

**Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur  
Bedeutung der endogenen retroviralen Insertion  
HERV-K(C4) im C4-Gen des Menschen**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades

**„Doktor der Naturwissenschaften“**

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Michaela Mack**

geb. am 26.09.1973 in Bad-Kreuznach

Mainz, 2004

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>0.</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Retroelemente .....</b>	<b>6</b>
1.1.1	Retroviren .....	7
1.1.2	Humane endogene Retroviren .....	10
<b>1.2</b>	<b>Die endogene retrovirale Insertion HERV-K(C4) .....</b>	<b>13</b>
1.2.1	Lage und Charakterisierung der Insertion im Intron 9 des Komplementgens C4 .....	13
1.2.2	Genetische Struktur .....	17
1.2.3	Funktionelle Bedeutung von HERV-K(C4) im menschlichen Genom .....	20
<b>1.3</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>22</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>24</b>
2.1.1	Laborchemikalien .....	24
2.1.2	Radiochemikalien .....	25
2.1.3	Labormaterialien .....	25
2.1.4	Medien, Puffer, Lösungen .....	26
2.1.4.1	DNA .....	26
2.1.4.1.1	Isolierung von DNA .....	26
2.1.4.1.2	Gelelektrophorese .....	26
2.1.4.2	RNA .....	26
2.1.4.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA .....	27
2.1.4.2.2	Agarose/Formaldehyd Gelelektrophorese .....	27
2.1.4.2.3	RNase Protection Assay .....	27
2.1.4.2.3.1	Silbernitratfärbung .....	28
2.1.4.2.4	Northern-Blot .....	28
2.1.4.3	Zellkultur .....	28
2.1.4.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	29

2.1.4.5	Bakterien .....	29
2.1.5	Kits .....	29
2.1.6	Enzyme .....	30
2.1.7	Zytokine .....	30
2.1.8	Vektoren und Bakterienstämme .....	30
2.1.9	Zelllinien .....	31
2.1.10	Gewebeproben .....	31
2.1.11	Oligonukleotidsynthese .....	32
2.1.12	Internetrecherche .....	33
2.1.13	Geräte .....	33
2.2	<b>Methoden</b> .....	<b>34</b>
2.2.1	Zellkultur .....	34
2.2.1.1	Zell-Passage .....	34
2.2.1.1.1	adhärente Zellen .....	34
2.2.1.1.2	Suspensionszellen .....	35
2.2.1.2	Einfrieren von Zellen .....	35
2.2.1.3	Auftauen von Zellen .....	35
2.2.1.4	Zellzahlbestimmung .....	36
2.2.2	Isolierung von Nukleinsäuren .....	36
2.2.2.1	Isolierung von DNA .....	36
2.2.2.2	Isolierung von RNA .....	37
2.2.2.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben .....	37
2.2.2.2.2	Isolierung von poly(A <sup>+</sup> )-mRNA aus Zellen .....	37
2.2.2.2.3	DNase Verdau .....	38
2.2.2.2.4	Phenolextraktion .....	38
2.2.3	Konzentrationsbestimmung und Reinheit von Nukleinsäuren.....	39
2.2.3.1	Qualität der RNA .....	39
2.2.4	RT-PCR .....	40
2.2.4.1	Reverse Transkription .....	40
2.2.4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	41
2.2.4.2.1	Quantitative Real-Time PCR .....	42
2.2.4.2.2	Mid Range PCR .....	44
2.2.4.3	Agarose Gelelektrophorese .....	44

2.2.4.4	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	44
2.2.5	Plasmidkonstruktion .....	46
2.2.5.1	Restriktionsverdau .....	48
2.2.5.2	Ligationsreaktion .....	48
2.2.5.2.1	Klonierung von RT-PCR-Produkten in einen <i>TA-Cloning vector</i> .....	49
2.2.5.3	Herstellung von kompetenten Bakterien durch die Rubidiumchlorid-Methode .....	49
2.2.5.4	Transformation kompetenter Bakterien und Selektion .....	50
2.2.5.5	Kryokonservierung von Bakterien .....	50
2.2.5.6	Identifikation transformierter Klone .....	50
2.2.5.6.1	TELT-Minipräparation von Plasmid-DNA (analytisch) .....	50
2.2.5.6.2	<i>Cycle Sequencing</i> mit fluoreszenzmarkierten Terminatoren und Kapillarelektrophorese .....	51
2.2.5.6.3	Kapillarelektrophorese .....	52
2.2.5.7	Präparation großer Mengen an Plasmid-DNA .....	53
2.2.6	Ribonuklease Protection Assay (RPA) .....	53
2.2.6.1	Sondenherstellung .....	54
2.2.6.1.1	DNA-Template Präparation .....	54
2.2.6.1.2	Radioaktive Markierung spezifischer RNA-Sonden .....	54
2.2.6.2	Radioaktive Hybridisierung .....	56
2.2.6.3	RNase Verdau .....	56
2.2.6.4	Markierung des Längenstandards .....	56
2.2.6.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	57
2.2.6.6	Autoradiografie .....	58
2.2.6.7	Silbernitratfärbung .....	58
2.2.7	Northern-Blot .....	59
2.2.8	Transiente Transfektionen von adhärenen Zellen .....	60
2.2.8.1	Lipidtransfektion .....	60
2.2.8.2	Elektroporation .....	61
2.2.8.2.1	Gene Pulser II System .....	61
2.2.8.2.2	Biolistik-Partikel Übertragungssystem .....	62
2.2.9	Enzymnachweis .....	62
2.2.9.1	$\beta$ -Galaktosidase-Assay .....	62
2.2.9.1.1	Gesamtproteinbestimmung .....	63

2.2.9.2	Luciferase-Assay .....	64
2.2.10	Retroviraler Gentransfer .....	65
2.2.10.1	Transiente Virenproduktion .....	66
2.2.10.2	Bestimmung des viralen Titers .....	67
2.2.10.3	Infektion der Zielzellen .....	68
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>70</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen zur Expression von HERV-K(C4) im humanen Genom .....</b>	<b>70</b>
3.1.1	RT-PCR-Nachweis von HERV-K(C4)-spezifischer Antisense mRNA ...	70
3.1.1.1	Nachweis in humanen Geweben .....	71
3.1.1.2	Nachweis in humanen Zelllinien .....	73
3.1.1.3	Nachweis von C4/HERV-K(C4)-mRNA-Intermediaten .....	75
3.1.1.4	Untersuchungen zur Orientierung der HERV-K(C4)-Transkripte .....	78
3.1.1.5	Quantifizierung von HERV-K(C4)-Antisense Transkripten.....	80
3.1.2	Detektion von HERV-K(C4)-spezifischer Antisense mRNA mittels RNase Protection Assays .....	84
3.1.2.1	Herstellung von HERV-K(C4)-spezifischen Sense und Antisense RNA-Sonden .....	85
3.1.2.2	Autoradiografischer Nachweis von HERV-K(C4)-spezifischer Antisense RNA .....	87
3.1.3	Northern-Blot Analyse .....	90
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von HERV-K(C4) .....</b>	<b>92</b>
3.2.1	Ergebnisse zur Promotoraktivität der <i>Long Terminal Repeats (LTRs)</i> .....	92
3.2.1.1	Herstellung der LTR-Promotorkonstrukte .....	92
3.2.1.2	Untersuchungen zur generellen Promotoraktivität der HERV-K(C4)-LTRs .....	95
3.2.2	Untersuchungen zur Antisense-Abwehrstrategie: Das HERV-K(C4)-Modell .....	99
3.2.2.1	Inhibierung der Expression des retroviralen Fusionsproteins nach Stimulation der C4-Genexpression mit dem Cytokin Interferon- $\gamma$ .....	99
<b>3.3</b>	<b>Etablierung eines retroviralen HERV-K(C4)-homologen Infektionsmodells an murinen Zelllinien .....</b>	<b>101</b>

---

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>108</b>
<b>4.1</b>	<b>Struktur und Vorkommen von HERV-K(C4)-Antisense Transkripten</b> .....	<b>112</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Bedeutung der HERV-K(C4)-LTRs</b> .....	<b>127</b>
<b>4.3</b>	<b>Die funktionelle Bedeutung von HERV-K(C4)</b> .....	<b>139</b>
<b>4.4</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>148</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>149</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>152</b>
<b>7.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>156</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>159</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>171</b>
<b>10.</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>172</b>
<b>11.</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>173</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Retroelemente

Der Anteil repetitiver Sequenzen am Genom, die durch den Vorgang der reversen Transkription genetischer Information von RNA zu DNA entstanden sind, beträgt bei Eukaryoten ca. 50% (Singer und Berg, 1991). Diese RNA-vermittelte Mobilität bzw. Instabilität von DNA-Sequenzen (McClintock, 1951; Döring et al., 1984) wird als Retrotransposition und die transponierte genetische Information als Retroelement bezeichnet. Die Überfamilie der Retroelemente wird unterteilt in Retroviren und Retrovirus-ähnliche Elemente (RTVL) und ist charakterisiert durch die Fähigkeit zur Transposition einer RNA-Zwischenstufe aufgrund der Tätigkeit einer reversen Transkriptase (Tassabehji et al., 1994). Die Einordnung einer transponierbaren, repetitiven Einheit ist aufgrund ihrer Struktur, Länge sowie ihrer Lage und Orientierung im Genom möglich (siehe Tabelle 1.1).

**Tabelle 1.1:** Klassifizierung der Retroelemente

Bezeichnung	Genomische Struktur	Beispiel	Kopienanzahl im Genom
endogene Retroviren	Retroelement mit RT, LTR und env, pol, gag	HERV-H, HERV-R, ERV-9, HTDV/HERV-K	10 <sup>0</sup> bis 10 <sup>2</sup>
Retrotransposon	Retroelement mit RT, LTR und gag, pol	Ty1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; HERV-H mit Retroposon-Struktur	10 <sup>2</sup> bis 10 <sup>4</sup>
Retroposons LINE	Retroelement mit RT, internem Promotor und pol, ORF1	LINE-1	10 <sup>4</sup> bis 10 <sup>5</sup>
SINE	Retroelement ohne RT, mit internem Promotor	Alu SINE-R	10 <sup>5</sup> bis 10 <sup>6</sup> 10 <sup>3</sup>
Retrogene (Pseudogene)	Retroelement ohne RT, mit zellulärem Promotor	Humane Phosphoglycerin-Kinase	10 <sup>0</sup> bis 10 <sup>1</sup>
singuläre LTRs	LTR	HDTV/HERV-K	10 <sup>1</sup> bis 10 <sup>4</sup>

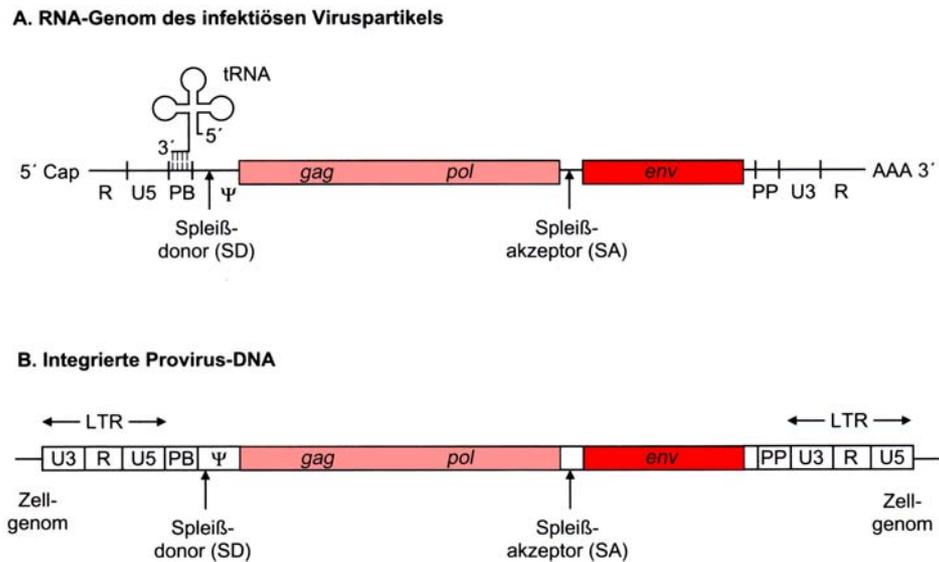
HERV Humanes Endogenes Retrovirus; RTVL-Elemente: *Retrotransposons*, die über kein env-Gen mehr verfügen; *Retroposons*, die durch den Verlust der beiden LTRs und des env-Gens charakterisiert sind, jedoch über einen eigenen Promotor verfügen; SINEs (*Short Interspersed Nuclear Elements*) und Retrogene (Pseudogene) die über keinerlei retroviralen Gene mehr verfügen; einzelne im Genom vorkommende LTRs entstehen durch Rekombination der homologen LTRs. Die mittelrepetitiven Sequenzen LINEs (*Long Interspersed Nuclear Elements*) und die hochrepetitiven SINEs gehören zur Klasse der verstreuten repetitiven Sequenzen. RT Reverse Transkriptase; LTR *Long Terminal Repeat*; ORF *Open Reading Frame*; gag, pol und env-retrovirale Gene; (modifiziert nach Löwer et al., 1996).

### 1.1.1 Retroviren

Die Familie der *Retroviren* (*Retroviridae*) gehört zu den bedeutendsten repetitiven Sequenzelementen, da sie die einzigen RNA-Viren sind, die durch ihre Integration in das Wirtsgenom Krebs verursachen können und somit im Mittelpunkt der Tumorforschung stehen (Herbst et al., 1999). Eine Assoziation von Retroviren mit Tumorerkrankungen konnte für das *Rous sarcoma virus* (RSV), *Mouse mammary tumor virus* (MMTV) und *Human T-cell leukemia virus* (HTLV) gezeigt werden (Rous, 1911; Bittner, 1936; Miyoshi et al., 1982).

Retroviren können in drei Subfamilien unterteilt werden: Oncoviren, Lentiviren (z.B. humane Immundefizienz-Viren HIV-1/HIV-2) und Spumaviren (Coffin et al., 1992; Modrow und Falke, 1998). Aufgrund von morphologischen und genetischen Unterschieden der retroviralen Partikel sowie der Wirtsspezifität und Pathogenese können Retroviren in sieben Genera unterteilt werden: Typ-A (*intracisternal particles*, nichtinfektiöse intrazelluläre Partikel), -B (MMTV), -C (z.B. RSV), -D (Mason-Pfizer-Affen-Virus), HTLV/BLV-Gruppe, Lentiviren und Spumaviren (Dalton et al., 1972; Coffin et al., 1992). Das Genom der Retroviren besteht aus einzelsträngiger RNA, die mit der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA aufweist. Die codierende Region aller infektiösen Retroviren umfaßt die Gene *gag*, *pol* und *env*. Diese Gene sind für die virale Transkription, ihre Struktur und Vermehrung notwendig (Shapiro und Cordell, 1982; Varmus und Brown, 1989; Darnell et al., 1990):

