826–829.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16(1):6–21.
- Black, A. C., Luo, J., Watanabe, C., Chun, S., Bakker, A., Fraser, J. K., Morgan, J. P., and Rosenblatt, J. D. 1995. Polypyrimidine tract-binding protein and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 bind to human T-cell leukemia virus type 2 RNA regulatory elements. *J Virol*, 69(11):6852–6858.
- Blaise, S., de Parseval, N., Bénit, L., and Heidmann, T. 2003. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(22):13013–13018.
- Blaise, S., de Parseval, N., and Heidmann, T. 2005. Functional characterization of two newly identified Human Endogenous Retrovirus coding envelope genes. *Retrovirology*, 2:19.
- Bénit, L., Dessen, P., and Heidmann, T. 2001. Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. *J Virol*, 75(23):11709–11719.
- Boese, A., Galli, U., Geyer, M., Sauter, M., and Mueller-Lantzsch, N. 2001. The Rev/Rex homolog HERV-K cORF multimerizes via a C-terminal domain. *FEBS Lett*, 493(2-3):117–121.

- Boese, A., Sauter, M., Galli, U., Best, B., Herbst, H., Mayer, J., Kremmer, E., Roemer, K., and Mueller-Lantsch, N. 2000a. 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 Mueller-Lantsch, N. 2000b. A rev-like NES mediates cytoplasmic localization of HERV-K cORF. *FEBS Lett*, 468(1):65–67.
- Boller, K., Frank, H., Löwer, J., Löwer, R., and Kurth, R. 1983. Structural organization of unique retrovirus-like particles budding from human teratocarcinoma cell lines. *J Gen Virol*, 64 (Pt 12):2549–2559.
- Boller, K., Schönfeld, K., Lischer, S., Fischer, N., Hoffmann, A., Kurth, R., and Tönjes, R. R. 2008. Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *J Gen Virol*, 89(Pt 2):567–572.
- Bower, M., Palmieri, C., and Dhillon, T. 2006. AIDS-related malignancies: changing epidemiology and the impact of highly active antiretroviral therapy. *Curr Opin Infect Dis*, 19(1):14–19.
- Brenner, C. and Fuks, F. 2006. DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr Top Microbiol Immunol*, 301:45–66.
- Brero, A., Leonhardt, H., and Cardoso, M. C. 2006. Replication and translation of epigenetic information. *Curr Top Microbiol Immunol*, 301:21–44.
- Brown, T. 2006. *Genomes 3*. Garland Science, third edition.
- Büscher, K. 2006. *Expression und biologische Funktion von humanen endogenen Retroviren (HERVs), insbesondere von HERV-K*. PhD thesis, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Büscher, K., Hahn, S., Hofmann, M., Trefzer, U., Ozel, M., Sterry, W., Löwer, J., Löwer, R., Kurth, R., and Denner, J. 2006. Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. *Melanoma Res*, 16(3):223–234.
- Büscher, K., Trefzer, U., Hofmann, M., Sterry, W., Kurth, R., and Denner, J. 2005. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res*, 65(10):4172–4180.

- Carey, T. E., Takahashi, T., Resnick, L. A., Oettgen, H. F., and Old, L. J. 1976. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(9):3278–3282.
- Cavaloc, Y., Popielarz, M., Fuchs, J. P., Gattoni, R., and Stévenin, J. 1994. Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: a novel 35 kDa factor of the serine/arginine protein family. *EMBO J*, 13(11):2639–2649.
- Cáceres, J. F., Sreaton, G. R., and Krainer, A. R. 1998. A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev*, 12(1):55–66.
- Choi, Y., Kappler, J. W., and Marrack, P. 1991. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumour virus. *Nature*, 350(6315):203–207.
- Christman, J. K. 2002. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21(35):5483–5495.
- Chudnovsky, Y., Khavari, P. A., and Adams, A. E. 2005. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest*, 115(4):813–824.
- Colmegna, I. and Garry, R. F. 2006. Role of endogenous retroviruses in autoimmune diseases. *Infect Dis Clin North Am*, 20(4):913–929.
- Conrad, B., Weissmahr, R. N., Böni, J., Arcari, R., Schüpbach, J., and Mach, B. 1997. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell*, 90(2):303–313.
- Cory, A. T., Boyer, A., Pilon, N., Lussier, J. G., and Silversides, D. W. 2007. Presumptive pre-Sertoli cells express genes involved in cell proliferation and cell signalling during a critical window in early testis differentiation. *Mol Reprod Dev*, 74(12):1491–1504.
- Cotton, L. M., O'Bryan, M. K., and Hinton, B. T. 2008. Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction. *Endocr Rev*, 29(2):193–216.

- Daskalos, A., Nikolaidis, G., Xinarianos, G., Savvari, P., Cassidy, A., Zakopoulou, R., Kot-sinas, A., Gorgoulis, V., Field, J. K., and Liloglou, T. 2009. Hypomethylation of retro-transposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 124(1):81–87.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R., and DeLuca, M. 1985. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(23):7870–7873.
- Denne, M., Sauter, M., Armbruster, V., Licht, J. D., Roemer, K., and Mueller-Lantzsch, N. 2007. Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Virol*, 81(11):5607–5616.
- Dodon, M. D., Hamaia, S., Martin, J., and Gazzolo, L. 2002. Heterogeneous nuclear ribo-nucleoprotein A1 interferes with the binding of the human T cell leukemia virus type 1 rex regulatory protein to its response element. *J Biol Chem*, 277(21):18744–18752.
- Doerfler, W. 2006. De novo methylation, long-term promoter silencing, methylation patterns in the human genome, and consequences of foreign DNA insertion. *Curr Top Microbiol Immunol*, 301:125–175.
- Domansky, A. N., Kopantzev, E. P., Snezhkov, E. V., Lebedev, Y. B., Leib-Mosch, C., and Sverdlov, E. D. 2000. Solitary HERV-K LTRs possess bi-directional promoter activity and contain a negative regulatory element in the U5 region. *FEBS Lett*, 472(2-3):191–195.
- Dong, B., Horowitz, D. S., Kobayashi, R., and Krainer, A. R. 1993. Purification and cDNA cloning of HeLa cell p54nrb, a nuclear protein with two RNA recognition motifs and extensive homology to human splicing factor PSF and *Drosophila* NONA/BJ6. *Nucleic Acids Res*, 21(17):4085–4092.
- Dupressoir, A., Vernochet, C., Bawa, O., Harper, F., Pierron, G., Opolon, P., and Heidmann, T. 2009. Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(29):12127–12132.
- Emerman, M. and Malim, M. H. 1998. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unrave-ling viral and host cell biology. *Science*, 280(5371):1880–1884.

- Erickson, A. K. and Gale, M. 2008. Regulation of interferon production and innate antiviral immunity through translational control of IRF-7. *Cell Res*, 18(4):433–435.
- Esnault, C., Maestre, J., and Heidmann, T. 2000. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet*, 24(4):363–367.
- Esteller, M. 2003. Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer. *Adv Exp Med Biol*, 532:39–49.
- Esteller, M. 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*, 8(4):286–298.
- Fan, H. 1994. *Retroviruses and their role in cancer*, volume 3 of *The Retroviridae*. Plenum Press, New York.
- Fearon, E. R. 1999. Cancer progression. *Curr Biol*, 9(23):R873–R875.
- Flockerzi, A., Ruggieri, A., Frank, O., Sauter, M., Maldener, E., Kopper, B., Wullich, B., Seifarth, W., Müller-Lantsch, N., Leib-Mösch, C., Meese, E., and Mayer, J. 2008. Expression patterns of transcribed human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) loci in human tissues and the need for a HERV Transcriptome Project. *BMC Genomics*, 9:354.
- Florl, A. R., Löwer, R., Schmitz-Dräger, B. J., and Schulz, W. A. 1999. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer*, 80(9):1312–1321.
- Fujinami, R. S., von Herrath, M. G., Christen, U., and Whitton, J. L. 2006. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev*, 19(1):80–94.
- Furano, A. V. 2000. The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 64:255–294.
- Galli, U. M., Sauter, M., Lecher, B., Maurer, S., Herbst, H., Roemer, K., and Mueller-Lantsch, N. 2005. Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. *Oncogene*, 24(19):3223–3228.