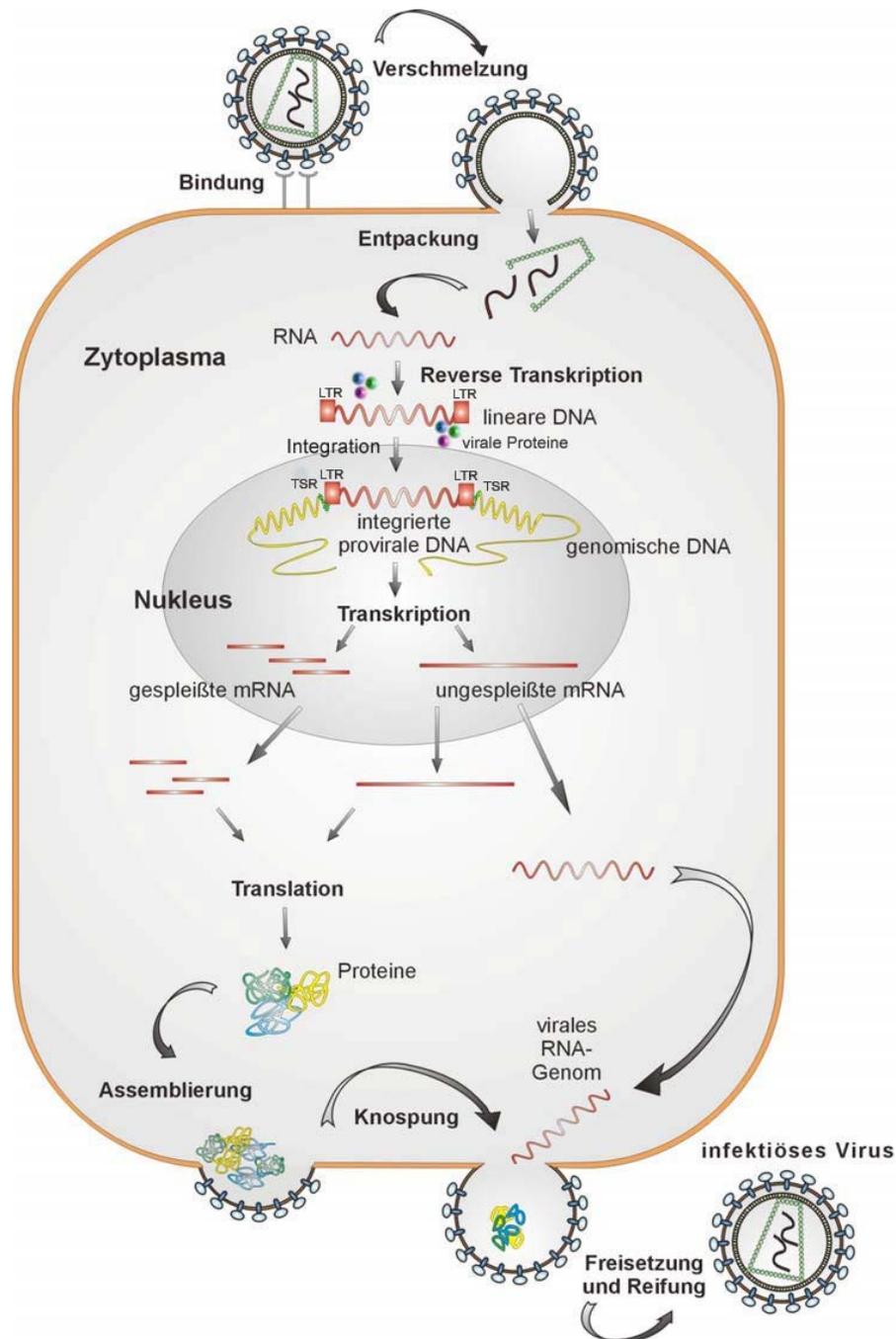
- *gag* codiert ein Polyprotein, das durch eine Protease in vier virale core-Proteine zerlegt wird. Diese Proteine machen die wichtigsten Bestandteile der inneren Virusstruktur aus, wie z.B. das Capsid-Protein, und tragen die antigenen Determinanten des Virus (gruppenspezifische Antigene).
- *pol* codiert ein multifaktorielles Protein mit variierender Enzymaktivität, einschließlich der reversen Transkriptase (RT), Endonuclease und Integrase-Transposase-Funktion.
- *env* codiert zwei Proteine: Das *surface protein* (SU) mit einem *single peptid* (SP) und *outer membrane protein* (OM) und das *transmembrane protein* (TM). Diese werden durch Glykosylierung modifiziert und in die Virushülle (envelope) eingelagert und sind für die Anheftung des Virus an die Wirtsoberfläche wichtig.



**Abb. 1.1:** Genomorganisation der Retroviren. Dargestellt sind die Sequenzelemente und Gene, die man bei allen Retrovirusgenomen findet. Anordnung der Sequenzelemente und offenen Leserahmen: A: im RNA-Genom aller infektiösen Retroviruspartikel. B: im Genom des Provirus nach seiner Integration in das Wirtszellgenom. Ψ: Verpackungssignal. R: wiederholte (redundant) Regionen. SD und SA: Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen für die Synthese jener mRNAs, von denen die env-Proteine translatiert werden (aus Modrow und Falke, 1998; weitere Erklärung siehe Text).

Die codierenden Regionen werden am 5'- und am 3'-Ende des Genoms von den regulatorisch wichtigen Kontrollsequenzen R, U5 und U3 flankiert (siehe Abb. 1.1 A), die für die reverse Transkription sowie die Integration des viralen Genoms in die zelluläre DNA essentiell sind. An eine als Primer-Bindungsstelle (PB) bezeichnete Sequenzabfolge ist eine zelluläre tRNA hybridisiert, die bei Infektion einer Wirtszelle als Primer für die Minus-Strang-Synthese der cDNA dient (siehe Abb. 1.7) und mit dem RNA-Genom in die Virushülle verpackt wird. Die Synthese der Plus-Strang-DNA wird durch eine Polypurin Sequenz (PP) ermöglicht, die ebenfalls als Primer dient (Darnell et al., 1990). Nach der reversen Transkription wird die virale doppelsträngige DNA in das Genom der Zelle integriert und wird als *Provirus* bezeichnet (siehe Abb. 1.1 B). Die integrierte Provirus-DNA wird durch long terminal repeats (LTRs) flankiert, Wiederholungseinheiten bestehend aus den Regionen U3, R und U5, welche zahlreiche Signale – Enhancer-, Promotor- und Polyadenylierungssignale – für die Expression retroviraler Gene enthalten.

Retroviren können "horizontal" durch Infektion auf einen neuen Wirt (*horizontale Transmission*, exogene Retroviren) oder alternativ durch Integration der Virus-DNA in das Wirts-Genom "vertikal" durch Vererbung über die Keimbahn des Wirtes (*vertikale Transmission*, endogene Retroviren) weitergegeben werden (siehe Abb. 1.2).



**Abb. 1.2:** Integrationsmechanismus und Vermehrungsweg eines Retrovirus. Durch den Mechanismus der reversen Transkription entsteht ein doppelsträngiges cDNA-Transkript, das von zwei LTRs flankiert wird und der Vermehrung der Retroviren dient. Dieses bildet einen Komplex mit viralen Proteinen, schließt sich zum Ring und dringt in den Wirtszellkern ein, wo es in das Genom mit Hilfe einer viruscodierten Integrase inseriert. Das Wirtsgenom wird seinerseits durch eine Endonuklease geschnitten, dabei entstehen durch eine 6-Basen-Auffüllreaktion die charakteristischen Target site repeats an der Integrationsstelle. Durch die RNA-Polymerase II des Wirtes wird die provirale DNA in virale RNA transkribiert. Die virale RNA dient zum einen als Genom bei der Bildung eines neuen Viruspartikels und zum anderen als mRNA (gespleißt oder ungespleißt) für die Synthese viraler Proteine, die dann zusammen einen neuen Viruspartikel bilden und durch Knospung den Lebenszyklus des extrazellulären Retrovirus fortsetzt. Die Provirus-DNA verbleibt im Genom und dient als Startpunkt des endogenen Retrovirus.

### 1.1.2 Humane endogene Retroviren

Humane endogene Retroviren (HERVs), die sich vor 1 bis 40 Millionen Jahren durch ancestrale retrovirale Infektion in der Keimbahn DNA fixiert haben, machen mit 98.000 Elementen und Fragmenten einen Anteil von ca. 5-8 % am menschlichen Genom aus (Lander et al., 2001; IHGSC, 2001, Pačes et al., 2002). Jede Familie ist das Resultat der Verbreitung eines einzelnen Retrovirus im Wirtsgenom und ist durch die spezifischen DNA-Sequenzen einer tRNA Primer Bindungsstelle (PBS), zweier LTRs und der retroviralen Gene gag, pol und env charakterisiert (Cohen and Larsson, 1990; Wilkinson et al., 1994). HERVs weisen somit eine ähnliche genomische Organisation auf wie heute existierende exogene Retroviren, z.B. das humane Immundefizienz-Virus (HIV) und das humane T-Zell Leukämie Virus (HTLV). Analoge endogene Retroviren (ERVs) mit ähnlicher Komplexität wurden ebenso im Genom von Orang-Utans, Schimpansen und grünen Meerkatzen gefunden (Dangel et al., 1995). Nach Kolonialisierung des menschlichen Genoms haben sich die Mehrzahl der HERV-Familien durch Reinfektion und intrazelluläre Transposition (Belshaw, 2004; Tchenio et al., 1992) im Genom verbreitet und liegen mit bis zu mehreren hundert Kopien vor. Viele im Genom vorkommende HERVs sind durch homologe Rekombination sowie Deletion nicht mehr vollständig erhalten (solitäre LTRs). Die Klassifizierung der HERVs ist daher sehr komplex und wurde von verschiedenen Autoren unter Berücksichtigung von morphologischen, phylogenetischen sowie biologischen Kriterien vorgenommen. HERVs können aufgrund ihrer Sequenzhomologien zu exogenen Retroviren und fossilen tierischen endogenen Retroviren (ERVs) in drei große Klassen unterteilt werden (Wilkinson et al., 1994): Klasse I beinhaltet die auf Säugetier Typ C Retroviren zurückzuführenden HERVs, und Klasse II schließt alle Retroviren ein, die Homologien zu den Säugetier A-, B-, und D-Typen und Affen Typ C zeigen (Leib-Mösch und Seifarth, 1996; Löwer et al., 1996). Klasse III leiten sich von den Spumaviren ab (siehe Abb. 1.3 ).

Aufgrund des basenspezifischen Codes (Einbuchstabencode) für die Aminoacyltransferase an der Primer tRNA können die HERVs in einzelne Familien, z.B. HERV-E, HERV-R, HERV-I etc., unterteilt werden. Die der Klasse II angehörenden HERV-Familien weisen z.B. alle den basenspezifischen Code für die Lysin tRNA auf, welche zudem ihre Abstammung von den B und D Typ Viren belegt, und bilden daher die Superfamilie der HERV-K Viren (Löwer et al., 1996; Sverdlov 2000). HERV-K wurde als die biologisch aktivste humane HERV-Familie beschrieben (Tonjes et al., 1996) und aufgrund der An- und Abwesenheit eines 292 bp langen pol-env Segments in Typ 1 und Typ 2 untergliedert (Barbulescu et al., 1999).

HERV family	Representative accession number
<i>Class I HERVs (type C related HERVs)</i>	
Group 1, HERV-HF	
HERV-H (RTVL-H, RGH)	AF108842
HERV-F	AF070684
Group 2, HERV-RW	
HERV-W	AF072506
HERV-R (ERV9)	X57147
HERV-P (HuERS-P, HuRRS-P)	X06279
Group 3, HERV-ERI	
HERV-E (4-1, ERVA, NP-2*)	S46403
51-1	J00273
HERV-R (ERV3)	M12140
RRHERV-I	M64936
Group 4, HERV-T	
HERV T (S71, CRTK1, CRTK6)	M32788
Group 5, HERV-IP	
HERV-I (RTVL-I)	X14953
HERV-IP-T47D (ERV-FTD)	U27241
Group 6, ERV-FRD	
ERV-FRD	U27240
<i>Class II HERVs (type A, B, and D related HERVs)</i>	
Group 1, HERV-K (HML-1)	
HERV-K (HML-1.1)	U35102
Group 2, HERV-K (HML-2)	
HERV-K10	M14123
HERV-K-HTDV	X8227
Group 3, HERV-K (HML-3)	
HERV K (HML3.1)	U35153
Group 4, HERV-K (HML-4)	
HERV-K-T47D	AF020092
Group 5, HERV-K (HML-5)	
HERV -K-NMWW2	AF015995
Group 6, HERV-K (HML-6)	
HERV K (HML-6p)	U86698
Group 7, HERV-K (HML-7)	
HERV-K-NMWW7	AF016000
Group 8, HERV-K (HML-8)	
HERV-K-NMWW3	AF015996
Group 9, HERV-K (HML-9)	
HERV-K-NMWW9	AF016001
Group 10, HERV-K (HML-10)	
HERV-KC4	U07856
<i>Class III Foamy virus related HERVs</i>	
HERV-L	X89211

**Abb. 1.3:** Klassifizierung der Humanen Endogenen Retroviren (HERVs) (aus: Nelson et al., 2002)

Aufgrund weiterer phylogenetischer Sequenzanalysen des retroviralen Polymerase Gens (pol) und des envelope Gens (env) können HERVs innerhalb einer Klasse einzelnen Gruppen und Subgruppen zugeordnet werden (Tristem M, 2000; Benit et al., 2001), ohne einer einheitlichen Taxonomie zu unterliegen. Es konnten bislang über 26 HERV-Familien bzw. -Gruppen im menschlichen Genom identifiziert werden (Tristem et al., 2000), wobei neueste Studien vermuten lassen, daß über 100 verschiedene HERV-Gruppen existieren (Pačes et al., 2004). Während exogene Retroviren in der Lage sind, infektiöse Nachkommen zu produzieren, haben die endogenen Retroviren sowie die RTVL-Elemente aufgrund der Akkumulation von Mutationen, Deletionen und Terminationssignalen innerhalb der codierenden Sequenz in der Regel die Fähigkeit zur Bildung einer infektiösen Form verloren (Löwer et al., 1996; Wilkinson et al., 1994). Durch den Verlust der Genexpression und viralen Proteinsynthese ist ihr Lebenszyklus daher auf die Zelle beschränkt (Löwer et al., 1996; Sverdlov, 2000). Es kann jedoch angenommen werden, daß eine große Anzahl der HERV-

Sequenzen noch aktiv transkribiert wird, was durch die Entdeckung von Antigenen in menschlichen Sera und Geweben, die mit retroviralen Strukturproteinen verwandt sind, gezeigt werden konnte (siehe Abb. 1.4) (Larsson et al., 1989; Leib-Mösch und Seifarth, 1996). Einige endogene Retroviren bei Tieren, wie das *Mouse mammary tumor virus* (MMTV) und das *Jaagsiekte sheep retrovirus* (JSRV) stellen sogar völlig intakte endogene Gegenstücke zu exogen existierenden Stämmen dar (Moore et al., 1987; York et al., 1992).  
 HERV-K im Intron 9 des C4-Gens ist eines der endogenen Retroviren, sowie auch HERV-I im Intron 1 eines Haptoglobin-verwandten Gens (Maeda, 1985) und HERV-DRB $\psi$ 1 im Intron 2 eines Pseudogens, welches neben dem HLA-DRB2-Gen liegt (Larhammar et al., 1985), dessen stabile Integration in das Intron eines aktiven Wirts-Gens mit anschließender Fixierung in der Population beschrieben wurde. Es konnte gezeigt werden, daß HERVs mit Autoimmunkrankheiten, wie z.B. Systemischer Lupus Erythematodes (SLE), rheumatischen Erkrankungen (Nelson, 1995) und Diabetes (*Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM*; Medstrand et al., 1998) assoziiert sind sowie in der Ätiologie und Pathologie von Krankheiten eine Rolle spielen könnten. Aufgrund des Vorhandenseins einer ganzen Reihe von viralen Relikten im humanen Genom könnten HERVs für den Wirt nützlich sein, wodurch dieser sich einen gewissen Selektionsvorteil verschafft hat (Dangel et al., 1996; Schneider et al., 2001a).