- Garcia, M., Jemal, A., Ward, E., Center, M., Hao, Y., Siegel, R., and Thun, M. 2007. Global Cancer Facts & Figures 2007. *American Cancer Society*.
- Gifford, R. and Tristem, M. 2003. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes*, 26(3):291–315.
- Gozani, O., Patton, J. G., and Reed, R. 1994. A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *EMBO J*, 13(14):3356–3367.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1):59–74.
- Grassmann, R., Aboud, M., and Jeang, K.-T. 2005. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene*, 24(39):5976–5985.
- Götzinger, N., Sauter, M., Roemer, K., and Mueller-Lantsch, N. 1996. Regulation of human endogenous retrovirus-K Gag expression in teratocarcinoma cell lines and human tumours. *J Gen Virol*, 77 (Pt 12):2983–2990.
- Gupta, A., Godwin, A. K., Vanderveer, L., Lu, A., and Liu, J. 2003. Hypomethylation of the synuclein gamma gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 63(3):664–673.
- Hahn, S., Ugurel, S., Hanschmann, K.-M., Strobel, H., Tondera, C., Schadendorf, D., Löwer, J., and Löwer, R. 2008. Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 24(5):717–723.
- Hai, T., Wolfgang, C. D., Marsee, D. K., Allen, A. E., and Sivaprasad, U. 1999. ATF3 and stress responses. *Gene Expr*, 7(4-6):321–335.
- Hajihosseini, M. K. and Heath, J. K. 2002. Expression patterns of fibroblast growth factors-18 and -20 in mouse embryos is suggestive of novel roles in calvarial and limb development. *Mech Dev*, 113(1):79–83.
- Han, Z. G., Zhang, Q. H., Ye, M., Kan, L. X., Gu, B. W., He, K. L., Shi, S. L., Zhou, J., Fu, G., Mao, M., Chen, S. J., Yu, L., and Chen, Z. 1999. Molecular cloning of six no-

- vel Krüppel-like zinc finger genes from hematopoietic cells and identification of a novel transregulatory domain KRNB. *J Biol Chem*, 274(50):35741–35748.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70.
- Herbst, H., Sauter, M., Kühler-Obbarius, C., Löning, T., and Mueller-Lantzsch, N. 1998. Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in germ cell and trophoblastic tumours. *APMIS*, 106(1):216–220.
- Herbst, H., Sauter, M., and Mueller-Lantzsch, N. 1996. Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. *Am J Pathol*, 149(5):1727–1735.
- Hess, J., Angel, P., and Schorpp-Kistner, M. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, 117(Pt 25):5965–5973.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11(9):1026–1030.
- Howard, G., Eiges, R., Gaudet, F., Jaenisch, R., and Eden, A. 2008. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene*, 27(3):404–408.
- Howell, P. M., Liu, S., Ren, S., Behlen, C., Fodstad, O., and Riker, A. I. 2009. Epigenetics in human melanoma. *Cancer Control*, 16(3):200–218.
- Huang, Y. and Steitz, J. A. 2001. Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell*, 7(4):899–905.
- Hughes, J. F. and Coffin, J. M. 2001. Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution. *Nat Genet*, 29(4):487–489.
- Imabayashi, H., Mori, T., Gojo, S., Kiyono, T., Sugiyama, T., Irie, R., Isogai, T., Ichi Hata, J., Toyama, Y., and Umezawa, A. 2003. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res*, 288(1):35–50.
- Itescu, S. and Winchester, R. 1992. Diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome: a disorder occurring in human immunodeficiency virus-1 infection that may present as a sicca syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*, 18(3):683–697.

- Jacquet, S., Decimo, D., Muriaux, D., and Darlix, J.-L. 2005. Dual effect of the SR proteins ASF/SF2, SC35 and 9G8 on HIV-1 RNA splicing and virion production. *Retrovirology*, 2:33.
- Jaenisch, R. 1997. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet*, 13(8):323–329.
- Janz, M., Hummel, M., Truss, M., Wollert-Wulf, B., Mathas, S., Jöhrens, K., Hagemeyer, C., Bommert, K., Stein, H., Dörken, B., and Bargou, R. C. 2006. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by high constitutive expression of activating transcription factor 3 (ATF3), which promotes viability of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*, 107(6):2536–2539.
- Jones, P. A. 1999. The DNA methylation paradox. *Trends Genet*, 15(1):34–37.
- Kamachi, Y., Sockanathan, S., Liu, Q., Breitman, M., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. 1995. Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *EMBO J*, 14(14):3510–3519.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. 1998. Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development*, 125(13):2521–2532.
- Kamradt, T. and Mitchison, N. A. 2001. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med*, 344(9):655–664.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O., and Akira, S. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*, 6(10):981–988.
- Kaye, B. R. 1989. Rheumatologic manifestations of infection with human immunodeficiency virus (HIV). *Ann Intern Med*, 111(2):158–167.
- Kim, J., Kollhoff, A., Bergmann, A., and Stubbs, L. 2003. Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Hum Mol Genet*, 12(3):233–245.

- Knössl, M., Löwer, R., and Löwer, J. 1999. Expression of the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K is enhanced by cellular transcription factor YY1. *J Virol*, 73(2):1254–1261.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4):693–705.
- Kovalskaya, E., Buzdin, A., Gogvadze, E., Vinogradova, T., and Sverdlov, E. 2006. Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions. *Virology*, 346(2):373–378.
- Kowalski, P. E., Freeman, J. D., and Mager, D. L. 1999. Intergenic splicing between a HERV-H endogenous retrovirus and two adjacent human genes. *Genomics*, 57(3):371–379.
- Kraft, M. 2004. *Analyse der transkriptionellen Regulation des humanen endogenen Retrovirus HTDV/HERV-K*. PhD thesis, Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
- Krasnoselskaya-Riz, I., Spruill, A., Chen, Y.-W., Schuster, D., Teslovich, T., Baker, C., Kumar, A., and Stephan, D. A. 2002. Nuclear factor 90 mediates activation of the cellular antiviral expression cascade. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 18(8):591–604.
- Krecic, A. M. and Swanson, M. S. 1999. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*, 11(3):363–371.
- Krishnan, V. and Zeichner, S. L. 2004. Host cell gene expression during human immunodeficiency virus type 1 latency and reactivation and effects of targeting genes that are differentially expressed in viral latency. *J Virol*, 78(17):9458–9473.
- Kundu, M., Sharma, S., Luca, A. D., Giordano, A., Rappaport, J., Khalili, K., and Amini, S. 1998. HIV-1 Tat elongates the G1 phase and indirectly promotes HIV-1 gene expression in cells of glial origin. *J Biol Chem*, 273(14):8130–8136.
- Kwun, H. J., Han, H. J., Lee, W. J., Kim, H. S., and Jang, K. L. 2002. Transactivation of the human endogenous retrovirus K long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 0. *Virus Res*, 86(1-2):93–100.

- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., and Gage, D. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921.
- Lavie, L., Kitova, M., Maldener, E., Meese, E., and Mayer, J. 2005. CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *J Virol*, 79(2):876–883.
- Lavillette, D., Marin, M., Ruggieri, A., Mallet, F., Cosset, F.-L., and Kabat, D. 2002. The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *J Virol*, 76(13):6442–6452.
- Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D., and Wolffe, A. P. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 72(1):73–84.
- Lee, Y. N. and Bieniasz, P. D. 2007. Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog*, 3(1):e10.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J. L. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4):707–719.
- Lifson, J. D., Reyes, G. R., McGrath, M. S., Stein, B. S., and Engleman, E. G. 1986. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science*, 232(4754):1123–1127.
- Liu, Z., Lavine, K. J., Hung, I. H., and Ornitz, D. M. 2007. FGF18 is required for early chondrocyte proliferation, hypertrophy and vascular invasion of the growth plate. *Dev Biol*, 302(1):80–91.
- Loyer, P., Trembley, J. H., Grenet, J. A., Busson, A., Corlu, A., Zhao, W., Kocak, M., Kidd, V. J., and Lahti, J. M. 2008. Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection. *J Biol Chem*, 283(12):7721–7732.
- Löwer, R., Boller, K., Hasenmaier, B., Korbmacher, C., Müller-Lantzsch, N., Löwer, J., and Kurth, R. 1993. Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(10):4480–4484.

- Löwer, R., Löwer, J., Frank, H., Harzmann, R., and Kurth, R. 1984. Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J Gen Virol*, 65 (Pt 5):887–898.
- Löwer, R., Tönjes, R. R., Boller, K., Denner, J., Kaiser, B., Phelps, R. C., Löwer, J., Kurth, R., Badenhop, K., Donner, H., Usadel, K. H., Miethke, T., Lapatschek, M., and Wagner, H. 1998. Development of insulin-dependent diabetes mellitus does not depend on specific expression of the human endogenous retrovirus HERV-K. *Cell*, 95(1):11–4; discussion 16.
- Löwer, R., Tönjes, R. R., Korbmacher, C., Kurth, R., and Löwer, J. 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.
- Macfarlane, C. and Simmonds, P. 2004. Allelic variation of HERV-K(HML-2) endogenous retroviral elements in human populations. *J Mol Evol*, 59(5):642–656.
- Mager, D. L., Hunter, D. G., Schertzer, M., and Freeman, J. D. 1999. Endogenous retroviruses provide the primary polyadenylation signal for two new human genes (HHLA2 and HHLA3). *Genomics*, 59(3):255–263.
- Magin, C., Löwer, R., and Löwer, 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.
- Mamedov, I., Lebedev, Y., Hunsmann, G., Khusnutdinova, E., and Sverdlov, E. 2004. A rare event of insertion polymorphism of a HERV-K LTR in the human genome. *Genomics*, 84(3):596–599.
- Mangeny, M., de Parseval, N., Thomas, G., and Heidmann, T. 2001. The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol*, 82(Pt 10):2515–2518.
- Mangeny, M. and Heidmann, T. 1998. Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25):14920–14925.
- Mangeny, M., Pothlichet, J., Renard, M., Ducos, B., and Heidmann, T. 2005. Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo. *Cancer Res*, 65(7):2588–2591.

- Mangeny, M., Renard, M., Schlecht-Louf, G., Bouallaga, I., Heidmann, O., Letzelter, C., Richaud, A., Ducos, B., and Heidmann, T. 2007. Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(51):20534–20539.
- Mao, F., Leung, W.-Y., and Xin, X. 2007. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol*, 7:76.
- Markus, J., Garin, M. T., Bies, J., Galili, N., Raza, A., Thirman, M. J., Beau, M. M. L., Rowley, J. D., Liu, P. P., and Wolff, L. 2007. Methylation-independent silencing of the tumor suppressor INK4b (p15) by CBFbeta-SMMHC in acute myelogenous leukemia with inv(16). *Cancer Res*, 67(3):992–1000.
- Mauger, D. M., Lin, C., and Garcia-Blanco, M. A. 2008. hnRNP H and hnRNP F complex with Fox2 to silence fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIc. *Mol Cell Biol*, 28(17):5403–5419.
- mei Shen, H., Nakamura, A., Sugimoto, J., Sakumoto, N., Oda, T., Jinno, Y., and Okazaki, Y. 2006. Tissue specificity of methylation and expression of human genes coding for neuropeptides and their receptors, and of a human endogenous retrovirus K family. *J Hum Genet*, 51(5):440–450.
- Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G. M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X. Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J. C., and McCoy, J. M. 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403(6771):785–789.
- Miyazaki, K., Inoue, S., Yamada, K., Watanabe, M., Liu, Q., Watanabe, T., Adachi, M. T., Tanaka, Y., and Kitajima, S. 2009. Differential usage of alternate promoters of the human stress response gene ATF3 in stress response and cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 37(5):1438–1451.
- Monk, M. 1995. Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev Genet*, 17(3):188–197.
- Mori, T., O’Day, S. J., Umetani, N., Martinez, S. R., Kitago, M., Koyanagi, K., Kuo, C., Takeshima, T.-L., Milford, R., Wang, H.-J., Vu, V. D., Nguyen, S. L., and Hoon, D. S. B.

2005. Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. *J Clin Oncol*, 23(36):9351–9358.
- Muster, T., Waltenberger, A., Grassauer, A., Hirschl, S., Caucig, P., Romirer, I., Födinger, D., Seppeler, H., Schanab, O., Magin-Lachmann, C., Löwer, R., Jansen, B., Pehamberger, H., and Wolff, K. 2003. An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res*, 63(24):8735–8741.
- Najera, I., Krieg, M., and Karn, J. 1999. Synergistic stimulation of HIV-1 rev-dependent export of unspliced mRNA to the cytoplasm by hnRNP A1. *J Mol Biol*, 285(5):1951–1964.
- Nishigaki, M., Aoyagi, K., Danjoh, I., Fukaya, M., Yanagihara, K., Sakamoto, H., Yoshida, T., and Sasaki, H. 2005. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res*, 65(6):2115–2124.
- Nishimura, T., Narita, T., Miyazaki, E., Ito, T., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Martial, J. A., Bellfroid, E. J., Vissing, H., and Taniyama, T. 2001. Characterization of the human Fc gamma RIIB gene promoter: human zinc-finger proteins (ZNF140 and ZNF91) that bind to different regions function as transcription repressors. *Int Immunol*, 13(8):1075–1084.
- Nishioka, K., Sumida, T., and Hasunuma, T. 1996. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. *Arthritis Rheum*, 39(8):1410–1418.
- Ohbayashi, N., Shibayama, M., Kurotaki, Y., Imanishi, M., Fujimori, T., Itoh, N., and Takada, S. 2002. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev*, 16(7):870–879.
- Olek, A., Oswald, J., and Walter, J. 1996. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res*, 24(24):5064–5066.
- Ono, M. 1986. Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes. *J Virol*, 58(3):937–944.
- 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.