Familie	Kopienzahl	genomische Struktur	mRNA Expression	Protein Expression
HERV-E	30-50	defekter Provirus	Plazenta, Dickdarm, Brustkrebs, Gehirn, Tumor Zelllinien	nicht beobachtet
HERV-R	1	defekter Provirus	hohe Expression in Plazenta, niedrige in normalen Geweben, fötales Gewebe, Makrophagen Zellinie U937	env
HERV-I	3-25	defekter Provirus	nicht getestet	nicht beobachtet
HERV-H	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Transposon Struktur	Teratocarcinoma Zelllinien, Plazenta, Tumor Zelllinien	nicht beobachtet
HERV-H	50-100	defekter Provirus	Teratocarcinoma Zelllinien	nicht beobachtet
ERV-9	30-50	defekter Provirus	Teratocarcinoma Zelllinien, Plazenta	nicht beobachtet
HERV-P	10-20	Provirus (nur LTR sequenziert)	nicht getestet	nicht getestet
HTDV/HERV-K	30-50	defekter Provirus	hohe Expression in Teratocarcinoma Zelllinien, testiculäre Tumore, niedrige In Plazenta und normalen Gewebe	gag.cORF, Protease Polymerase, env
HERV-K(C4)	30-50	defekter Provirus	nicht getestet	nicht getestet

**Abb. 1.4:** Charakteristika der HERV-Familien (nach Löwer et al., 1996)

## 1.2 Die endogene retrovirale Insertion HERV-K(C4)

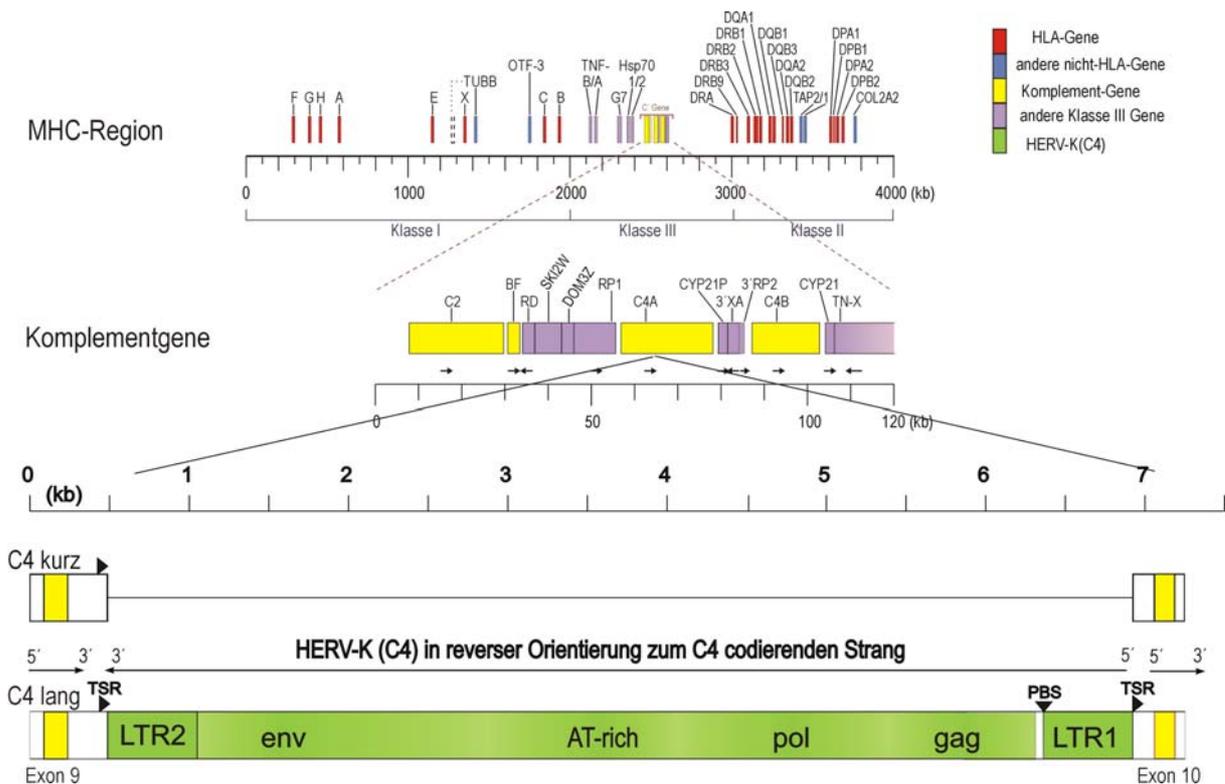
### 1.2.1 Lage und Charakterisierung der Insertion im Intron 9 des Komplementgens C4

Das Komplementsystem ist ein im Serum und in Geweben vorhandenes Kaskadensystem, das aus über 20 definierten Effektor- und Regulator-Proteinen besteht und einen wichtigen Teil der körpereigenen humoralen Immunabwehr zum Schutz vor Infektionserregern darstellt. Es spielt sowohl eine zentrale Rolle in der Präimmunphase von Infektionen, wenn Antikörper und spezifische reaktive Lymphozyten noch nicht vorhanden sind, als auch bei Antikörper-abhängigen Immunreaktionen. Seine Aktivierungsprodukte haben für viele Zellen des Immunsystems eine Signalfunktion. Hauptsyntheseort der Komplementproteine ist die Leber, da speziell in den Hepatozyten die Expression nachgewiesen werden konnte (Ramadori et al., 1985; Anthony et al., 1989). Einige Komponenten können jedoch auch extrahepatisch durch Makrophagen und Fibroblasten synthetisiert werden und spielen eine wichtige Rolle bei der lokalen Immunantwort am Infektionsherd (Alper et al., 1980; Morris et al., 1982).

Die vierte Komponente des menschlichen Komplementsystems (C4) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kD und einem Kohlenhydratanteil von 7% (Gigli et al., 1977). Das hämolytische Vorläuferprotein, Pro-C4, wird in der Leber als ein einkettiges primäres Translationsprodukt synthetisiert und trägt die Peptidketten des reifen Proteins in der Reihenfolge  $\beta$ - $\alpha$ - $\gamma$  (Morris et al., 1982; Roos et al., 1978; Goldberger et al., 1980; Parker et al., 1980). Reifes, aber noch inaktives C4 besteht dagegen aus drei einzelnen Polypeptidketten,  $\alpha$  (93 kD),  $\beta$  (75 kD) und  $\gamma$  (32 kD), die über Disulfidbrücken verknüpft sind (Schreiber und Müller-Eberhard, 1974; Gigli et al., 1977) und eine komplexe Serie von post-transkriptionalen Modifikationen durchlaufen.

Die Komplementkomponente C4 tritt in zwei isotypen Formen auf, C4A und C4B, die von zwei eng gekoppelten Genen codiert werden (O'Neill et al., 1978a). Diese befinden sich zusammen mit den Genen für die Komplementfaktoren C2 und BF sowie den beiden 21-Hydroxylase-Genen, CYP21A und CYP21B in der sog. Klasse III-Region des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) (siehe Abb. 1.5). Sie werden flankiert von den MHC-Regionen der Klasse I (HLA-A, C, B) und Klasse II (HLA-DR, DQ, DP) und liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (Rittner et al., 1975; Teisberg et al., 1976; Carroll et al., 1984a, b). Die beiden C4-Gene bestehen aus 41 Exons mit einer cDNA Länge von 5,5 kb und einer entsprechenden Anzahl an Introns (Yu, 1991), sind stark konserviert und in hoch-homologer Form bereits bei Primaten vorhanden.

Die codierenden Sequenzen der isotypen Gene unterscheiden sich in nur 5 Nukleotiden, die sich wiederum nach Translation durch vier Isotyp-spezifische Aminosäure-Unterschiede (Pro-Cys, Leu-Asp im C4A-Isotyp und Leu-Ser, Ile-His im C4B-Isotyp) im Protein äußern und zusammen mit zwei anderen Aminosäure-Unterschieden die genetische Basis der serologischen Determinanten Rodgers und Chido bilden (Yu et al., 1988; Giles et al., 1988; O'Neill et al., 1978b). Diese Aminosäure-Unterschiede sind innerhalb des C4d-Peptids lokalisiert bzw. die entsprechenden DNA-Sequenzen liegen im Exon 26. Sie liegen in räumlicher Nähe zur Thiolester-Bindungsstelle der C4 $\alpha$ -Kette und sind daher für die isotypische Spezifität, d.h. für den Wechsel und Modulation der Reaktivität der Thiolester-Gruppe, verantwortlich (van den Elsen et al., 2002; Yu, 1991; Carroll et al., 1990): C4A bindet bevorzugt an Amino-Gruppen (Law et al., 1984; Isenman und Young, 1984; Schifferli und Paccaud, 1989) und spielt daher eine zentrale Rolle bei der Solubilisierung von Immunkomplexen und der Virusneutralisation. C4B hingegen reagiert bevorzugt mit Hydroxylgruppen und hat somit eine 2-4fach höhere Hämolysekapazität als C4A (Awdeh und Alper, 1980; Dodds et al., 1986). Die antigene Determinante Ch4 wird nur von den C4B-Genen exprimiert und definiert damit diesen Isotyp (Giles et al., 1988; Mauff et al., 1998). Die funktionelle Bedeutung der Komplementkomponente C4 besteht in ihrer Eigenschaft als ein Bestandteil der C3- und C5-Konvertase, welche die Effektorfunktionen des klassischen und Lektin-Weges der Komplementaktivierung initiieren und entscheidend verstärken, sowie ihrer unmittelbaren Beteiligung an der Opsonisierung von Pathogenen, Solubilisierung von Immunkomplexen und Virusneutralisation (Reid und Porter, 1981; Mueller-Eberhardt, 1988). Genetische Defizienzen der C4-Loci, wie z.B. Nullallele, sind assoziiert mit Krankheiten des Immunsystems und umfassen den Systemischen lupus erythematoses (SLE) (Fiedler et al., 1983; Reveille et al., 1985; Atkinson und Schneider, 2004; Lechler et al., 2000), Sklerodermie (Rittner et al., 1984a) und die subakute sklerosierende Panencephalitis (Rittner et al., 1984b). Obwohl die beiden Isotypen C4A und C4B zu über 99% in ihrer codierenden Sequenz identisch sind, gibt es einen extensiven Polymorphismus, der sich auf drei Ebenen – elektrophoretisch, serologisch und strukturell – definieren läßt (Schneider und Mauff, 2003): Über 40 Proteinvarianten, davon mehr als 15 C4A- und 22 C4B-Allotypen, können durch Hochspannungselektrophorese (Awdeh und Alper, 1980) und anschließender Immunfixation (Mauff et al., 1990 und 1998) definiert werden (elektrophoretischer Polymorphismus).



**Abb. 1.5:** Lage von HERV-K(C4) im Komplementgen C4 des MHCIII (modifiziert nach Schneider, 1995).

Insgesamt wurden bisher 21 polymorphe Stellen in der 1744 Aminosäure langen Sequenz gefunden (Schneider, 1990; Yu, 1991; Anderson et al., 1992; Paz-Artal et al., 1993; Witzel et al., 1995; Chu, 1995). Sie führen zu einer Vielzahl beobachteter struktureller, funktioneller und serologischer Eigenschaften der verschiedenen Iso- und Allotypen (funktioneller Polymorphismus).

Untersuchungen der C4-Genstruktur und -anordnung haben gezeigt, daß sowohl die Zahl der Gene auf einem Chromosom als auch die Genlänge variabel sind (Genstrukturpolymorphismus). Die Anzahl der im menschlichen haploiden Genom vorkommenden C4-Gene kann zwischen einem und vier, möglicherweise auch mehr variieren (Carroll et al., 1984a, 1985; Yu et al., 2003). Das C4-Gen kommt überwiegend dupliziert in der Bevölkerung vor, d.h. ein Chromosom besitzt zwei C4-Gene, jedoch sind in der kaukasoiden Bevölkerung Haplotypen mit einem einzelnen C4-Gen in einer Häufigkeit von 20% beschrieben worden (Schneider, 1990). Das C4-Gen ist innerhalb eines genetischen Moduls lokalisiert, das als RCCX bezeichnet wird und für die Serin/Threonin Nuklear Proteinkinase RP, die Komplementkomponente C4, das Steroid 21-Hydroxylase CYP21 und das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin TNX codiert (Yu et al., 1998 und 2000). Die Strukturvariationen entstehen durch Gendeletionen bzw. -duplikationen, wodurch immer je

ein vollständiges RCCX-Modul betroffen ist (Carroll et al., 1985b; Schneider et al., 1986). Der Längenpolymorphismus des C4-Gens von 16 kb oder 22 kb beruht auf der Ab- oder Anwesenheit einer 6.5 kb großen Insertion innerhalb des Intron 9 (Carroll et al., 1984a; Prentice et al., 1986, Schneider et al., 1986).

Der Längenpolymorphismus des C4-Gens wurde erstmals bei der Beschreibung der C4-Genstruktur durch Carroll und Kollegen (1984) entdeckt, die ein C4A- von ca. 22 kb und ein C4B-Gen von 16 kb Länge charakterisierten. Später konnte gezeigt werden, daß auch am C4B-Locus ein langes C4-Gen vorhanden sein kann (Prentice et al., 1986) und daß die zum Längenpolymorphismus führende Insertion im nicht-codierenden Bereich der 5'-Region lokalisiert sein muss.

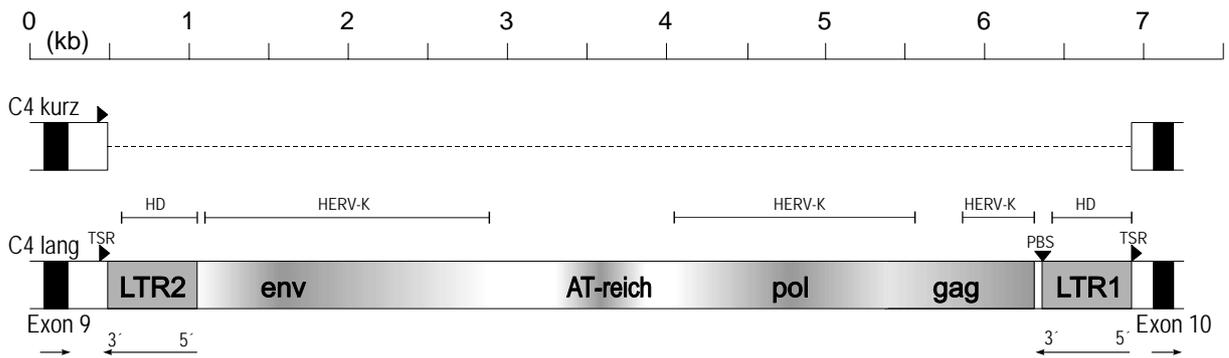
Diesbezüglich konnten Schneider und Kollegen (1986) nachweisen, daß die C4A-Gene mit nur wenigen Ausnahmen (Giles et al., 1987) ein größeres, 6,8 kb langes Intron 9 aufweisen, während ein Drittel der C4B-Gene ein kurzes, ca. 600 bp langes Intron 9 tragen. Yu (1991) diskutierte nach seiner Analyse der kompletten Exon-Intron-Organisation des C4-Genes, daß es sich bei der Intron9-Insertion möglicherweise um ein mobiles genetisches Element handeln könnte. Da die Insertion eines solchen mobilen Elements eine wichtige Rolle für genetische Stabilität der C4-Genregion insbesondere im Hinblick auf Gendeletionen und -duplikationen spielen könnte, wurden die DNA-Sequenzen des kurzen und des langen Intron 9 vollständig aufgeklärt (Chu et al., 1995; Dangel et al., 1994; Tassabehji et al., 1994).

Untersuchungen der Intron 9-Sequenz haben gezeigt, daß dort ein vollständiges endogenes Transposon retroviralen Ursprungs lokalisiert ist, und zwar bei Menschen als auch bei zahlreichen Altwelt-Affenarten. Das lange Intron 9 hat eine Länge von 6.787 bp und das kurze von 415 bp. Die Längendifferenz zwischen kurzen und langen Intron beträgt demnach 6.372bp, wobei die Insertion bei Position 289 im kurzen Intron ihren Anfang hat. Die beiden Introns weisen in den hochhomologen Bereichen eine Sequenzidentität von 96% auf. Ein Homologievergleich dieser Insertion mit den in der EMBL-Datenbank gespeicherten Sequenzen zeigte, daß es sich um ein komplettes Provirus handelt, das alle charakteristischen Sequenzmerkmale der Familie der humanen endogenen Retroviren (HERV) trägt und zu der HERV-K Familie gehört (Ono et al., 1986), die eine der biologisch aktivsten Familien im Genom darstellt (Barbulescu et al., 1999). Die Insertion wurde daraufhin als HERV-K(C4)-Provirus bezeichnet (Dangel et al., 1994). Die Orientierung dieses retroviralen Elements ist entgegengesetzt zum codierenden Strang bzw. der Transkriptionsrichtung des C4-Gens.

### 1.2.2 Genetische Struktur

HERV-K(C4) bildet eine eigenständige Familie, gehört der Klasse II und aufgrund einer Lysin-ähnlichen PBS der Superfamilie HERV-K an (siehe Abb. 1.6). Die Integration des HERV-K(C4)-Retrovirus in das Intron 9 eines monomodularen ancestralen C4-Gens erfolgte vor mehr als 23 Mio. Jahren in umgekehrter Orientierung zum C4 codierenden Strang, und zwar nach der Separation der Altweltaffen von den Neuweltaffen (Schneider, 1995; Chu et al., 1995; Sverdlov, 2000). Für die Superfamilie der HERV-K-Viren konnte gezeigt werden, daß im Genom ungefähr 50 Kopien kompletter Proviren und 25000 Kopien singulärer LTRs vorkommen (Ono et al., 1985; Leib-Mösch et al., 1993). Die Suche nach homologen Sequenzen zu HERV-K(C4) in der EMBL-Datenbank zeigte, daß es sich um einen bisher noch nicht beschriebenen Virus-Typ handelt, der die stärksten Homologien zu HERV-K10 und zum *Mouse mammary tumor virus* (MMTV; Typ B Retrovirus) aufzeigt (Chu et al., 1995, Dangel et al., 1994; Schneider, 1995).