- Ooi, S. K. T. and Bestor, T. H. 2008. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*, 133(7):1145–1148.
- Ornitz, D. M. and Itoh, N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*, 2(3):REVIEWS3005.
- Orphanides, G. and Reinberg, D. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell*, 108(4):439–451.
- Osaki, E., Nishina, Y., Inazawa, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Ohsugi, M., Tezuka, T., Yoshida, M., and Semba, K. 1999. Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res*, 27(12):2503–2510.
- Oshimo, Y., Nakayama, H., Ito, R., Kitadai, Y., Yoshida, K., Chayama, K., and Yasui, W. 2003. Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma. *Int J Oncol*, 23(6):1663–1670.
- Palmarini, M., Hallwirth, C., York, D., Murgia, C., de Oliveira, T., Spencer, T., and Fan, H. 2000. Molecular cloning and functional analysis of three type D endogenous retroviruses of sheep reveal a different cell tropism from that of the highly related exogenous jaagsiekte sheep retrovirus. *J Virol*, 74(17):8065–8076.
- Patton, J. G., Mayer, S. A., Tempst, P., and Nadal-Ginard, B. 1991. Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. *Genes Dev*, 5(7):1237–1251.
- Pei, Y., Zhu, P., Dang, Y., Wu, J., Yang, X., Wan, B., Liu, J. O., Yi, Q., and Yu, L. 2008. Nuclear export of NF90 to stabilize IL-2 mRNA is mediated by AKT-dependent phosphorylation at Ser647 in response to CD28 costimulation. *J Immunol*, 180(1):222–229.
- Pelzer, A. E., Bektic, J., Haag, P., Berger, A. P., Pycha, A., Schäfer, G., Rogatsch, H., Horninger, W., Bartsch, G., and Klocker, H. 2006. The expression of transcription factor activating transcription factor 3 in the human prostate and its regulation by androgen in prostate cancer. *J Urol*, 175(4):1517–1522.
- Peng, R., Dye, B. T., Pérez, I., Barnard, D. C., Thompson, A. B., and Patton, J. G. 2002. PSF and p54nrb bind a conserved stem in U5 snRNA. *RNA*, 8(10):1334–1347.

- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9):e45.
- Pfeifer, I., Elsby, R., Fernandez, M., Faria, P. A., Nussenzveig, D. R., Lossos, I. S., Fontoura, B. M. A., Martin, W. D., and Barber, G. N. 2008. NFAR-1 and -2 modulate translation and are required for efficient host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(11):4173–4178.
- Phelps, R. 1997. *Nachweis der mRNA- und Proteinexpression des humanen endogenen Retrovirus HERV-K in menschlichen Geweben und Zelllinien*. PhD thesis, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main (Germany).
- Ponthier, J. L., Schluepen, C., Chen, W., Lersch, R. A., Gee, S. L., Hou, V. C., Lo, A. J., Short, S. A., Chasis, J. A., Winkelmann, J. C., and Conboy, J. G. 2006. Fox-2 splicing factor binds to a conserved intron motif to promote inclusion of protein 4.1R alternative exon 16. *J Biol Chem*, 281(18):12468–12474.
- Poon, B., Grovit-Ferbas, K., Stewart, S. A., and Chen, I. S. 1998. Cell cycle arrest by Vpr in HIV-1 virions and insensitivity to antiretroviral agents. *Science*, 281(5374):266–269.
- Reus, K., Mayer, J., Sauter, M., Zischler, H., Müller-Lantzsch, N., and Meese, E. 2001. HERV-K(OLD): ancestor sequences of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *J Virol*, 75(19):8917–8926.
- Riker, A. I., Radfar, S., Liu, S., Wang, Y., and Khong, H. T. 2007. Immunotherapy of melanoma: a critical review of current concepts and future strategies. *Expert Opin Biol Ther*, 7(3):345–358.
- Robertson, K. D. and Jones, P. A. 2000. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21(3):461–467.
- Robertson, K. D. and Wolffe, A. P. 2000. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*, 1(1):11–19.
- Roeder, R. G. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, 21(9):327–335.
- Rogozin, I. B., Mayorov, V. I., Lavrentieva, M. V., Milanese, L., and Adkison, L. R. 2000. Prediction and phylogenetic analysis of mammalian short interspersed elements (SINEs). *Brief Bioinform*, 1(3):260–274.

- Ropers, D., Ayadi, L., Gattoni, R., Jacquenet, S., Damier, L., Branlant, C., and Stévenin, J. 2004. Differential effects of the SR proteins 9G8, SC35, ASF/SF2, and SRp40 on the utilization of the A1 to A5 splicing sites of HIV-1 RNA. *J Biol Chem*, 279(29):29963–29973.
- Ruda, V. M., Akopov, S. B., Trubetskoy, D. O., Manuylov, N. L., Vetchinova, A. S., Zavalova, L. L., Nikolaev, L. G., and Sverdlov, E. D. 2004. Tissue specificity of enhancer and promoter activities of a HERV-K(HML-2) LTR. *Virus Res*, 104(1):11–16.
- Ruprecht, K., Ferreira, H., Flockerzi, A., Wahl, S., Sauter, M., Mayer, J., and Mueller-Lantsch, N. 2008. Human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) RNA transcripts are selectively packaged into retroviral particles produced by the human germ cell tumor line Tera-1 and originate mainly from a provirus on chromosome 22q11.21. *J Virol*, 82(20):10008–10016.
- Ryo, A., Suzuki, Y., Arai, M., Kondoh, N., Wakatsuki, T., Hada, A., Shuda, M., Tanaka, K., Sato, C., Yamamoto, M., and Yamamoto, N. 2000. Identification and characterization of differentially expressed mRNAs in HIV type 1-infected human T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16(10):995–1005.
- Sarkar, D., Desalle, R., and Fisher, P. B. 2008. Evolution of MDA-5/RIG-I-dependent innate immunity: independent evolution by domain grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(44):17040–17045.
- Schaub, M. C., Lopez, S. R., and Caputi, M. 2007. Members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H family activate splicing of an HIV-1 splicing substrate by promoting formation of ATP-dependent spliceosomal complexes. *J Biol Chem*, 282(18):13617–13626.
- Schenk, T., Stengel, S., Goellner, S., Steinbach, D., and Saluz, H. P. 2007. Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer*, 46(9):796–804.
- Serafino, A., Balestrieri, E., Pierimarchi, P., Matteucci, C., Moroni, G., Oricchio, E., Rasi, G., Mastino, A., Spadafora, C., Garaci, E., and Vallebona, P. S. 2009. The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Exp Cell Res*, 315(5):849–862.

- Shim, J., Lim, H., Yates, J. R., and Karin, M. 2002. Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization. *Mol Cell*, 10(6):1331–1344.
- Shimokawa, T., Furukawa, Y., Sakai, M., Li, M., Miwa, N., Lin, Y.-M., and Nakamura, Y. 2003. Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex. *Cancer Res*, 63(19):6116–6120.
- Sigalotti, L., Fratta, E., Coral, S., Tanzarella, S., Danielli, R., Colizzi, F., Fonsatti, E., Traversari, C., Altomonte, M., and Maio, M. 2004. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res*, 64(24):9167–9171.
- Slotkin, R. K. and Martienssen, R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet*, 8(4):272–285.
- Smet, C. D., Backer, O. D., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., and Boon, T. 1996. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(14):7149–7153.
- Smit, A. F. 1996. The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr Opin Genet Dev*, 6(6):743–748.
- Sonvilla, G., Allerstorfer, S., Stättner, S., Karner, J., Klimpfinger, M., Fischer, H., Grasl-Kraupp, B., Holzmann, K., Berger, W., Wrba, F., Marian, B., and Grusch, M. 2008. FGF18 in colorectal tumour cells: autocrine and paracrine effects. *Carcinogenesis*, 29(1):15–24.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., and Futreal, P. A. 2009. The cancer genome. *Nature*, 458(7239):719–724.
- Stresemann, C. and Lyko, F. 2008. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer*, 123(1):8–13.
- Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M. P., Walker, J. R., and Hogenesch, J. B. 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(16):6062–6067.

- Suzuki, C., Murakumo, Y., Kawase, Y., Sato, T., Morinaga, T., Fukuda, N., Enomoto, A., Ichihara, M., and Takahashi, M. 2008. A novel GDNF-inducible gene, BMZF3, encodes a transcriptional repressor associated with KAP-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 366(1):226–232.
- Swartz, J. E., Bor, Y.-C., Misawa, Y., Rekosh, D., and Hammarskjold, M.-L. 2007. The shuttling SR protein 9G8 plays a role in translation of unspliced mRNA containing a constitutive transport element. *J Biol Chem*, 282(27):19844–19853.
- Tamura, K., Hua, B., Adachi, S., Guney, I., Kawauchi, J., Morioka, M., Tamamori-Adachi, M., Tanaka, Y., Nakabeppu, Y., Sunamori, M., Sedivy, J. M., and Kitajima, S. 2005. Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation. *EMBO J*, 24(14):2590–2601.
- Tange, T. O., Damgaard, C. K., Guth, S., Valcárcel, J., and Kjems, J. 2001. The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *EMBO J*, 20(20):5748–5758.
- Ting, C. N., Rosenberg, M. P., Snow, C. M., Samuelson, L. C., and Meisler, M. H. 1992. Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev*, 6(8):1457–1465.
- Turner, G., Barbulescu, M., Su, M., Jensen-Seaman, M. I., Kidd, K. K., and Lenz, J. 2001. Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol*, 11(19):1531–1535.
- Urcuqui-Inchima, S., Castaño, M. E., Hernandez-Verdun, D., St-Laurent, G., and Kumar, A. 2006. Nuclear Factor 90, a cellular dsRNA binding protein inhibits the HIV Rev-export function. *Retrovirology*, 3:83.
- Urnovitz, H. B. and Murphy, W. H. 1996. Human endogenous retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human disease. *Clin Microbiol Rev*, 9(1):72–99.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., and Gocayne, J. D. 2001. The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304–1351.

- Wang, A., Arantes, S., Yan, L., Kiguchi, K., McArthur, M. J., Sahin, A., Thames, H. D., Aldaz, C. M., and Macleod, M. C. 2008. The transcription factor ATF3 acts as an oncogene in mouse mammary tumorigenesis. *BMC Cancer*, 8:268.
- Wang, Q., Williamson, M., Bott, S., Brookman-Amisshah, N., Freeman, A., Nariculam, J., Hubank, M. J. F., Ahmed, A., and Masters, J. R. 2007. Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene*, 26(45):6560–6565.
- Wang-Johanning, F., Frost, A. R., Jian, B., Epp, L., Lu, D. W., and Johanning, G. L. 2003. Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene*, 22(10):1528–1535.
- Wei, W., Gilbert, N., Ooi, S. L., Lawler, J. F., Ostertag, E. M., Kazazian, H. H., Boeke, J. D., and Moran, J. V. 2001. Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol Cell Biol*, 21(4):1429–1439.
- Wilkie, A. L., Jordan, S. A., and Jackson, I. J. 2002. Neural crest progenitors of the melanocyte lineage: coat colour patterns revisited. *Development*, 129(14):3349–3357.
- Wood, K. V., de Wet, J. R., Dewji, N., and DeLuca, M. 1984. Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Commun*, 124(2):592–596.
- Woodland, D. L. 2002. Immunity and retroviral superantigens in humans. *Trends Immunol*, 23(2):57–58.
- Yang, G., Huang, S.-C., Wu, J. Y., and Benz, E. J. 2008. Regulated Fox-2 isoform expression mediates protein 4.1R splicing during erythroid differentiation. *Blood*, 111(1):392–401.
- Yoder, J. A., Walsh, C. P., and Bestor, T. H. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 13(8):335–340.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. 1990. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*, 265(28):17174–17179.
- Zbytek, B., Carlson, J. A., Granese, J., Ross, J., Mihm, M. C., and Slominski, A. 2008. Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev Dermatol*, 3(5):569–585.

- Zhang, C., Zhang, Z., Castle, J., Sun, S., Johnson, J., Krainer, A. R., and Zhang, M. Q. 2008. Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2. *Genes Dev*, 22(18):2550–2563.
- Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J. M., Gygi, S., and Krug, R. M. 2005. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(29):10200–10205.
- Zolotukhin, A. S., Michalowski, D., Bear, J., Smulevitch, S. V., Traish, A. M., Peng, R., Patton, J., Shatsky, I. N., and Felber, B. K. 2003. PSF acts through the human immunodeficiency virus type 1 mRNA instability elements to regulate virus expression. *Mol Cell Biol*, 23(18):6618–6630.

B Zelllinien und Zellkulturmedien

Tabelle B.1: Verwendete Zelllinien, Herkunft und Zellkulturmedien

Zelllinie	Biologische Herkunft	Etabliert	Medium
GH	Teratokarzinom	PEI, Langen	1
HEK-293	Embryonale Nierenzellen	CRL-1573.3	1
HeLa	zervikales Adenokarzinom	CCL-2	1
TZMbl	zervikales Adenokarzinom	[Wei,2002]	1
SK-MEL-13	Malignes Melanom	[CAREY,1976]	2
SK-MEL-19	Malignes Melanom	[CAREY,1976]	2
SK-MEL-24	Malignes Melanom	[CAREY,1976]	3
SK-MEL-28	Malignes Melanom	[CAREY,1976]	3
SK-MEL-37	Malignes Melanom	[CAREY,1976]	2
KU	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
RA	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
SchM	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
SchW	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
TR	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
ZD	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
GZ27	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
HE	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
JR	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
LA	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
LAE	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
Nah	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
Pos1	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
SU	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
U1	Malignes Melanom	Charite Berlin	4
WE	Malignes Melanom	Charite Berlin	4

Tabelle B.2: Zusammensetzung der Zellkulturmedien für die humanen Zelllinien

Medium	Mediumzusammensetzung
1	DMEM inkl. 4,5 g/L Glukose (Biochrom KG), 10% FKS (Biochrom), 2 mM L-Glutamin(Biochrom), 100 U/ml Penicillin (Biochrom), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom), 15 mM HEPES (Biochrom)
2	DMEM inkl. 4,5 g/L Glukose (Biochrom KG), 15% FKS (Biochrom), 2 mM L-Glutamin(Biochrom), 100 U/ml Penicillin (Biochrom), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom), 15 mM HEPES (Biochrom), 1% Non Essential Amino Acids (Biochrom)
3	DMEM inkl. 4,5 g/L Glukose (Biochrom KG), 15% FKS (Biochrom), 2 mM L-Glutamin(Biochrom), 100 U/ml Penicillin (Biochrom), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom), 1,5 g/l Natrium-Hydrogencarbonat (Sigma), 1% (v/v) Non Essential Amino Acids (Biochrom), 1 mM Natrium Pyruvat (Biochrom)
4	RPMI (Invitrogen), 10% FKS (Biochrom), 2 mM L-Glutamin(Biochrom), 100 U/ml Penicillin (Biochrom), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom), 1,5 g/l Natrium-Hydrogencarbonat (Sigma), 1% (v/v) Non Essential Amino Acids (Biochrom), 1 mM Natrium Pyruvat (Biochrom)

C Oligonukleotide

Tabelle C.1: PCR-Primer für die Quantifizierung der HERV-K mRNA-Spezies mittels real-time PCR. Ori. bezeichnet die Binderichtung des Primers relativ zur Richtung des Gens (FW=Forward, Rev=Revers).