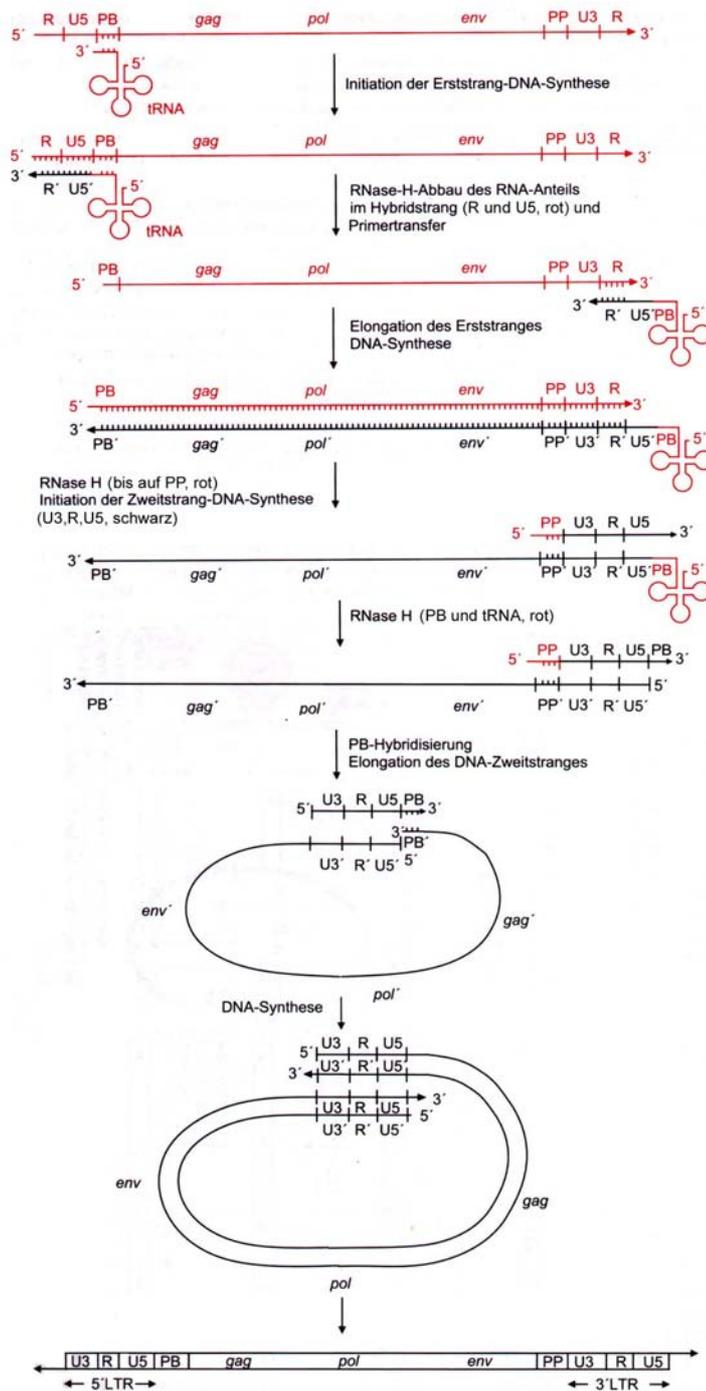
Die Insertionsstelle des HERV-C4 Provirus im langen Intron 9 wird durch einen *Target Site Repeat* (TSR) von 6 bp Länge mit der Sequenz 5'-CAGACA-3' beidseitig flankiert (Position 283 und 6350), der hingegen nur einmal im kurzen Intron vorhanden ist (Position 278). Daran schließt sich auf jeder Seite der Insertion je ein *Long Terminal Repeat* (LTR) von 548 bzw. 550 bp Länge an, die an den Positionen 289-837 (LTR2, entspricht dem 3'LTR, bezogen auf die Transkriptionsrichtung der retroviralen Insertion) bzw. 6100-6648 (LTR1, entspricht dem 5'LTR) lokalisiert sind und die Expression der retroviralen Gene über regulatorische Sequenzen steuern. LTRs entstehen im Verlauf der reversen Transkription, wenn das virale RNA-Genom durch die reverse Transkriptase in mehreren Schritten in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben wird (siehe Abb. 1.6) (Urnovitz und Murphy, 1996). Vor allem in der U3 Region, d.h. am 5'-Ende des Provirus, sind transkriptionale regulatorische Elemente zu finden (TATA-Box und SV40-Enhancer), wohingegen die Sequenzen für die Integration und Transposition in der R- und U5-Region vermutet werden (Domansky et al., 2000). Ein Polyadenylierungssignal ist im 5' LTR (LTR1), jedoch nicht im 3' LTR (LTR2) vorhanden. Die beiden LTRs aus Intron 9 weisen zueinander eine Homologie >95% auf (Dangel et al., 1994). Sie unterscheiden sich durch kurze Deletionen von 1-11 bp sowie durch eine Reihe von Punktmutationen (Chu et al., 1995; Dangel et al., 1994). Eine Homologie von über 90% der LTRs von HERV-K(C4) wurde zu einer genomischen Sequenz aus der Nähe des Chorea-Huntington-Genortes auf Chromosom 4 (HD, Baxendale et al., 1993) nachgewiesen.



**Abb. 1.6:** Schematische Darstellung der retroviralen Insertion in Intron 9 des C4-Gens. Kb Maßstab; kurzes Intron 9 mit Insertionsstelle (--); langes Intron 9 mit Insertion und Lage der retroviralen Gene sowie Angabe der beobachteten Homologien zu anderen bekannten Sequenzen (aus: Chu et al., 1995). Erklärung siehe Text.

Außer zu den hochspezifischen Sequenzen der LTRs konnten dort jedoch keine weiteren Homologien festgestellt werden. Vermutlich handelt es sich bei dieser einzelnen stark homologen Kopie eines HERV-K(C4)-LTRs um eine ehemalige Insertionsstelle des gleichen Retrovirus, die jedoch wieder ausgeschnitten wurde (Chu et al., 1995). Die retroviralen LTRs besitzen an den jeweiligen Insertionsstellen je einen typischen *Inverted Repeat* (IR) von 7 bp Länge mit den Sequenzen TGTTGGG- (LTR2).....(LTR1)-CCCAACA. Diese IRs liegen bei eukaryotischen Retroviren konserviert vor (Shapiro und Cordell, 1982). Exakt 3 bp 3' vom LTR1 liegt die 18 bp Lysin- tRNA-ähnliche Bindungsstelle (PBS), sowie 2 bp 5' vom LTR2 eine Polypurin-Sequenz (PPT) von 23 bp. Das RNA-Genom jedes Virus bindet über die PBS eine tRNA der Wirtszelle und wird zusammen mit dieser in die Virushülle verpackt. Die tRNA dient bei erneuter Infektion über ihr freies 3'OH-Ende als Startpunkt für die virale Minus-Strang-Synthese und fungiert somit als Primer der reversen Transkription. Die Lys-tRNA-PBS-Sequenz wurde bereits bei HIV, MMTV (*Mouse mammary tumor virus*) (Kennedy et al., 1982) als auch bei dem nah verwandten Virus HERV-K10 (Ono et al., 1986) gefunden. Die PPT dient als Primer für die Synthese der Plus-DNA-Stränge (Arkhipova et al., 1986; Darnell et al., 1990; Varmus und Brown, 1989) (siehe Abb. 1.6).

Die stärksten Sequenzhomologien im Vergleich zu HERV-K konnten für die retroviralen Gene gag (547), pol (1890) und env (1874 bp) nachgewiesen werden (siehe Anhang 1). Die bis zu 88% homologen Sequenzen im Bereich dieser Gene erstrecken sich über bis zu 1,3 kb, werden jedoch häufig durch kurze Deletionen und Insertionen von 10-25 bp unterbrochen (Chu et al., 1995; Dangel et al., 1994). Eine Vielzahl von offenen Leserastern in dieser Region deutet auf das Vorliegen von multiplen Stopcodons und Leseraster-Verschiebungen in allen drei Leserahmen hin.



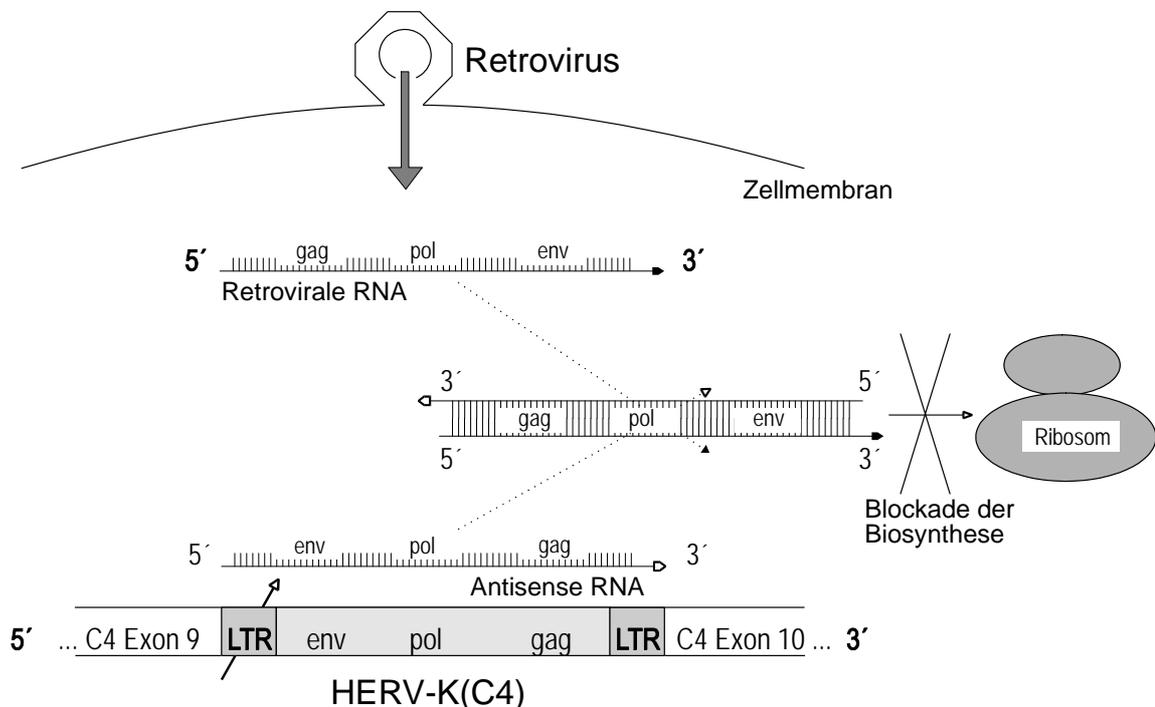
**Abb. 1.7:** Der Mechanismus der reversen Transkription. Das virale RNA-Genom wird durch die Reverse Transkriptase in mehreren Schritten in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben, die länger als die ursprüngliche Matrize ist. Das mRNA-Genom des Virus und die von ihm gebundene tRNA sind rot dargestellt, die Sequenzen, die im Verlauf der reversen Transkription in DNA umgeschrieben werden, schwarz. Eine tRNA initiiert als Primer die Synthese der Minus-Strang-DNA ausgehend vom 5'-Ende des viralen RNA-Genoms. Die Virus-codierte RNase H entfernt den RNA-Anteil des DNA-RNA-Hybrids. Erster Sprung: die neusynthetisierte DNA hybridisiert mit ihrem R-Bereich an das 3'-Ende der RNA. Der Minus-Strang-DNA wird komplett synthetisiert. Die RNA wird fast vollständig abgebaut. Der Polypurin-Schwanz initiiert als Primer die Plus-Strang-Synthese. Die restl. RNA und die tRNA werden entfernt. Zweiter Sprung der DNA. Die Plus-Strang-DNA wird komplett synthetisiert. Die LTRs der doppelsträngigen DNA bestehen aus den Elementen U3, R und U5. (modifiziert nach Modrow und Falke, 1998)

Daraus kann geschlossen werden, daß die retroviralen Gene aufgrund der Mutationen funktionell inaktiv sind (Chu et al., 1995; Dangel et al., 1994; Löwer et al., 1996; Tönjes et al., 1996). Die Subregion des pol-Gens ist durch die Anwesenheit einer 830 bp langen AT-reichen Region (der Anteil von A und T liegt bei 72,7%) charakterisiert. Die pol-Sequenz kann in eine für die Reverse Transkriptase codierende Region von 1440 bp Länge und eine für die Integrase codierende von 450 bp Länge unterteilt werden.

### **1.2.3 Funktionelle Bedeutung von HERV-K(C4) im menschlichen Genom**

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, daß endogene Retroviren aufgrund integraler Mutagenese eine wichtige Rolle bei der Modifizierung der Expression von Wirtszellgenen spielen, was zu der Pathogenese von genetischen, krebsartigen oder autoimmunen Krankheiten führen kann (Gray, 1991; Mountz und Talal, 1993). Das HERV-K(C4)-Provirus ist durch eine große Zahl an Leseraster- und Punktmutationen so verändert, daß es in seiner Eigenschaft als Virus funktionell inaktiv ist. Die funktionelle Bedeutung der HERV-K(C4)-Insertion ist daher unbekannt. Da HERV-K(C4) jedoch in umgekehrter Orientierung relativ zum C4-Gen angeordnet ist, spekulierten Dangel und Kollegen (1994), ob dies einen Vorteil für die natürliche Selektion darstellen könnte. Es wurde die Hypothese aufgestellt, ob die retrovirale Insertion HERV-K(C4) aufgrund ihrer umgekehrten Lage im C4-Gen einen Schutz gegen homologe exogene Retroviren vermitteln könnte. Bei einer retroviralen Integration in gleicher Richtung zur codierenden Sequenz des Wirtsgenoms würde der codierende Strang des Retrovirus jedesmal mit dem C4-Gen transkribiert werden. Dies hätte aufgrund der Bildung infektiöser Nachkommen zu einer Zerstörung der Zelle führen können (siehe Abb. 1.2). Eine mögliche Transkription der retroviralen Sequenz in entgegengesetzter Orientierung ergibt jedoch ein Antisense-Transkript, welches über komplementäre Hybridisierung als Schutz gegen den Angriff verwandter exogener Retroviren mit homologen Sequenzen fungieren könnte (Schneider, 1995), indem es mit der infizierenden retroviralen mRNA einen Heteroduplex-Strang bildet (siehe Abb. 1.8). Dadurch würde die Translation des exogenen Retrovirus blockiert, bis dieser Doppelstrang durch Nukleasen abgebaut wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Modell-System etabliert (Schneider et al., 2001a): Offene Leseraster bzw. Sequenzen ohne Terminationscodons aus den gag-, pol- und env-Bereichen wurden in Sense-Orientierung (bezogen auf die Transkriptionsrichtung des Provirus) in einen Vektor kloniert (siehe Abb. 2.2), der die Expression eines HERV-K-Galaktosidase-Fusionsproteins erlaubt und ein exogenes Retrovirus nachahmt. Als Zielzellen

wurden Maus-Fibroblasten (L-Zellen) eingesetzt, die stabil mit dem menschlichen C4A- bzw. C4B-Gen einschließlich der HERV-Insertion transfiziert worden waren (Miura et al., 1987). Diese LC4-Zellen sowie als Kontrolle die Wildtyp-L-Zellen (LM(TK<sup>-</sup>)) wurden dann als Modell einer exogenen Infektion mit den retroviralen Konstrukten transient transfiziert. Schneider und Kollegen (2001a) konnten zeigen, daß die Expression des Fusionsproteins, die proportional zu der gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ist, nach transients Transfektion in C4 exprimierende LC4A und -B-Zellen signifikant abnimmt. Diese Abnahme konnte dosisabhängig durch IFN- $\gamma$  gesteigert werden, da dieses Cytokin generell die C4-Expression stimuliert und es somit zu einer Akkumulation der Antisense-mRNA kommen könnte (Mitchell et al., 1996; Vaishnaw et al., 1998). In diesem Zusammenhang konnte mittels RT-PCR in der HepG2-Zelllinie eine HERV-K(C4)-spezifische-RNA nachgewiesen werden (Schneider et al., 2001a). Es konnte jedoch nicht unterschieden werden, ob diese Antisense-mRNA auf die Transkription des C4-Gens zurückzuführen ist oder ob die HERV-K-Insertion selbst in der Lage ist, die Transkription einer retroviralen Antisense-mRNA zu initiieren.



**Abb. 1.8:** Modell zum Schutz vor retroviraler Infektion durch ein HERV-K(C4)-Antisense-Transkript und Heteroduplex-Bildung (aus: Schneider, 1995)

In diesem Zusammenhang konnten Dangel und Kollegen (1994) in verschiedenen Zelllinien zeigen, daß der LTR2 in der Antisense Orientierung funktionell aktiv ist und somit in der Lage wäre, ein eigenständiges HERV-K(C4)-Transkript zu initiieren. Da eine Reihe von solitären LTRs im menschlichen Genom enthalten sind und diese meist in der Nähe von zellulären Genen lokalisiert sind (Domansky et. al., 2000), wurde schon mehrfach darüber spekuliert, daß diese Einfluß auf die Expression und Regulation zellulärer Gene haben könnten.

### **1.3 Aufgabenstellung**

In der vorliegenden Arbeit sollten die Untersuchungen von Schneider und Kollegen (2001a), Chu und Kollegen (1995) sowie Dangel und Kollegen (1994) zur Struktur und Funktion der retroviralen Insertion HERV-K(C4) weitergeführt werden.

Im einzelnen sollte durch molekular- und zellbiologische Untersuchungen gezeigt werden, ob dieses retrovirale Element, obwohl es aufgrund zahlreicher Mutationen inaktiv ist, im Rahmen einer Antisense-Funktion Schutz gegen akute retrovirale Infektionen der Zelle vermitteln kann. Um diese Hypothese zu unterlegen, sollte ein spezifischer Nachweis von HERV-K(C4)-Antisense RNA-Transkripten in verschiedenen humanen Geweben und Zelllinien erfolgen, der gleichzeitig über deren Struktur und Entstehung aufklären sollte. In diesem Zusammenhang sollten des weiteren die LTRs von HERV-K(C4) hinsichtlich ihrer Promotoraktivität untersucht werden. Ziel dieser Arbeit war:

1. Der Nachweis und die Quantifizierung von HERV-K(C4)-Antisense Transkripten in verschiedenen humanen Zelllinien und Geweben mittels RT-PCR. Durch den Einsatz verschiedener Primerpaare, die sowohl innerhalb der HERV-K(C4) Insertion als auch im C4-Gen binden, sollte geklärt werden, ob es sich dabei um C4-prä-mRNA, Spleißprodukte oder unabhängig von der C4-Expression entstandene Transkripte handelt. Zur weiteren Aufklärung der Spezifität und Struktur der nachgewiesenen HERV-K(C4)-Antisense Transkripte wurden RNaseProtection Assays und Northern Blots durchgeführt.
2. Die Analyse der LTRs von HERV-K(C4) hinsichtlich ihrer Promotoraktivität in beiden Orientierungen und Regulierbarkeit durch Wirtsfaktoren in der humanen HepG2-Zelllinie und der Affenzelllinie COS7. Es galt, dadurch zu klären, ob die HERV-K(C4)-Transkription möglicherweise unabhängig von der des Komplement

C4-Gens erfolgt und reguliert werden kann. Dazu wurde ein Reportergensystem etabliert, mit dessen Hilfe nach transienter Transfektion in geeignete Zelllinien über einen Luciferase-Assay die Promotoraktivität bestimmt werden konnte.

3. Die Weiterführung der Untersuchungen von Schneider und Kollegen (2001a) zum Nachweis einer möglichen Antisense-Wirkung der HERV-K(C4)-Insertion zur Abwehr retroviraler Infektionen durch in-vitro Untersuchungen von HepG2-Zellen. Die humane HepG2-Zelllinie exprimiert im Gegensatz zu in den vorherigen Untersuchungen verwendeten Mausfibroblasten-Zelle konstitutiv C4 und sollte somit als ein humanes Modell dienen.
4. Die Etablierung eines retroviralen Infektionsmodells an murinen Zelllinien. Mit dieser Versuchsreihe sollte der funktionelle Nachweis einer direkten Beeinflussung bzw. Inhibition der Expression proviraler Gene nach akuter Infektion von in-vitro synthetisierten infektiöser Virionen durch endogene Antisense Transkripte der HERV-K(C4)-Insertion geführt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen weitere Aufschlüsse über eine mögliche Strategie des Wirtsorganismus geben, der über Antisense-Transkripte den Lebenszyklus infizierender Retroviren blockieren und somit Schutz vor deren pathogenen Eigenschaften erhalten könnte.

## 2. MATERIAL UND METHODE

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Methoden nach Maniatis et al. (1989) durchgeführt und gegebenenfalls modifiziert.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborchemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
30% Acrylamidstammlösung mit 0,8 Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma-Aldrich, München
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Life Science, München
Blue Dextran	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Cell Dissociation Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Ciprofloxacin (cib)	Bayer Diagnostics
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethyl Sulfoxid (99,5%)	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma-Aldrich, München
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
FuGene™6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Fluka Biochemika, Seelze
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Invitrogen, Karlsruhe
Hoechst DYE 33258	AppliChem, Darmstadt
Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)	eurobio, Frankreich

Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
McCoy's 5A	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
N-Laurylsacrosine	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, München
Pepton	SERVA, Heidelberg
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phosphat buffered saline (PBS)	Apotheke des Klinikums Uni Mainz
Repel Silane	Amersham Biosciences, Braunschweig
Rinderserum Albumin (BSA)	New England BioLabs, Frankfurt
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Template Suppression Reagent (TSR)	PE Biosystems, Maryland, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
tRNA from bakers yeast	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, München
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, München

**2.1.2 Radiochemikalien**

Cytidine-5'-Trisphosphate 500 µCi	ICN, Biomedicals, Eschwege
Desoxycytidine-5'-Trisphosphate 250 µCi	ICN, Biomedicals, Eschwege

**2.1.3 Labormaterialien**

Gel Bond®PAG film, support of polyacrylamidgels	Biozym, Oldendorf
λ-DNA/Hind III (Längenstandard)	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs)	peqLab, Erlangen

100 bp Leiter (Längenstandard)	Invitrogen, Karlsruhe
Petrischalen 94/16mm, 60/15 mm	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Falcon 3911, Micro Test III™ Flexible Assay Plate	BD Biosciences, Heidelberg
Disposable Cell Scraper	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reagenz Röhrchen 12 ml, steril	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Einmalspritzen 20 ml	B/Braun, Melsungen
Syringe Filter, free cellulose acetat membran, steril	NALGENE, Belgien
Einmal Injektions-Kanüle 0,80x40, 21G x 1½	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Nick™ Column	Amersham Biosciences, Braunschweig
Light Cycler Capillaries	Roche Diagnostics, Mannheim
Fuji x Ray 100 NIF, 24x30	Bechthold, Kelkheim
Gene Pulser® Cuvette	Bio Rad Life Science, München

## **2.1.4 Medien, Puffer, Lösungen**

### **2.1.4.1 DNA**

#### **2.1.4.1.1 Isolierung von DNA**

##### **DNA-Extraktionspuffer**

25 mM EDTA  
75 mM NaCl  
10 mM Tris; pH 7,5  
0,2 mg Proteinase K

#### **2.1.4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese**

##### **1x TBE + Ethidiumbromid**

90 mM Tris/HCL; pH 8,3  
90 mM Borsäure  
2,5 mM EDTA; pH 8  
60 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)/2 L Puffer

##### **5x DNA-Ladepuffer**

0,25 % w/v Bromphenolblau  
0,25 % w/v Xylencyanol  
30 % w/v Glycerin

### **2.1.4.2 RNA**

Um die Degradation der RNA durch ubiquitär vorhandene RNA-degradierende Enzyme (RNasen) zu verhindern, wurden nur RNase freie Chemikalien, Plastikeinmalware oder bei 180°C für 8 h gebackenes Glas eingesetzt. Alle Lösungen wurden mit DEPC behandelt und autoklaviert. Diethylpyrocarbonat (DEPC) modifiziert Histidinreste in Proteinen zu N-Carboxyhistidin und führt dadurch u.a. zur Hemmung von Enzymen. DEPC-behandeltes Wasser wurde gewonnen, indem 1 Liter Aqua bidest für 1 h mit 1 ml DEPC (0,1% v/v DEPC) versetzt und anschließend autoklaviert wurde. DEPC reagiert mit H<sub>2</sub>O unter Hydrolyse zu EtOH und CO<sub>2</sub>. Beim Autoklavieren von DEPC-behandelten Lösungen wird DEPC vollständig zersetzt.

**2.1.4.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA****Guanidiniumthiocyanatlösung**

4 M      50 g      Guanidiniumthiocyanat  
25 mM    3,52 ml    0,75 M Natriumcitrat; pH 7,0  
0,5 % v/v 5,28 ml    10% N-Laurylsacrosine (1g/10ml)  
            58,6 ml    Aqua bidest

**Denaturierungslösung**

15 ml Denaturierungslösung  
105 µl 2-Mercaptoethanol  
1,5 ml 2M Natriumacetat; pH4  
15 ml Phenol

**2.1.4.2.2 Agarose/Formaldehyd Gelelektrophorese****Formamid-Denaturierungspuffer (1ml)**

100 µl 10 x MOPS  
500 µl Formamid (100%, deionisiert)  
162 µl Formaldehyd (37%)  
238 µl Aqua bidest  
frisch ansetzen

**RNA-Ladepuffer**

1 mM      EDTA; pH 8  
0,25% w/v Bromphenolblau  
0,25% w/v Xylencyanol  
50 % v/v Glycerin  
bei 4°C lagern

**10x MOPS**

200 mM MOPS  
80 mM Natriumacetat; pH 5,2  
10 mM EDTA; pH 8

**2.1.4.2.3 RNase-Protection Assay****5x Hybridisierungspuffer (10 ml)**

200 mM    2 ml    1 M Hepes  
2 M        4 ml    5 M Natriumchlorid  
5 mM     100 µl 0,5 M EDTA  
            3,9 ml    Aqua bidest

bei 4°C lagern

**Formamid Hybridisierungspuffer (1:5)**

400 µl Formamid (100%, deionisiert)  
100 µl 5x Hybridisierungspuffer  
frisch ansetzen

**6% Acrylamid-Harnstofflösung (360 ml)**

6%      72 ml    Acrylamid (30:0,8)  
1x      75 ml    5x TBE  
8M     173 g    Harnstoff  
ad Aqua bidest

Die Lösung wurde vor Gebrauch filtriert und entgast.  
bei 4°C im dunkeln lagern

**6% Acrylamidgel (60ml)**

60 ml Acrylamid-Harnstoff-Lösung  
48 µl TEMED  
600 µl 10% w/v APS (frisch ansetzen)

**Formamid-Ladepuffer (10ml)**

80% v/v    8 ml    Formamid (100%, deionisiert)  
1mM        20 µl    0,5 m EDTA  
0,25% w/v 50 µl    0,05% Bromphenolblau/Xylencyanol  
ad Aqua bidest  
bei 4°C lagern

**5x TBE**

450 mM Tris/HCL; pH 8,3  
450 mM Borsäure  
10 mM EDTA; pH8

**TE-Puffer:**

10 mM            Tris HCl  
1 mM            EDTA  
pH 7,4

**2.1.4.2.3.1 Silberfärbung**

**Fixierer (500 ml)**

10 % 50 ml EtOH  
 0,5% 2,5 ml Essigsäure  
 ad Aqua bidest

**Entwickler (500 ml)**

1,5 % 7,5 g NaOH  
 0,01 % 0,05 g NaBH<sub>4</sub>  
 0,4 % 5,4 ml Formaldehyd (37%)  
 ad Aqua bidest, lichtgeschützt

**Silbernitratlösung (500 ml)**

0,1% 0,5 g AgNO<sub>3</sub>  
 ad Aqua bidest  
 lichtgeschützt

**Konservierer (500 ml)**

2% 10 ml Essigsäure  
 2% 12 ml Glycerin (80%)  
 ad Aqua bidest

**2.1.4.2.4 Northern Blot**

**20 x SSC**

3 M NaCl  
 0,3 M Natriumcitrat; pH 7

**Waschlösung 1**

2 x SSC  
 0,05% SDS

**Waschlösung 2**

0,1 SSC  
 0,1% SDS

**2.1.4.3 Zellkultur**

**Kulturmedium**

174,8 ml DMEM  
 10 % 20 ml FCS  
 1 % 2 ml Natriumpyruvat  
 1 % 2 ml Pen/Strep (1000 U/10 µg pro 1 ml)  
 0,5% 1 ml HEPES (2,38g/10 ml)  
 0,1% 0,2 ml cib

173,8 ml RPMI  
 10% 20 ml FCS  
 1% 2 ml L-Glutamin ()  
 1% 2 ml Natriumpyruvat  
 1% 2 ml Pen/Strep

178 ml Mc Coy's 5A  
 10% 20 ml FCS  
 1% 1 ml L-Glutamin  
 1% 2 ml Pen/Strep

bei 4°C lagern

**1xPBS (Phosphate Buffered Saline)**

137 mM NaCl  
 2,7 mM KCL  
 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 pH 7,4

**1x Trypsin/EDTA**

0,05 % (w/v) Trypsin  
 0,53 mM EDTA  
 bei 4°C lagern

**Einfriermedium**

80% Fötale Kälberserum (FCS)  
 20% Dimethylsulfoxid (DMSO)  
 unmittelbar vor Gebrauch ansetzen und auf Eis vorkühlen

**2.1.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

**DNA-Messung**

**10x TEN-Puffer**

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
1 M NaCl  
pH 7,3

**DNA-Meßlösung**

10 ml 10x TEN  
90 ml Aqua. Dest  
steril filtrieren  
10 µl Hoechst Dye 33258  
pH 7,3

**RNA-Messung**

**10x TE-Puffer**

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
pH 7,4

**RNA-Meßlösung**

5 ml 1x TE-Puffer  
25 µl RiboGreen (1:200 verd.)

**2.1.4.5 Bakterien**

**LB-Medium**

10 g Pepton  
10 g NaCl  
5 g Hefeextrakt  
ad 1 L mit Aqua bidest  
autoklavieren

**Psi-broth-Nährlösung**

5 g Hefeextrakt  
5 g Magnesiumsulfat  
20 g Pepton  
ad 1 L mit Aqua bidest, pH 7,6  
autoklavieren

**Tfb I**

30 mM Kaliumazetat  
100 mM Rubidiumchlorid  
10 mM Kalziumchlorid  
50 mM Manganchlorid  
15% v/v Glycerin  
pH 5,8; steril filtrieren

**Tfb II**

10 mM MOPS  
75 mM Kalziumchlorid  
10 mM Rubidiumchlorid  
15% v/v Glycerin  
pH 6,5; autoklavieren

**Agarplatten**

500 ml LB-Medium  
7,5 g Agar  
1 ml Ampicillin (50 mg/ml)

**TELT-Puffer**

50 mM Tris-HCL (pH 8)  
62,5 mM EDTA  
2,5 mM Lithiumchlorid  
4% v/v Triton X-100

**2.1.5 Kits**

Qiagen Plasmid Midi Kit (50)  
Qiagen Plasmid Maxi Kit (25)  
QIAquick PCR Purification Kit (250)  
QIAquick Gel Extraction Kit  
ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit  
ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit  
Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer

QIAGEN, Hilden  
QIAGEN, Hilden  
QIAGEN, Hilden  
QIAGEN, Hilden  
PE Biosystems, Weiterstadt  
PE Biosystems, Weiterstadt  
Promega, Mannheim

m-RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
SAWADY 'Mid Range PCR' -System	peqLab, Erlangen
Riboprobe Combination System Sp6/T7	Promega, Mannheim
RiboGreen®RNA Quantitation Reagent And Kit	Molecular Probes, Niederlande
1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics, Mannheim
Light Cycler-DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Retroviral Packaging System	BD Biosciences, Heidelberg
Human 12-Lane MTN Blots (#7780-1)	BD Biosciences, Heidelberg

**2.1.6 Enzyme**

T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Xho I	New England BioLabs, Frankfurt
Hind III	New England BioLabs, Frankfurt
EcoRI	Promega, Mannheim
Not I	New England BioLabs, Frankfurt
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RQ1-RNase Free DNase	Promega, Mannheim
Transcriptor Reverse Transcriptase	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase I <sub>f</sub>	New England BioLabs, Frankfurt

**2.1.7 Zytokine**

γ-Interferon (human, rekombinant)	Roche Diagnostics, Mannheim
-----------------------------------	-----------------------------

**2.1.8 Vektoren und Bakterienstämme**

pGEM®-3Z Vector	Promega, Mannheim
pGL3-Enhancer Vector	Promega, Mannheim
pGL3 Control Vector	Promega, Mannheim
CMV-β-FUSb Vector	Schneider et al, 2001a
pSV-β-Galaktosidase Vector	Promega, Mannheim
pLEGFP-N1 Retroviral Vector	BD Biosciences, Heidelberg
pEco Retroviral Vector	BD Biosciences, Heidelberg
pCR®4-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe

Lamda-Phagen Klon

Der C4A91-spezifische Lambda-Klon A12 stammt aus einer menschlichen genomischen EMBL3-Genbank des Haplotyps, HLA-A3-Cw6, Bw47, C4A91, C4BQ0, DR7. Dieser umfaßt mit einer Länge von ca. 21 kb aus der MHC-Region annähernd das gesamte C4-Gen (Schneider, 1987).