Name	Ori.	Sequenz	Funktion/Besonderheit
GUS-B	FW	AAA CGA TTG CAG GGT TTC ACC	Normalisierung real-time PCR Haushaltsgen
GUS-B	REV	GCG TTT TTG ATC CAG ACC CA	Normalisierung real-time PCR Haushaltsgen
ACT-B	FW	CCT CGC CTT TGC CGA TCC	Normalisierung real-time PCR Haushaltsgen
ACT-B	REV	GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC	Normalisierung real-time PCR Haushaltsgen
Pfor	FW	CCA ACG TGG AGG CTT TTC TCT AG	real-time PCR HERV-K
PENV	REV	AGG GAG ACT TAC CAC CAT TGA TAC	real-time PCR HERV-K <i>env</i>
PREC	REV	GGG TAT ACC TGC AGA CAC CAT TG	real-time PCR HERV-K <i>rec</i>
PNP9	REV	TGG GTA CAC CTG CAG ACA TCT C	real-time PCR HERV-K <i>np9</i>

C Oligonukleotide

Tabelle C.2: PCR-Primer für die Klonierung der HERV-K108 5'LTR Deletionskonstrukte, die *np9*-Gensynthese, die Gfp-Klonierung und Spleißfaktor-Klonierung. Ori. bezeichnet die Binderichtung des Primers relativ zur Richtung des Gens (FW=Forward, Rev=Revers).

Name	Ori.	Sequenz	Funktion
Promotordeletion/LTR-Klonierung:			
K108 -283bp	FW	ACT GAA GAG CTC TGA CGT TTG GGC TTC TAT CC	<i>SacI</i> Schnittstelle
K108 +1bp	FW	GAG ATG GAG CTC TGT GGG GAA AAG CAA GAG AG	<i>SacI</i> Schnittstelle
K108 +267bp	FW	CCA CTC GAG CTC CTC AAG TAC CCA GGG ACA CAA	<i>SacI</i> Schnittstelle
K108 +456bp	FW	AGT AAA GAG CTC AGG AAT GCC TCT TGC AGT TG	<i>SacI</i> Schnittstelle
K108 +616bp	FW	GGC AGC GAG CTC GCT TTG TAA AGC ACT GAG ATG TTT ATG	<i>SacI</i> Schnittstelle
K108 +800bp	REV	GAG TTC GCT AGC TAT TTA TTG ATC ATC TGT GGG TGT T	<i>NheI</i> Schnittstelle
K108 +961bp	REV	CCA GAT GCT AGC GTG GGT TGC CCC TAC ACA	<i>NheI</i> Schnittstelle
K108 +1255bp	REV	TTG TTC GCT AGC CCA TGG GCA AAA TTG TTC TA	<i>NheI</i> Schnittstelle
<i>np9</i> -Gensynthese:			
NP9 22Q11 (1-50 NT)	FW	AGC GCA GCT AGC GCC GCC ACC ATG AAC CCT AGC GAG ATG CAG CGC AAG GG	Gensynthese <i>NheI</i> Schnittstelle
NP9 22Q11 (24-74 NT)	REV	TGC AGG CAC CAG CGG CGA GGA GGG CCC TTG CGC TGC ATC TCG CTA GGG TTC	Gensynthese
NP9 22Q11 (51-102 NT)	FW	CCC TCC TCG CCG CTG GTG CCT GCA GGT GTA CCC TAC CGC CCC TAA GCG CCA G	Gensynthese
NP9 22Q11 (75-125NT)	REV	TCG TGG CCG GTG CGG CTA GGG CGC TGG CGC TTA GGG GCG GTA GGG TAC ACC	Gensynthese

NP9 22Q11 (103-153 NT)	FW	CGC CCT AGC CGC ACC GGC CAC GAC GAC GAC GGC GGC TTC GTG GAG AAG AAG	Gensynthese
NP9 22Q11 (126-176 NT)	REV	TGC TTC TCG CCG CAC TTG CCG CGC TTC TTC TCC ACG AAG CCG CCG TCG TCG	Gensynthese
NP9 5Q33 (154-204 NT)	FW	GCG GCA AGT GCG GCG AGA AGC AGG AGC GCA GCA ACT GCT ACT GCG TGT GC	Gensynthese
NP9 5Q33 (177-227 NT)	REV	GGC GGT GGC GGC TGC GCT CCA CGC ACA CGC AGT AGC AGT TGC TGC GCT CC	Gensynthese
NP9 22Q11 (205-258 NT)	FW	GTG GAG CGC AGC CGC CAC CGC CGC CTG CAC TTC GTG ATG TGC ACC GGT AGC GCG	Gensynthese
NP9 22Q11 (228-258 NT)	REV	CGC GCT ACC GGT GCA CAT CAC GAA GTG CAG G	Gensynthese <i>AgeI</i> Schnittstelle

Gfp-Klonierungsprimer:

Gfp-pVLTH	FW	GTC GTG ACC GGT ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA	<i>AgeI</i> Schnittstelle
Gfp-pVLTH	REV	CGC GCT ACC GGT CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	<i>AgeI</i> Schnittstelle
Gfp-Kozak	FW	AGC GCA GCT AGC GCC GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA	<i>NheI</i> Schnittstelle/ Kozak

Spleißfaktoren:

9G8	FW	CCT CTC GAG GCC GCC ACC ATG TCG CGT TAC GGG CGG	<i>XhoI</i> Schnittstelle/ Kozak
9G8 pCDNA	REV	GTG GGG CCC CCG TCC ATT CTT TCA GGA CTT G	<i>ApaI</i> Schnittstelle
9G8 pmCherry-N1	REV	GTG GGG CCC CGT CCA TTC TTT CAG GAC TTG	<i>ApaI</i> Schnittstelle
hnRNP-A1	FW	CGG CTC GAG GCC GCC ACC ATG TCT AAG TCA GAG TCT CCT AAA GA	<i>XhoI</i> Schnittstelle/ Kozak
hnRNP-A1 pCDNA	REV	TTG GG CCC CCA AAT CTT CTG CCA CTG CCA	<i>ApaI</i> Schnittstelle

C Oligonukleotide

hnRNP-A1 pmCherry-N1 REV TTG GGC CCC AAA TCT TCT GCC *Apal* Schnittstelle
ACT GCC A

Sequenzierungsprimer:

T7 promotor	-	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierung
T7 terminator	-	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	Sequenzierung
M13	FW	GTA AAA CGA CGG CCA GT	Sequenzierung
M13	REV	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Sequenzierung
CMV-Primer	FW	GCG TGG ATA GCG GTT TGA CTC	Sequenzierung
RVprimer3	FW	CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC	Sequenzierung
GLprimer2	REV	CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA	Sequenzierung pGL3-basic pGL3-basic

Tabelle C.3: PCR-Primer für die Bestimmung des HERV-K Methylierungsgrades von zehn Proviren und zwei solo-LTRs und für die Bisulfit-Sequenzierung von HERV-K108 (FW=Forward, Rev=Revers).