E. coli JM 109	BD Biosciences, Heidelberg
----------------	----------------------------

### 2.1.9 Zelllinien

HepG2:	humane Hepatomzelllinie; adhären wachsende epitheliale Leberkrebszellen. Zelllinien, die von Krebszellen abstammen, unterscheiden sich in vielen Merkmalen von Linien aus untransformierten Zellen. Da der Differenzierungsgrad der HepG2-Zellen derjenigen normaler Hepatozyten vergleichbar ist (Knowles et al., 1980), können sie jedoch als geeignetes Modell dienen.
COS7:	Grüne Meerkatze-Nieren-Zellen; Fibroblasten; SV40 transformiert; adhären wachsend.
HS27:	humane Hautfibroblasten Zelllinie; adhären wachsend,
NIH3T3:	embryonale Maus-Fibroblasten; adhären wachsend
LM(TK <sup>-</sup> )	Maus C34-Fibroblasten Zelllinie, L-Zellen; adhären wachsend
HT29:	humane Darm Adenokarzinom Grad II Zelllinie, Epithelzellen, adhären wachsend
Leberfibroblasten:	aus einer humanen Leber Explantation isolierte primäre Bindegewebszellen; adhären wachsend; freundlichst zur Verfügung gestellt von Dr. G. Ramadori, Göttingen
Mono Mac6:	ursprünglich im peripheren Blut vorkommend durch akute Leukämie transformierte humane Monocyten Zelllinie; Suspensionszellen
B-Zellen:	humane Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformierte B-Lymphocytenzellen (Kruger, 2003); Suspensionszellen
B-Zellen ID-Nr. 47	humane EBV-transformierte B-Lymphocytenzellen; AQ0Del/B1 homozygot (Dr. Thorsten Witte, Hannover).
CD4 <sup>+</sup> T Zellen:	aus PBMC ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ) separierte CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen (Kruger, 2003); Suspensionszellen
EcoPack2 <sup>TM</sup> -293:	ecotrophe Adenovirus Typ 5 DNA transformierte Verpackungszelllinie, die sich von der embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 ableiten lässt; die Zellen exprimieren die MMLV gag, pol und env Proteine; semi-adhären wachsend; Produktion von hohen Titer an Moloney basierenden Virionen durch transiente Transfektion. Zielzellen: Maus- und Rattenzellen (BD Biosciences); adhären wachsend (BD, Biosciences)
GP2-293:	Adenovirus Typ 5 DNA transformierte Verpackungszelllinie, die sich von der embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 ableiten lässt; die Zellen exprimieren die MMLV gag, und pol Proteine; Produktion von hohen Titer an Moloney basierenden Virionen durch transiente Transfektion eines retroviralen Vektors und Cotransfektion eines Vectors, der für ein bestimmtes env Protein codiert; die Wirtsspezifität wird durch das cotransfizierte envelope Protein bestimmt; semi-adhären wachsend (BD, Biosciences).

### 2.1.10 Gewebeproben

250 mg postmortales Gewebe von Haut, Herz, Niere, Muskel, Milz, Gehirn und Leber wurden einer ca. 18-24 h alten Leiche im Rahmen einer Obduktion am Institut für Rechtsmedizin, Mainz, entnommen. Die kryokonservierten Leberbiopsieproben wurden freundlichst zu Verfügung gestellt von HD Dr. Thomas Höhler, Uniklinik Mainz.

**2.1.11 Oligonukleotidsynthese**

**Tabelle 2.1:** Sequenzen der für die RT-PCR, PCR und Sequenzierung verwendeten Primer

<b>Primer</b>	<b>Sequenzen</b>
Exon 9 HindIII 5' <sup>1</sup>	5'-CCGAAGCTTCCTCTACGTTGCTGCAGC-3'
LTR2-rev-EcoRI 3' <sup>1</sup>	5'-CCC <u>GAATTC</u> ACATTCTCATTGGAG-3'
Exon 9 do <sup>2</sup>	5'-CCTCTACGTTGCTGCAGCCAT-3'
LTR2 up <sup>2</sup>	5'-GCTCTGAGCCTTTTGCAGCCT-3'
Ex 10 up <sup>2</sup>	5'-TACCAGGATGTGAGCTCTGCC-3'
gag-EcoRI 5' <sup>1</sup>	5'-GGATGAATTCGAAGGAGTTGGAAAGGACCTTA-3'
gag-HindIII 5' <sup>1,2</sup>	5'-GGATA <u>AAGCTT</u> ATGGAAGGAGTTGGAAAGGACCTTA-3'
gag-HindIII 3' <sup>1,2</sup>	5'-GGATA <u>AAGCTT</u> TATAAAGCACCCCCAACTTTTC-3'
pol-EcoRI 5' <sup>1</sup>	5'-GGATGAATTCGCTGAATTACTTATAGCACCTG-3'
pol-HindIII 5' <sup>1,2</sup>	5'-GGATA <u>AAGCTT</u> ATGGCTGAATTACTTATAGCACCTG-3'
pol-HindIII 3' <sup>1,2</sup>	5'-GGATA <u>AAGCTT</u> TAAAGGCAAGTCTGAGTCAATC-3'
env-EcoRI 5' <sup>1</sup>	5'-GGATGAATTCACATCTCTGATCACACTATGG-3'
env-HindIII 5' <sup>1,2</sup>	5'-GGATA <u>AAGCTT</u> ATGTACATCTCTGATCACACTATGG -3'
env-HindIII 3' <sup>1,2</sup>	5'-GGATA <u>AAGCTT</u> TAATTTGGAGTGTTTAGGGCCTA-3'
β-actin-HindIII 5' <sup>1,2</sup>	5'-GCCAAGCTTGTGGGGCGCCCCAGGC-3'
β-actin-EcoRI 3' <sup>1,2</sup>	5'-GCC <u>GAATTC</u> CATACCCCTCGTAGAT-3'
β-actin for 5' <sup>2</sup>	5'-GTGGGCGCTCTAGGCACCA-3'
β-actin rev 3' <sup>2</sup>	5'-TAGCCCTCGTAGATGGGCACAG-3'
C4-EcoRI 5' <sup>1,2</sup>	5'-GGAGAATTCGGGTCTTTGCTCTGGATC-3'
C4-HindIII 3' <sup>1,2</sup>	5'-GTAAAGCTTCCTGGAACCTGCCTTTGAG-3'
C4-exon4 5' <sup>2</sup>	5'-GGGTCTTTGCTCTGGATCAGA-3'
C4-exon9 3' <sup>2</sup>	5'-CCTGGAACCTGCCTTTGAGA-3'
LTR1-for-Hind <sup>1</sup>	5'-CCC <u>AAG CTT</u> CCT CTG TTT CAC ATG CTT GAG-3'
LTR1-rev-Xho <sup>1</sup>	5'-CCG <u>CTC GAG</u> CAC AGG CTG CCG TAT TCC-3'
LTR1-for-Xho <sup>1</sup>	5'-CCG <u>CTC GAG</u> GTC CTC TGT TTC ACA TGC TTG-3'
LTR1-rev-Hind <sup>1</sup>	5'-CCC <u>AAG CTT</u> CAC AGG CTG CCG TAT TCC-3'
LTR2-for-Hind <sup>1</sup>	5'-CCC <u>AAG CTT</u> TTC TGC TCA TTC CTT CAC-3'
LTR2-rev-Xho <sup>1</sup>	5'-CCG <u>CTC GAG</u> ACA TTC TCA TTG GAG CTA C-3'
LTR2-for-Xho <sup>1</sup>	5'-CCG <u>CTC GAG</u> GTT CTG CTC ATT CCT TCA-3'
LTR2-rev-Hind <sup>1</sup>	5'-CCC <u>AAG CTT</u> ACA TTC TCA TTG GAG CTA C-3'
EGFPN1	5'-GTG AAC CGT CAG ATC CGC TAG C-3'
EGFPN2	5'-CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA CCA G-3'
EGFPN1.2 <sup>3</sup>	5'-GCC ACC CTG GTC TAT ATA GC AG-3'
M13 Uni <sup>3</sup>	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
M13 rev <sup>3</sup>	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
5'RVprimer <sup>3</sup>	5'-CTA GCA AAA TG GCT GTC CC-3'
3'GLprimer <sup>3</sup>	5'-CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA-3'
6 <sup>2</sup>	5'-TCGGCACAAGTGCCATCTCTCCT -3'
3b <sup>2</sup>	5'-TCCTTCCCAACTTTGAGG-3'

<sup>1</sup>: zur Generierung von DNA-Fragmenten für ein Klonierungsexperiment verwendete Primer; die an das 5'-Ende eines jeden Primers angefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen

<sup>2</sup>: für die RT-PCR verwendete sequenzspezifische Primer

<sup>3</sup>: nur für die Sequenzierung verwendete Primer

Die Oligonukleotide (Primer) wurden bei den Firmen Roth GmbH (Karlsruhe) und Invitrogen (Karlsruhe) bestellt. Die Primersequenzen wurden im Vorfeld mittels Programmen, die im Internet verfügbar sind (siehe 2.1.11), auf Sekundärstrukturen (Oligo Analyzer, Bioinformatik) und unspezifischen Bindungsstellen (BLAST) im menschlichen Genom überprüft.

### **2.1.12 Internetrecherche**

Oligo Analyzer 3.0	<a href="http://biotools.idtdna.com/analyzer/oligocalc.asp">http://biotools.idtdna.com/analyzer/oligocalc.asp</a>
NEBcutter V2.0	<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php">http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php</a>
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
RNA Journal	<a href="http://www.rnajournal.org">http://www.rnajournal.org</a>
Bioinformatik, Michael Zuker	<a href="http://www.bioinfo.rpi.edu/~zukerm">http://www.bioinfo.rpi.edu/~zukerm</a>

### **2.1.13 Geräte**

CO <sub>2</sub> -Brutschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen
Luminometer	Berthold, Pforzheim
Fluorometer	BIORAD Versa Fluor™
Sterilbank	Gelaire Flow BSB4A
Liquid Scintillation Analyzer	Packard, Frankfurt
Hybridisierungsöfen	Bachhofer, Reutlingen
Light Cycler™	Roche Diagnostics, Mannheim
ABI Prism 310 DNA Sequencer	PE Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler PE 9600 und 2400	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Röntgenfilmentwickler QX60	Konica, Hohenbrunn
Inkubations-Schüttler CERTOMAT®IS	B.Braun Biotech, Melsungen
Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Du Ponts Instruments,
Magnetic Particle Concentrator	DYNALAS, Norwegen
BioPhotometer 6131	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	BRAND

Das Light Cycler Instrument wurde freundlichst zur Verfügung gestellt durch HD Thomas Höhler, Uniklinik Mainz

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Im Zellkulturlabor steht der Schutz der Kulturen vor Kontaminationen der verschiedensten Art (z.B. Pilze, Bakterien) im Vordergrund. Deshalb wurden alle Versuche mit Zelllinien an einem Sterilarbeitsplatz mit sterilen Geräten und Medien durchgeführt. Die Inkubation aller verwendeten Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die adhärenenten Zelllinien HepG2, HS27, COS7, EcoPack-293, GP-293, NIH-3T3, LM(TK<sup>-</sup>) und Leberfibroblasten wurden in DMEM-Medium, die HT29-Zelllinie in McCoy's-Medium kultiviert. Die Suspensionszelllinien MonoMac6 und B-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium und die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in RPMI 1640, supplementiert mit humanem AB Serum, und stimuliert mit 20U/ml IL-2, kultiviert.

#### **2.2.1.1 Zell-Passage**

Den Vorgang zur Anlage von Subkulturen und Ausdünnen nennt man Passagieren oder Splitten von Zellen. Bei zu hoher Zelldichte sinkt die Proliferationsrate stark ab, und es kommt zum Absterben der Kultur. Am Tag der Zellpassage sollten die Zellen eine Konfluenz von 80-90% aufweisen.

##### **2.2.1.1.1 Adhärenente Zellen**

Die am weitesten verbreitete Methode, adhärenente Zelllinien zu subkultivieren, ist der Gebrauch von Trypsin in Verbindung mit EDTA. Das Kulturmedium wird abgenommen und der Zellrasen zweimal mit je 10ml steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Es werden 2,5 ml Trypsin/EDTA auf den Zellrasen gegeben, sorgfältig verteilt und für 5 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen lösen sich nach Zugabe von Trypsin, einem proteolytischem Enzym, und dem Chelatbildner EDTA, der die Kalziumionen, von denen die Zell/Zell-Adhäsion abhängt, als Komplex bindet. Die abgelösten Zellen werden in 15 ml PBS aufgenommen, das mit 10% FCS (fötalem Kälberserum) supplementiert wurde, und für 10 min. bei 1500 U/min abzentrifugiert. Der Serumzusatz bewirkt eine sofortige Inaktivierung des Trypsins und vermag auch teilweise das cytotoxische EDTA zu binden. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 1ml Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Nach mikroskopischer Bestimmung der Zellzahl in einer Zählkammer (siehe 2.2.1.4) kann die Zellsuspension in gewünschter Verdünnung (1:2 bis 1:5) in eine neue Kulturflasche mit 12 ml

Medium ausgesät, eingefroren (siehe 2.2.1.2) oder für anschließende Studien verwendet werden. Das Medium wird alle 2-3 Tage bis zur nächsten Passage erneuert, was auch als "Füttern" der Zellen bezeichnet wird.

#### **2.2.1.1.2 Suspensionszellen**

Suspensionszellen bilden keine Zell/Zell-Adhäsion aus und benötigen aufgrund ihrer nicht vorhandenen Haftung an der Kulturflasche keine Trypsinisierung. Die Zellen werden mit dem Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1500 U/min für 10 min. abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml Kulturmedium aufgenommen, resuspendiert und die Zellen können in gewünschter Konzentration in eine neue Kulturflasche mit 12 ml Medium ausgesät werden.

#### **2.2.1.2 Einfrieren von Zellen**

Um sich einen bestimmten Vorrat an Zellen über einen längeren Zeitraum zu halten, ist es ratsam, die Zellen in flüssigen Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  zu lagern. Diese Lagerung bewahrt die Zellen vor Kontamination und Variabilität durch Subkultivierung. Als Schutzsubstanzen dienen Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO), die die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas verhindern.

Nachdem die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Kulturflasche abgelöst, in PBS+10% FCS aufgenommen und abzentrifugiert worden sind (siehe 2.2.1.1), wird das Pellet in 1 ml purem FCS oder Kulturmedium aufgenommen, resuspendiert und auf Eis gestellt, wo alle weiteren Arbeitsschritte durchgeführt werden. Die Zellen werden in 1 ml Einfriermedium (siehe 2.1.4.3) aufgenommen, erneut resuspendiert und in zwei Kryoröhrchen à 1ml aliquotiert. Die Kryoröhrchen werden unverzüglich bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **2.2.1.3 Auftauen von Zellen**

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen müssen vorsichtig aufgetaut werden, da das in der Einfrierlösung vorhandene DMSO beim Tauen toxisch wirkt. Die Kryoröhrchen werden aus dem Stickstoffbehälter entnommen und der Eisblock mit den Zellen schrittweise mit 1 ml FCS möglichst schnell durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Sobald ein wenig Zellsuspension aufgetaut ist, wird sie in vorgekühltes PBS+10% FCS überführt. Nach vollständiger

Überführung werden die Zellen 8 min. bei 1500 U/min zentrifugiert, damit das in der Einfrierlösung enthaltene DMSO entfernt wird. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen können nun gezählt und in der gewünschten Verdünnung in eine Kulturflasche ausgesät werden. Das Medium sollte nach 24 h noch einmal gewechselt werden, um tote Zellen und restliche Spuren von DMSO zu entfernen.

#### **2.2.1.4 Zellzahlbestimmung**

10 µl der Zellsuspension werden in 90 µl Trypanblau verdünnt, und 10 µl dieser Farblösung werden unter das Deckglas einer Neubauer Zählkammer pipettiert. Die Zellen können nun unter dem Mikroskop gezählt werden. Die Zählkammer besteht aus 9 großen Quadraten. Zur Zellzahlbestimmung werden die 4 großen Quadrate ausgezählt, die um ein zentrales Kreuz liegen und jeweils 16 kleine Quadrate enthalten. Der Faktor der Zählkammer beträgt  $10^4$ . Der Mittelwert aus den vier großen Quadraten wird daher mit  $10^4$  multipliziert. Da die Zellsuspension vor dem Zählen 1:10 in Trypanblau verdünnt wird, muss der ermittelte Wert noch mit dem Verdünnungsfaktor (in diesem Fall 10) multipliziert werden. Dies ergibt die Zellzahl pro Milliliter. Die Gesamtzellzahl entspricht dem Volumen der Zellsuspension multipliziert mit der Zellzahl pro ml.

### **2.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **2.2.2.1 Isolierung von DNA**

Zur Isolierung von hochmolekularer genomischer DNA aus Zelllinien wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit 2 ml DNA-Extraktionspuffer versetzt und homogenisiert. Durch Inkubation von ca. 10 min. bei RT in dem Proteinase K-haltigen Puffer werden die Zellen lysiert und anschließend mit 200 µl 10% SDS supplementiert. Die Proben wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, mit 700 µl NaCl versetzt und kräftig geschüttelt. Die Proteine wurden durch anschließendes Zentrifugieren für 15 min. bei 2500 U/min sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und der Vorgang einmal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 2 Volumen eisgekühlten 100%igen EtOH präzipitiert und durch Zentrifugation für 20 min. bei 13000 U/min pelletiert. Nach einem Waschschriff mit 2 ml 70%igen EtOH und erneuter Zentrifugation für 10 min. bei 13000 U/min wurde die DNA in 100 µl HPLC-H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C eingefroren.

### **2.2.2.2 Isolierung von RNA**

#### **2.2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben**

Die Isolierung von Gesamt-RNA für die RT-PCR und RNase Protection Assays erfolgte nach einer Modifikation der Guanidiniumthiocyanat-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987; Sambrook et al., 1989). Guanidiniumthiocyanat stellt einen sehr potenten Inhibitor eventuell vorhandener RNasen dar. Je 250 mg Gewebe wurde in 6 ml und je  $1 \times 10^7$  Zellen in 2 ml Denaturierungslösung (siehe 2.1.4.2.1) aufgenommen, mit der Ultraturrax homogenisiert und 10 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 1 h bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren, um die Lyse möglichst aller Zellen und das Aufbrechen der Zellkerne zu erzielen. Nach Auftauen der Proben wurden diese mit 0,2 Volumen Chloroform versetzt, 15 sek. gevortext und 15 min. bei RT inkubiert. Die Proben wurden für 15 min. bei 12000 U/min und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, wodurch eine Trennung der Proteine und Zellbestandteile von der RNA durch die sichtbare Phasentrennung erzielt wird. Die obere wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde von der organischen Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 1 Volumen eiskalten Isopropanol, 30 min. Inkubation auf Eis und Zentrifugation für 20 min. bei 12000 U/min und  $4^\circ\text{C}$  gefällt. Das Pellet wurde mit 4 ml 70%igem Ethanol gewaschen und bei 12000 U/min und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min. zentrifugiert und anschließend getrocknet. Die RNA wurde dann in 100  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltem Wasser gelöst und sofort auf Eis gestellt.

#### **2.2.2.2.2 Isolierung von poly(A<sup>+</sup>)-mRNA aus Zellen**

In der Regel beträgt der Anteil der poly(A<sup>+</sup>)-mRNA an der Gesamt-RNA ca. 1-5%. Die mRNA-Isolation zur Gewinnung von poly(A<sup>+</sup>)-RNA als Ausgangsmaterial für die RT-PCR (siehe 2.2.4) wurde unter Verwendung des *mRNA Isolation Kit* der Firma Roche Diagnostics und gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Methode basiert auf der Hybridisierung zwischen der 3'-poly(A<sup>+</sup>)-Region der m-RNA und Biotin markierten Oligo(dT)-Primern (Oligonukleotide bestehend aus 20 Desoxythymidinbausteinen), die über Affinitätsreinigung durch Bindung von Biotin an Streptavidin-markierte Magnetpartikel unter Verwendung eines Magnetpartikelseparators separiert werden können. Es wurden je  $1 \times 10^7$  Zellen, die zuvor mit eiskalten PBS gewaschen wurden, mit 1,5 ml Lysispuffer versetzt und homogenisiert. Nach Zugabe von 1,5  $\mu\text{l}$  Biotin-markierten Oligo(dT)-Primern wurden die Proben mit 150  $\mu\text{l}$  Streptavidin markierten Magnetpartikeln versetzt und für 5 min. bei  $37^\circ\text{C}$

im Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden in einen magnetischen Separator überführt, wodurch die mRNA aufgrund der hohen Bindungskonstante des Biotin/Streptavidin-Komplexes separiert werden konnte. Nach einfachen Waschschrritten wurde die mRNA, frei von Begleitsubstanzen wie z.B. Salzen, Proteinen und anderen zellulären Verunreinigungen, in 25 µl redist. Wasser eluiert und unverzüglich auf Eis gestellt.

#### **2.2.2.2.3 DNase I Verdau**

Im Anschluß an jede RNA-Extraktion folgte eine DNase I Verdauungsreaktion unter Verwendung der *RQ1 RNase-Free DNase* von Promega, um Reste von kontaminierender genomischer DNA abzubauen. Die RNA-Proben wurden jeweils mit 1/10 des mitgelieferten Reaktionspuffers und *RQ1 RNase-Free DNase* (1u/1µg RNA) für 30 min. bei 37°C im Wasserbad verdaut. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1/10 *RQ1 Stop-Solution* und Inkubation für 10 min. bei 65°C abgestoppt. Die Proben wurden unverzüglich auf Eis gestellt.

#### **2.2.2.2.4 Phenolextraktion**

Die RNA wurde für die folgenden Versuche mittels Phenolextraktion aufgereinigt, wodurch eine weitere Trennung der Proteine (in diesem Fall der DNase) von den RNA-Molekülen erzielt wurde. Die Proben wurden mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, 15 sek. gevortext und zur Phasentrennung für 3 min. bei 13000 U/min zentrifugiert. Aufgrund der apolaren Eigenschaft des Phenols bleiben die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase zurück, während die Proteine sich z.T. in der Interphase sammeln, z.T. sich zusammen mit anderen Verunreinigungen in der unteren organischen Phase lösen. Die obere, wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert und der Vorgang mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt, um eventuell noch vorhandenes Phenol zu entfernen. Die obere Phase wurde wiederum vorsichtig abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit Carrier-tRNA (Endkonzentration 0,05 µg), 0,3 Vol. 7,5M (NH<sub>4</sub>)Acetat und 2,5 Vol. 100%igen Ethanol versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei -20°C oder zur Aufbewahrung der RNA für einen längeren Zeitraum bei -70°C. Nach Zentrifugation für 15 min. bei 13000 U/min wurde das RNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und sofort auf Eis gestellt.

### **2.2.3. Konzentrationsbestimmung und Reinheit von Nukleinsäuren**

Die Konzentration der DNA und RNA wurde im Fluorometer bestimmt. Die DNA-Meßlösung enthielt den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst Dye 333258 und die RNA-Meßlösung den Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen. Fluoreszenzfarbstoffe haben die Eigenschaft, in die DNA oder RNA zu interkalieren und Energie einer definierten Wellenlänge zu absorbieren, wodurch sie angeregt und diese Energie als langwelligeres Fluoreszenzlicht emittieren. Fluoreszenzfarbstoffe werden entsprechend durch ihre Extinktions- und Emissions-Wellenlängen charakterisiert und liegen für DNA bei  $\lambda = 360$  nm und  $\lambda = 460$  nm, für RNA bei  $\lambda = 490$  nm und  $\lambda = 520$  nm. Jeweils 2  $\mu$ l Probe wurden in einer Küvette mit 2 ml der TEN-Meßlösung bzw. 200  $\mu$ l TE-Puffer vermischt und vermessen. Das Gerät wurde mit Hilfe eines bekannten Standards (Kälber-Thymus-DNA, 1000 ng/ $\mu$ l; 16S und 23 S rRNA von E.coli, 100 ng/ $\mu$ l) kalibriert.

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde eine spektralphotometrische Messung durchgeführt. Hierzu wurden die Proben 1:200 verdünnt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  diente als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren. Der Quotient sollte bei RNA zwischen 1,6 und 1,8, bei DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Kleinere Werte sprechen für Verunreinigungen durch Proteine.

#### **2.2.3.1 Qualität der RNA**

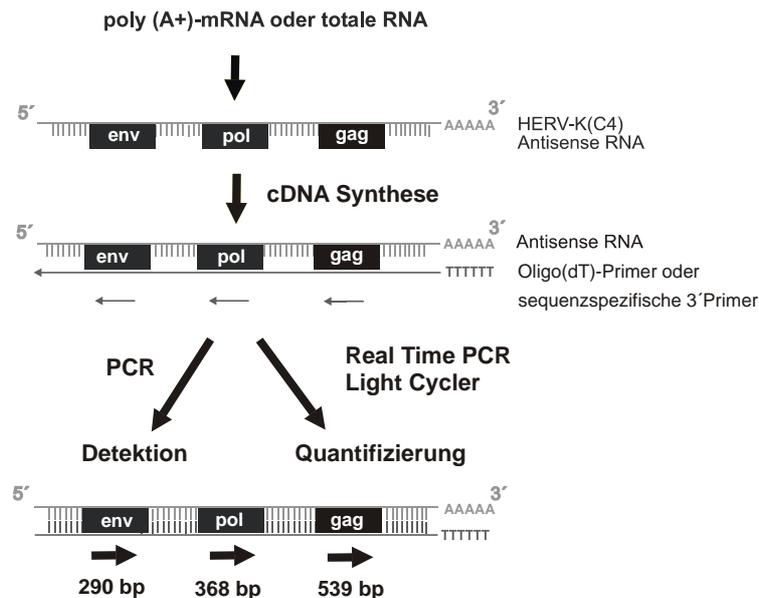
Die elektrophoretische Auftrennung und Sichtbarmachung der isolierten Gesamt-RNA aus Geweben und Zelllinien erfolgte in einem denaturierenden Formaldehyd-haltigen Agarosegel. Hierzu wurde 0,9 g Agarose (0,9% w/v) mit 65,6 ml Aqua bidest und 10  $\mu$ l DEPC (0,1% v/v) für 60 min. bei 37°C inkubiert und anschließend aufgeköcht. Nach Zugabe von 24,4 ml Formaldehyd (9% v/v), 10 ml 10 x MOPS und 6  $\mu$ l 10 mg/ml Ethidiumbromid wurde das Gel unter dem Abzug in einer Gelkammer polymerisiert. 5  $\mu$ g RNA wurden mit 2 Teilen Denaturierungspuffer versetzt, 10 min. bei 65 °C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Proben mit 1/5 Volumen Ladepuffer aufgetragen und bei 50 V in 2-3 Std. aufgetrennt (Laufpuffer: 1 x MOPS). Die Auswertung erfolgte unter dem UV-Licht. Die Qualität der RNA konnte aufgrund der 16s und 23s rRNA bestimmt werden.

Parallel erfolgte eine weitere Kontrolle der Qualität der isolierten RNA durch Amplifikation des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin mittels RT-PCR, da dieses in jeder Zelle konstitutiv exprimiert wird.

## **2.2.4 RT-PCR**

### **2.2.4.1 Reverse Transkription (RT)**

Reverse Transkription (RT) ist durch die Reverse Transkriptase katalysierte Umschreibung von RNA in eine Einzelstrang DNA-Kopie (cDNA) (Kawasaki et al., 1987). Die Reverse Transkriptase ist eine modifizierte, retrovirale RNA-abhängige DNA-Polymerase, die einen Primer am 3' Ende der RNA als Ausgangspunkt für die Synthese des cDNA Stranges in 5'→3'-Richtung benötigt (Kotewicz et al., 1985). In diesem Fall wurde eine aus dem Avian Myoblastosis Virus isolierte Reverse-Transkriptase (AMV) und eine *Transcriptor Reverse Transcriptase*, die zur RT von bis zu 14 kb langen RNA-Transkripten diente, eingesetzt. Die cDNA Synthese wurde unter Verwendung der Reagenzien des *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden jeweils 500 ng mRNA oder 1  $\mu$ g Gesamt-RNA mit Hilfe von Oligo-p(dT)<sub>15</sub>- oder dem jeweiligen sequenzspezifischen 3' Primer umgeschrieben. Die RNA wurde zu einem Reaktionsmix aus 1x Reaktionspuffer, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Deoxynukleotidmix, 1  $\mu$ M Primer, 50 units RNase Inhibitor und 20 units Transkriptase, pipettiert. Es wurden für jeden Ansatz eine Wasserkontrolle, für jede RNA eine negative Kontrolle (ohne AMV-RT), um eine Amplifikation von DNA Kontaminationen in der nachfolgenden PCR auszuschließen, und eine positive Kontrolle (Control Neo pa RNA) pipettiert. Die Proben wurden für 10 min. bei 25°C und dann für 60 min. bei 42°C (AMV) bzw. 55°C (Transcriptor) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inaktivierung der Transkriptase bei 95°C für 5 min. gestoppt und die cDNA wurde unverzöglich auf Eis gekühlt oder bei -20°C eingefroren. Sofern nicht anders angegeben, diente jeweils 10  $\mu$ l synthetisierte cDNA der unter 2.19 aufgeführten Zelllinien und Gewebe als Ausgangsmaterial für PCR-Reaktionen und Real-Time PCR zur Amplifikation definierter HERV-K(C4)-Bereiche unter Verwendung von sequenzspezifischen Primern (Abb. 2.1; Tabelle 2.1 und 2.2).



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der Detektion und Quantifizierung von HERV-K(C4)-spezifischen RNA Transkripten mittels RT-PCR (Erklärung siehe Text).

#### 2.2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine erstmals von Saiki und Kollegen (1985) beschriebene in-vitro-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, amplifizieren kann. Hierzu werden zwei einzelsträngige Oligonukleotide benötigt, die in den flankierenden Bereichen binden und jeweils zu einem der beiden DNA-Stränge komplementär sind. Diese Oligonukleotide dienen als sogenannte Primer und setzen den Startpunkt für die in-vitro-Synthese, die von einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) katalysiert wird. Die PCR erlaubt somit eine exponentielle Vervielfältigung eines spezifischen Abschnittes einer Matrizen-DNA, wobei mehrere Reaktionszyklen aufeinander folgen. Die neu synthetisierten Fragmente eines jeden Zyklus dienen ihrerseits als Matrize für die folgenden Reaktionszyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten, die zu einer Verdopplung der vorhandenen DNA-Fragmente führen: Die DNA-Denaturierung zur Trennung der doppelsträngigen Matrizen-DNA durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken; die Primerbindung (*Annealing*) an die komplementären Abschnitte der Matrizen-DNA. Die optimale Annealingtemperatur, die der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer entspricht, ist abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der Oligonukleotide und kann mit dem Programm Oligo Analyzer 3.0 im Internet ermittelt werden, wobei ein Primerpaar eine ähnliche  $T_m$  haben sollte. Die Primer-Elongation zur Verlängerung der 3'OH-Enden komplementär zur Matrize.

In Tabelle 2.1 sind die Oligonukleotidsequenzen dargestellt, die für den Nachweis von RNA-Transkripten mittels RT-PCR aus Zelllinien und Geweben und der Amplifikation von DNA-Fragmenten aus dem genomischen C4A91-Lambda Klon verwendet wurden.

<b>PCR-Ansatz</b>	<b>Bedingungen</b>			
1x Reaktionspuffer	Denaturierung	94°C →	4 min	} <b>35 Zyklen</b>
1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	Denaturierung	94°C →	1 min	
0,2 mM dNTPs	Annealing	62°C →	1 min	
0,2 μM je Primer	Elongation	72°C →	1 min	
2 units Taq-Polymerase	Terminale Elongation	72°C →	7 min	
10μl cDNA oder ca. 100 ng genomische DNA				

Die PCR-Reaktionen wurden im Thermocycler (Perkin Elmer 2400) durchgeführt. Um sicherzugehen, daß jede Komponente in den PCR-Ansätzen frei von Kontaminationen war, wurde in jedem Experiment ein Kontroll-Ansatz ohne Template-DNA mitgeführt. Die PCR-Produkte wurden im Anschluß auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. In Tabelle 2.2 sind die mittels RT-PCR und PCR generierten Fragmente, deren Länge und verwendete Primer aufgelistet.

**2.2.4.2.1 Quantitative Real-Time PCR**

Die mittels Reverser Transkription und unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern synthetisierte cDNA wurde durch eine Real-Time PCR quantifiziert, um die Anzahl der HERV(C4)-RNA-Transkripte in humanen Zellen zu detektieren. Das Light Cycler System erlaubt eine quantitative und qualitative PCR mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBRGreenI. Dieser fluoresziert nur, wenn er an Doppelstrang DNA (dsDNA) gebunden ist. Der Beginn der exponentiellen Produktzunahme, der linearen Logphase der PCR, wird aufgrund der Fluoreszenzzunahme bestimmt und entspricht dem sog. *crossing point*. Dieser korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz und kann deshalb zur Quantifizierung von RNA Transkripten herangezogen werden. Im Anschluß an die letzte Elongationsphase der PCR wurde jeweils eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produkts durchgeführt. Jedes PCR-Produkt besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur T<sub>m</sub>, die sowohl von der Länge als auch vom GC-Gehalt abhängig ist. Zusätzlich wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (post PCR Schritt). Die optimalen Light Cycler Bedingungen für die

Expressionsanalyse von HERV-K(C4) wurde unter Verwendung des Light Cycler-DNA Master SYBR Green I von Roche erarbeitet. Als eine interne Expressionskontrolle wurde die Transkriptionsrate des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin, das in den Zellen konstant exprimiert wird, und des C4-Gens bestimmt. Es wurde ein Mastermix (4 mM MgCL<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O und je 2  $\mu$ l *Light Cycler-DNA Master SYBRGreenI*) angefertigt, von dem jeweils 16  $\mu$ l in den speziell für den Light Cycler konzipierten Glaskapillaren vorgelegt wurden. Dazu wurden je 2  $\mu$ l sequenzspezifische Primer (0,5  $\mu$ M je Primer) und 2  $\mu$ l cDNA bzw. H<sub>2</sub>O für die Wasserkontrolle pipettiert. In jedem Light Cycler Lauf wurden 3 bis 5 bekannte Ausgangskonzentrationen (1:10 Verdünnungsreihe) des jeweilig zu amplifizierenden cDNA-Fragments zur Erstellung einer externen Standardkurve mitgeführt. Bei diesem als Standard definierten Ausgangsmaterial handelte es sich um den mit NotI linearisierten pCMV- $\beta$ -fus Vektor, der die HERV-K(C4)-Regionen gag, pol und env enthält, und den ebenfalls mit NotI linearisierten pCR-TOPO, der Fragmente der Kontrollgene Aktin- und C4 enthält. Die Kopienzahl pro  $\mu$ l des externen Standards wurde über die Konzentration (g/ $\mu$ l), die Molarität (copies/mol) und Molekulargewicht (g/mol) des jeweiligen Plasmidkonstruktes errechnet (Roche Molecular Biochemicals, Technical Note No. LC11/2000). Das Light Cycler System erlaubt es, eine PCR-Reaktion in vergleichbar kurzer Zeit durchzuführen (45 Zyklen in ca. 30 min.), dabei die Amplifikation simultan auf einem Monitor zu verfolgen (*online* und in *real-time*) und die Ergebnisse später zu quantifizieren. Pro cDNA wurde jeweils eine Zweifachmessung durchgeführt und die RNA aus 10 Extraktionen getestet.