Name	Ori.	Sequenz	Funktion/Besonderheit
Primer methylierungssensitive PCR:			
1q22	FW	GCA CCC TGG AAA GTA AAG GA	Bindung vor HERV-K 1q22
1q23.3	FW	CAT GGG TCC TGG TAA AGT GG	Bindung vor HERV-K 1q23.3
3q12	FW	CTT CTC AGG TGT GGG AAG GA	Bindung vor HERV-K 3q12.3
3q13	FW	TTT CAG ACT TTC CTA TCT GAC CTC	Bindung vor HERV-K 3q13.2
5q13	FW	CCT GGG ATG CAA GTC TTG TT	Bindung vor HERV-K 5q13.3
5q33	FW	ACC CAA CCT GCA TGG TTT TT	Bindung vor HERV-K 5q33.3
7p22	FW	TAC AGG AGT GCG CCA TCA C	Bindung vor HERV-K 7p22.1
11q22	FW	CAA CAA ACA CTT CCA TGC TCA	Bindung vor HERV-K 11q22.1
12q11	FW	AAA ACC AAA GGA ACG TGC TG	Bindung vor HERV-K 12q14.1
22q11	FW	TAC AGG CTG GAC TGC ACC TA	Bindung vor HERV-K 22q11.21
Solo 7p21	FW	CCA ACA CAT AAT GAC TCC ATC C	Bindung vor HERV-K 7p21.1
Solo 19q13	FW	CTG TGG CCC AAG CTG ATA CT	Bindung vor HERV-K 19q13.13
K108 +961 rev	REV	TGT GTA GGG GCA ACC CAC	Bindung innerhalb HERV-K 7p22.1
Primer Bisulfit-Sequenzierung:			
BSS-K108-183fw	FW	TTG TTG TTT AGG TTG GAG TGT	BSS HERV-K108 nested PCR 1
BSS-K108+1306rev	REV	TTC CTT ACC AAT TCT TTT CCA A	BSS HERV-K108 nested PCR 1
BSS-K108-40fw	FW	TTT TAA GTA GTT AGG GTT ATA	BSS HERV-K108 nested PCR 2
BSS-K108+1121rev	REV	ATT TAC CCC ATT ATC ACC CTA A	BSS HERV-K108 nested PCR 2

C Oligonukleotide

Tabelle C.4: PCR-Primer für die Quantifizierung der Affymetrix-Chip-Gene mittels real-time PCR. Ori. bezeichnet die Binderichtung des Primers relativ zur Richtung des Gens (FW=Forward, Rev=Revers).

Name	Ori.	Sequenz	Funktion/Besonderheit
FGF18	FW	ACA GTC CCT TTG CGT GAG TC	real-time PCR
FGF18	REV	CCA CAC TCA CAC TCC CAG AA	real-time PCR
Malat	FW	AGC AAA AGA TGC TGG TGG TT	real-time PCR
Malat	REV	GTG CTG TTA CCT CCC ACC TC	real-time PCR
ISGF3	FW	GGG TTT GAC AAG GTT CTT CC	real-time PCR
ISGF3	REV	GGA GGC CTC AGA TTG TAT GC	real-time PCR
CCL7	FW	GGA CAA GAA AAC CCA AAC TC	real-time PCR
CCL7	REV	CCA CCA AAA TCC ATG GAA GA	real-time PCR
HDAC3	FW	GAG GGA TGA ACG GGT AGA CA	real-time PCR
HDAC3	REV	TCC TCC CCA CAC TTG AAA AC	real-time PCR
SOX-30	FW	GTG AGG GGA AAG GGG AAA TA	real-time PCR
SOX-30	REV	ATC ACC CAG GTG CCA TTA AA	real-time PCR
DNA TOPO I	FW	GAG CAT TCG CTG TAC CCT TT	real-time PCR
DNA TOPO I	REV	GGA AAT GGA CTC TGC ACA CA	real-time PCR
hCAP	FW	AGG CCT GAA CTG CTT GAG TC	real-time PCR
hCAP	REV	ACA TCT CCC AAA CCA GTA GGT	real-time PCR
EED	FW	GCA GGG ATA GCA GCA TTC TT	real-time PCR
EED	REV	CAG CTC AGC CTG ATT GAA TG	real-time PCR
Cyclin L beta	FW	AGC CTG CAT CAG TTC TTG GT	real-time PCR
Cyclin L beta	REV	GGG CAT TTT AAT GTG CAA AAA	real-time PCR
ZNF256	FW	TAT GAA TGT GGG GAG TGT GG	real-time PCR
ZNF256	REV	TCT CCG GTG TGA CTT CTC CT	real-time PCR
NFAR	FW	TAG TAG GCC CTG GTC GTC AC	real-time PCR
NFAR	REV	CCA GAA GCT CCC AAC TAT GC	real-time PCR
RRN3 TIF-1A	FW	TTT TCC AGG GCT TTG TAT GC	real-time PCR
RRN3 TIF-1A	REV	TGG GGA ATT TCG TTT ACT CG	real-time PCR
ZNF91	FW	CCA CCT TAC TCA AGG GTG TAG G	real-time PCR
ZNF91	REV	AGG TAA TGG AGA CCG CAT TT	real-time PCR
PSF	FW	GGA AAT GCA TCT GGA GGC TA	real-time PCR
PSF	REV	AAC CCA CTT TCA CCC CCT AC	real-time PCR
MDA-5	FW	TGC AGT GTG CTA GCC TGT TC	real-time PCR
MDA-5	REV	TAA GCC TTT GTG CAC CAT CA	real-time PCR
SF-9G8	FW	CAG GCA TTC TCT AGC CTT GG	real-time PCR
SF-9G8	REV	TTC AGC CAG TCA AAA TTC CA	real-time PCR

RNA-BP-9	FW	GCA GTC AAG GAG GAA GGA GA	real-time PCR
RNA-BP-9	REV	TGC CTG TCA AAG ACC AGA AA	real-time PCR
KOX17 LE	FW	ACA GGT GGG CAA GTA TCA GG	real-time PCR
KOX17 LE	REV	ATG CTC AGA CAA GGG GAA GA	real-time PCR
Bromo-Prot2	FW	AAG GGC CCT GTT TTG AGA TT	real-time PCR
Bromo-Prot2	REV	AAT GGA GCG GAA GGA AAA AG	real-time PCR
ATF3	FW	TAG GCT GGA AGA GCC AAA GA	real-time PCR
ATF3	REV	TTC TCA CAG CTG CAA ACA CC	real-time PCR
DR1	FW	TAG ATT GTG GCT CCC AGG AT	real-time PCR
DR1	REV	TTT TCA CTT CAT GGG GGA AG	real-time PCR
hnRNP-Protein A1	FW	ATA CAA CCT GCT TGG GTG GA	real-time PCR
hnRNP-Protein A1	REV	TGC ATA GGA TGT GCC AAC AA	real-time PCR
ZN195 LV	FW	CAA ATG TGA CGA ATG TGG AAA	real-time PCR
ZN195 LV	REV	AGT GGG ATG CGA GCA GAT AC	real-time PCR
MEK5c	FW	CCA GGA CCA GTA ACC AAG GA	real-time PCR
MEK5c	REV	CGC CTT CAA ACC AGA AGG TA	real-time PCR
v-jun	FW	CCT CCT CCC CCA GCT ATC TA	real-time PCR
v-jun	REV	CCA CCA ATT CCT GCT TTG AG	real-time PCR
RIG-I	FW	GTT GTC CCC ATG CTG TTC TT	real-time PCR
RIG-I	REV	GAG GAG GCC TCA GGA AAC TT	real-time PCR
EIF5	FW	CAA TCC CAC TGG AAG CCT AA	real-time PCR
EIF5	REV	TCT TTC AGA TGT CCC TGC TTT	real-time PCR
hnRNP-Q	FW	TTT AAC AAT CCG CTT GGA CA	real-time PCR
hnRNP-Q	REV	CCA AAT GGA CTT GAG CCA AA	real-time PCR

D PCR-Protokolle

Kolonie-PCR

Tabelle D.1: PCR-Ansatz Kolonie-PCR

Reagenz	Endkonzentration	Temperatur	Zeit	Zyklen
dNTP Mix	0,2 mM	95°C	7 min	1
DMSO	5%			
MgCl ₂	3 mM	95°C	30 sec	32
Primer Fw	0,1 µM	55-60°C	20 sec	
Primer Rev	0,1 µM	72°C	60 sec/kb	
AmpliTaq Gold	1 U	72°C	10 min	1
10-fach PCR-Puffer	1-fach			
H ₂ O	add 20 µl	4°C	∞	

Fragment-PCR

Tabelle D.2: PCR-Ansatz PfuUltra-PCR

Reagenz	Endkonzentration	Temperatur	Zeit	Zyklen
dNTP Mix	0,2 mM	95°C	2 min	1
Template	50 ng genom. DNA			
DMSO	5%	95°C	30 sec	32
Primer Fw	0,2 µM	55-60°C	20 sec	
Primer Rev	0,2 µM	72°C	60 sec/kb	
PfuUltra	2,5 U	72°C	10 min	1
10-fach PCR-Puffer	1-fach			
H ₂ O	add 50 µl	4°C	∞	

Analytische-PCR

Tabelle D.3: PCR-Ansatz Analytische-PCR

Reagenz	Endkonzentration	Temperatur	Zeit	Zyklen
dNTP Mix	0,2 mM	95°C	7 min	1
Template	50 ng genom. DNA			
DMSO	5%	95°C	30 sec	23-28
Primer Fw	0,2 µM	55-60°C	20 sec	
Primer Rev	0,2 µM	72°C	60 sec/kb	
AmpliTaq Gold	1 U	72°C	7 min	1
10-fach PCR-Puffer	1-fach			
H ₂ O	add 15 µl	4°C	∞	

SYBR-GREEN real-time PCR

Tabelle D.4: SYBR-Green real-time PCR-Ansatz

Reagenz	Endkonzentration/ Volumen	Temperatur	Zeit	Zyklen
cDNA	5 µl	95°C	7 min	1
Primer Fw	0,1 µM	95°C	30 sec	40
Primer Rev	0,1 µM			
ROX	0,0625 µM	60°C	30 sec	
qPCR MasterMix (2x)	6 µl	72°C	60 sec/kb	
H ₂ O	add 12 µl	55°C ↑	30 sec	

EVA-GREEN real-time PCR

Tabelle D.5: EvaGreen real-time PCR-Ansatz

Reagenz	Endkonzentration/ Volumen	Temperatur	Zeit	Zyklen
cDNA	5 µl			
dNTPs	0,2 mM	95°C	7 min	1
Primer Fw	0,1 µM	95°C	30 sec	40
Primer Rev	0,1 µM	60°C	30 sec	
EG(20-fach)	1-fach	72°C	60 sec/kb	
ROX	0,0625 µM			
PCR-Puffer(10-fach)	1-fach	55°C ↑	30 sec	41
AmpliTaq Gold	1 U			
H ₂ O	add 20 µl			

Bisulfit-Sequenzierungs-PCR

Tabelle D.6: Bisulfit-Sequenzierungs-PCR

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit	Zyklen
H ₂ O	29,5 µl			
PCR-Puffer 10-fach	5 µl			
dNTPs(10mM)	1 µl	95°C	7 min	1
Mg ₂ Cl (25mM)	2 µl	95°C	30 sec	30
BSS-FW1 (10µM)	1 µl	55°C	30 sec	
BSS-REV1 (10µM)	1 µl	72°C	150 sec	
AmpliTaq Gold (5u/µl)	0,5 µl			
Template:	10 µl	72°C	5 min	1
		4°C	∞	

1.PCR: Agarose-Kugel
2.PCR: 1/100 1.PCR

E Liste differentiell Expremierter Gene Genchip1

Tabelle E.1: Differenziell exprimierte Gene Chip1

Gen Name	log2-Ratio	
	Chip1	Chip2
Erhöht		
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type22 (lymphoid)	6,5	-3,4
Homo sapiens regulated in glioma (rig)	4,9	0,0
Collagen, type X, alpha 1	3,5	-1,2
Putative alpha chemokine	3,2	0,0
Fibroblast growth factor 18	2,7	2,2
Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	2,4	-0,1
Histone deacetylase 3	2,3	0,6
Homo sapiens transcription factor ISGF-3	2,2	0,1
SWISNF related, matrix associated, actindependent regulator of chromatin	1,9	0,1
Human mRNA for tumor-associated 120 kDa nuclear protein p120	1,9	0,2
Leicht-Erhöht		
Human prostatic secretory protein 57	3,1	-0,3
Homo sapiens breast cancer nuclear receptor-binding auxiliary protein (BRX)	1,9	-0,4
Homo sapiens zinc finger protein 258 (ZNF258)	1,7	0,2
Huntingtons disease candidate region	1,7	-0,1
Fucosidase, alpha-L- 1, tissue	1,7	0,7
Epsilon-tubulin	1,6	0,6
Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)	1,4	-0,9
Mutant DNA polymerase beta	1,4	0,0

E Liste differentiell Expremierter Gene Genchip1

Human splicing factor SRp40-2 (SRp40)	1,2	0,5
Protein-tyrosine phosphatase	1,1	0,7
Verringert		
Solute carrier family 4, anion exchanger, member2	-3,2	0,1
Neuronal pentraxin receptor	-2,9	-1,9
Homo sapiens small inducible cytokine A7	-2,1	-1,1
Homo sapiens calreticulin (CALR)	-1,7	0,1
Homo sapiens pyruvate kinase, muscle (PKM2)	-1,6	-0,1
Homo sapiens megakaryocyte-associated tyrosine kinase (MATK)	-1,6	-0,3
Homo sapiens calmodulin 3 (CALM3)	-1,5	0,1
Insulin-like growth factor binding protein 5	-1,5	0,3
Muscle specific ring finger protein (MURF-2)	-1,5	0,3
Homo sapiens arrestin, beta 2 (ARRB2)	-1,3	-0,1
Leicht Verringert		
Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1	-1,2	0,4
Myocyte enhancer factor 2C	-0,7	0,0
Transport-secretion protein 2.2	-0,7	-0,5
Brain-specific protein p25 alpha	-0,7	0,1
Furin,membrane associated receptor protein)	-0,6	-0,4
Leucine zipper, down-regulated in cancer 1	-0,6	-0,1
Homeo box B7	-0,6	0,0
Tetratricopeptide repeat domain 3	-0,6	0,3
GASC-1	-0,6	0,1
Protein kinase PKNbeta	-0,5	-0,2

F Publikationsliste

Peer-Review Publikationen

Tino Schenk, **Sven Stengel**, Stefanie Goellner, Daniel Steinbach, Hans Peter Saluz

Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies. Genes, Chromosomes and Cancer Volume 46, Issue 9, Date: September 2007, Pages: 796-804

Sven Stengel, Uwe Fiebig, Reinhard Kurth, Joachim Denner

Regulation of human endogenous retrovirus-K expression in melanomas by CpG methylation. Genes, Chromosomes and Cancer; Date: Januar 2010

Published online ahead of print

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

.....

Sven Stengel

Berlin, 08. Februar 2010

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben:

Bei Prof. Dr. Reinhard Kurth bedanke ich mich ganz herzlich für die Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Robert Koch-Institut.

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

Herrn Dr. Joachim Denner danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung meiner Dissertation.

Für die Diskussionsbereitschaft und die zur Verfügung gestellten Expressionsplasmide bedanke ich mich bei Dr. Norbert Bannert.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Uwe Fiebig, Dr. Rayk Behrend, Johannes Neuhaus, Rico Blochmann und Christian Wurzbacher, mit denen ich interessante Diskussionen über fachliche Fragestellungen führen konnte.

Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe P13 für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre meinen Dank aussprechen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin, Doreen Ludwig, für die Durchsicht der Arbeit und die Unterstützung während der letzten Jahre.

Dr. Tony Bruns danke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit und Dr. Tino Schenk danke ich für die hilfreichen und interessanten Diskussionen.

Meinen Eltern, Karin und Horst Stengel, möchte ich an dieser Stelle für ihre Unterstützung herzlich danken.