### **Real-Time-PCR Bedingungen**

Programm 1:	Denaturierung	95°C	→ 10 sec.	} 40 Zyklen
Programm 2:	Amplifikation	95°C	→ 10 sec.	
		62°C	→ 5 sec.	
		72°C	→ 10 sec.	
Programm3:	Schmelzkurve	95°C	→ 0 sec.	
		65°C	→ 15 sec.	
		95°C	→ 0 sec.	

Die fluorimetrische Messung erfolgte einmal pro Amplifikationszyklus am Ende der Elongationsphase. SYBRGreenI wird maximal bei 497 nm angeregt und emittiert eine Wellenlänge von 520 nm. Die anhand des mitgeführten Standards ermittelte Kopienzahl der HERV-K(C4)-,  $\beta$ -Aktin- und C4-Fragmente pro 2  $\mu$ l eingesetzter cDNA wurde im Anschluß umgerechnet auf die Kopienzahl RNA-Transkripte pro  $1 \times 10^6$  Zellen.

### 2.2.4.2.2 Mid Range PCR

Für die Amplifikation großer cDNA-Fragmente mit Längen von bis zu 12 Kilobasenpaaren wurde das SAWADY 'Mid Range PCR'-System verwendet. Die aus  $1 \times 10^7$  HepG2-Zellen extrahierte und mittels Oligo(dT)-Primern revers transkribierte mRNA sollte auf die komplette, 6,5 kb lange HERV-K(C4) Insertion unter Verwendung von flankierenden sequenzspezifischen Primern untersucht werden. Das jeweilige 5'- bzw. 3'-Ende der HERV-K(C4)-RNA wurde mittels Primern untersucht, die innerhalb der Insertion und im Bereich des C4 Gens binden. Als positive DNA-Kontrolle wurde in der PCR der genomische C4A Lambda-Klon mitgeführt. Die Mid-Range-PCR wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die amplifizierten Produkte auf einem 0,9% Agarosegel aufgetrennt.

<b>Mid Range PCR-Ansatz</b>	<b>Bedingungen</b>	
1x Reaktionspuffer	Denaturierung	94°C → 5 min
0,35 mM dNTPs	Denaturierung	94°C → 2 min
0,4 µM je Primer	Annealing	62°C → 2 min
2,5 units Mid Range Enzym	Elongation	72°C → 2 min
10 µl cDNA oder ca. 200 ng DNA	Terminale Elongation	72°C → 15 min
		} <b>35 Zyklen</b>

### 2.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die mittels RT-PCR und PCR erzeugten Amplifikate wurden in einem 1,5%igen Agarosegel auf ihre Größe analysiert und die Konzentration ungefähr abgeschätzt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden 12 µl Probe 3 µl eines 5× DNA-Ladepuffers zugesetzt. Nach Anlegen einer Spannung (ca. 56 V, 58 mA), einer Laufzeit von ca. 30 min. und unter Verwendung eines Ethidiumbromid-TBE-Laufpuffers wurden die DNA-Fragmente im Gel durch den in die DNA-Doppelhelix interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht (312 nm) direkt sichtbar gemacht und photographiert.

### 2.2.4.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit von Pufferbestandteilen (Salzen) und überschüssigen, nicht verlängerten Primern für nachfolgende Analysen (z.B. Restriktion oder Sequenzierung) gereinigt. Das Prinzip dieser Methode beruht

Zielregion	Forward Primer	Revers Primer	Länge	Vektor	Nachweismethode
β-Aktin Fragment	β-Aktin-HindIII 5'	β-Aktin-EcoRI 3'	423 bp	pGEM3Z	Protection Assay
	β-Aktin for 5'	β-Aktin rev 3'	405 bp	pCR4-TOPO	RT-PCR,
pol Fragment	pol-EcoRI 5'	pol-HindIII 3'	365 bp	pGEM3Z	Protection Assay
	pol-HindIII 5'	pol-HindIII 3'	368 bp	CMV-βFUSb, pLEGFP	RT-PCR, β-Gal-Assay, retroviraler Gentransfer
gag Fragment	gag-EcoRI 5'	gag-HindIII 3'	536 bp	pGEM3Z	Protection Assay,
	gag-HindIII 5'	gag-HindIII 3'	539 bp	CMV- βFUSb, pLEGFP	RT-PCR, β-Gal-Assay, retroviraler Gentransfer
env Fragment	env-EcoRI 5'	env-HindIII 3'	287 bp	pGEM3Z,	Protection Assay, Northern Blot, RT-PCR
	env-HindIII 5'	env-HindIII 3'	290 bp	CMV- βFUSb, pLEGFP	RT-PCR, β-Gal-Assay, retroviraler Gentransfer
C4 Fragment	C4-EcoRI 5'	C4-HindIII 3'	504 bp	pGEM3Z	Protection Assay
	C4-Exon4 5'	C4-Exon9 3'	486 bp	pCR4-TOPO	RT-PCR
Ex9/LTR2 Fragment	Exon 9 HindIII 5'	LTR2-rev-EcoRI 3'	1111 bp	pGEM3Z	Protection Assay
	Exon 9 do	LTR2 up	461 bp		RT-PCR
LTR1/Ex10 Fragment	LTR1-for-Xho	Ex 10 up	800 bp		RT-PCR
LTR1 Fragment	LTR1-for-Hind	LTR1-rev-Xho	658 bp	pGL3 Enhancer	Luciferase Assay
	LTR1-for-Xho	LTR1-rev-Hind	658 bp	pGL3 Enhancer	Luciferase Assay
LTR2 Fragment	LTR2-for-Hind	LTR2-rev-Xho	867 bp	pGL3 Enhancer	Luciferase Assay
	LTR2-for-Xho	LTR2-rev-Hind	867 bp	pGL3 Enhancer	Luciferase Assay
Ex9/Ex10 Fragment	Exon 9 do	Ex 10 up	481 bp		RT-PCR
Ex7/LTR2 Fragment	3b	LTR2-rev-Xho	1,63 kb		RT-PCR
	3b	LTR2 up	1 kb		RT-PCR
LTR1/Intron 13	LTR1-for-Xho	6A	1,83 kb		RT-PCR

**Tab. 2.2:** Länge und Funktion der mittels RT-PCR und PCR amplifizierten Fragmente unter Verwendung von sequenzspezifischen Primer

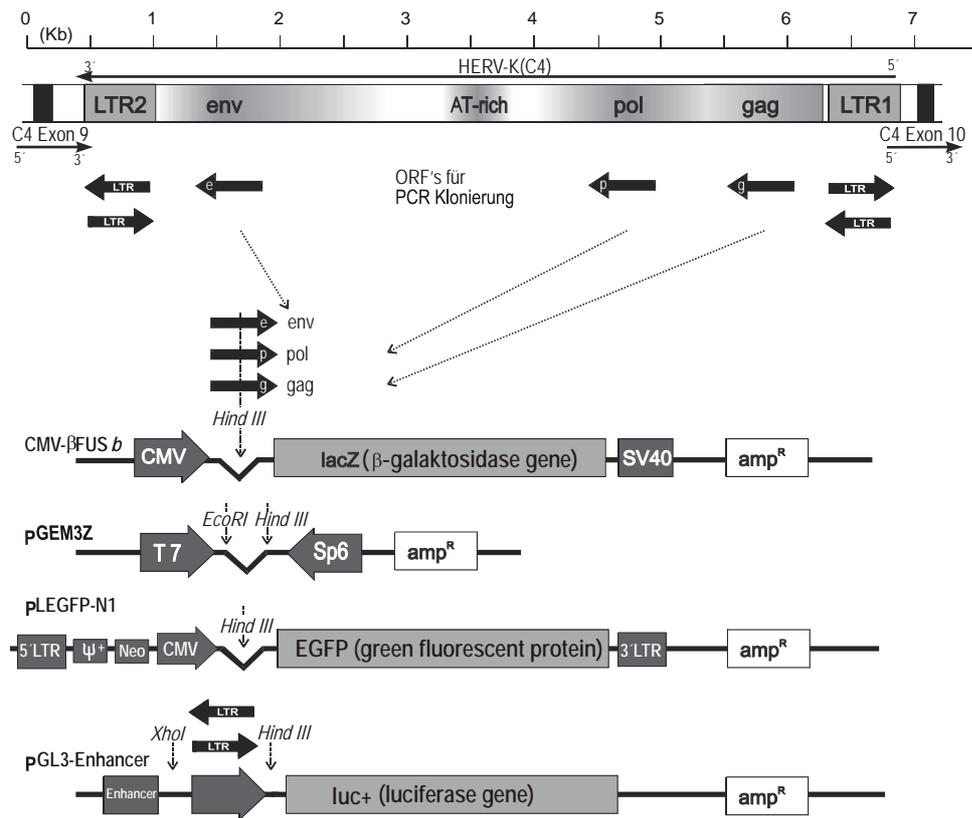
darauf, daß die DNA-Fragmente ab einer Länge von ca. 100 bp an ein festes Trägermaterial adsorbieren. Der QIAquick Kit enthält Säulen, die mit einer Silicagelmatrix bepackt sind, auf die jeweils 80 µl eines PCR-Ansatzes aufgetragen wurden. Die PCR-Produkte wurden gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt und mit 50 µl HPLC-H<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.2.5 Plasmidkonstruktion**

Ein Klonierungsexperiment gliedert sich in vier Schritte: die Generierung von DNA-Fragmenten, ihre Ligation in einen Vektor, deren Amplifikation in Bakterien und die Selektion der gesuchten DNA-Konstrukte.

Die PCR und die RT-PCR ermöglichen es, DNA- bzw. cDNA Fragmente für ein Klonierungsexperiment zu generieren und gleichzeitig durch den Einsatz geeigneter Primer Restriktionsschnittstellen einzuführen. An die 5'-Enden aller für ein Klonierungsexperiment verwendeten Primer wurden zusätzliche Sequenzen von 9 bp Länge angehängt, die entweder eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym XhoI, HindIII oder EcoRI einschlossen. Nach einem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen im Anschluß an die PCR konnten die amplifizierten DNA-Fragmente direkt über ihre kohäsiven Enden in einen dafür geeigneten Vektor kloniert werden (siehe Abb. 2.2).

Als Modell für die exogene retrovirale Expression in humanen Zellen wurden HERV-K(C4)-β-Gal-Fus-Konstrukte verwendet (Schneider et al., 2001a). Der pCMV-βFus-Vektor gehört einer Familie von Plasmiden an, die ein β-Galaktosidase-Fusionsprotein in eukaryotischen Zellen exprimieren (freundlicherweise von Zoltán Ivics und Zsuzsanna Izsvák zur Verfügung gestellt, University of Minnesota). Fragmente aus den drei offenen Leserahmen (ORFs) der endogenen retroviralen Insertion HERV-K(C4) gag, pol und env wurden jeweils in Sense-Orientierung (bezogen auf die Transkriptionsrichtung des HERV-K(C4)) 5' vom lac-Z Gen in die MCS kloniert. Die inklonierten Fragmente enthielten das Translationsinitiationssignal, das dem ATG-losen lacZ Gen fehlt und ermöglichten somit die Expression eines HERV-K(C4)-β-Gal-Fusionsproteins. Die Konstrukte wurden wie folgt benannt: gag-, pol-, und env-β-Gal-fus. Die HERV-K(C4)-β-Gal-Fus-Konstrukte dienten weiterhin in der quantitativen Real-Time PCR als externe Standards, sowie die RT-PCR Produkte der Kontrollgene C4 und Aktin, die hierfür in Sense-Orientierung in den pCR4-TOPO kloniert wurden (siehe 2.2.5.2.1).



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie. Die drei Fragmente der retroviralen Gene env, pol und gag der HERV-K(C4)-Insertion im Intron 9 wurden jeweils in Sense-Orientierung, 5' vom jeweiligen Reporter gen des pCMV-βFus-, pLEGFP-N1- und durch die RNA-Polymerasen T7 und Sp6 flankierte MCS des pGEM3Z-Vektors, einkloniert. Die beiden LTRs (LTR1 und LTR2) wurden in je beiden Orientierungen (Sense und Antisense) in den pGL3-Enhancer gerichtet kloniert.

Der pGEM3Z Vektor wurde zur Generierung von radioaktiven RNA Transkripten eingesetzt. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) wird durch zwei Promotorbindestellen für die T7 RNA Polymerase am 5'-Ende und SP6 RNA Polymerase am 3'-Ende flankiert. Die HERV-K(C4) ORFs gag, pol und env sowie das C4-Exon9/LTR2 Intermediat wurden aus dem genomischen Lambdaklon A12 (C4A91, inklusive HERV-K(C4)), amplifiziert und nach Restriktion mit den Enzymen HindIII und EcoRI in der retroviralen Sense-Orientierung relativ zu der codierenden Sequenz des pGEM3Z Vektors gerichtet kloniert (siehe Tabelle 2.2). Die mittels RT-PCR generierten cDNA-Fragmente des Haushaltgens β-Aktin und C4-Gens wurden in Antisense- (β-Aktin) bzw. in Sense-Orientierung (C4) auf gleiche Weise kloniert und dienten als Expressionskontrollen in den Protection Assays.

Die beiden LTRs (LTR1 und LTR2), welche die retrovirale Insertion HERV-K(C4) im langen Intron 9 flankieren, haben eine Länge von 548 bp bzw. 550 bp (Dangel et al., 1994), und wurden vollständig aus dem genomischen C4A91-Klon amplifiziert. Zur Untersuchung der

LTR-Promotoraktivität wurden jeweils zwei Fragmente von LTR1 und LTR2, mit reversen XhoI/HindIII-Schnittstellen, in je beiden Orientierungen, in den promotorlosen pGL3-Enhancer-Vektor 5' vom Luciferase-Reportergen einkloniert.

Zur Etablierung eines retroviralen in-vitro Infektionsmodells an murinen Zelllinien wurden die HERV-K(C4)-homologen Sequenzen gag, pol und env als offene Leseraster aus dem C4A91-Lambdaklon amplifiziert. Die Fragmente wurden nach Restriktion mit HindIII in codierender proviraler Orientierung in die MCS des retroviralen Vektors pLEGFP-N1 kloniert, der die Expression eines HERV-K-EGFP-Fusionsproteins erlaubt. Der retrovirale Vektor enthält den 5'LTR aus MoMuLV als viralen Promotor, das Verpackungssignal  $\psi$  zur Produktion der Virionen sowie das Neomycin Resistenzgen (Neo) als Selektionsmarker in eukaryotischen Zellen. Ein aktiver CMV Promotor 5' von der MCS initiiert die Expression des Reportergens EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) oder ein Fusionsprodukt aus Reportergen und dem in die MCS klonierten Fragment.

#### **2.2.5.1 Restriktionsverdau**

Der Verdau von DNA-Fragmenten und Plasmiden erfolgte in einem einfach konzentrierten Reaktionsansatz mit 2 U Enzym je  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA für 16 h bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung der Enzyme für 20 min. bei 65°C im Wasserbad gestoppt, und im Anschluß wurden die Restriktionsprodukte mittels Säulen (siehe 2.2.4.4) gereinigt. Die PCR-Produkte, die in die entsprechenden Vektoren (siehe Abb. 2.2) ligiert werden sollten, wurden durch Doppelrestriktion mit den entsprechenden sequenzspezifischen Endonucleasen EcoRI, HindIII und XhoI verdaut. Die Plasmidkonstrukte, die als Standards in der quantitativen Real Time PCR dienten, wurden durch Restriktion mit nur einem Enzym NotI (CMV- $\beta$ -Fusb), HindIII oder EcoRI (pGEM3Z) linearisiert.

#### **2.2.5.2 Ligationsreaktion**

Die mittels PCR amplifizierten und durch Restriktionsenzyme geschnittenen DNA-Fragmente wurden gerichtet in die MCS des Vektors ligiert. Die gereinigten Restriktionsprodukte binden über ihre "klebrigen" Enden direkt an die des Vektors. Die Ligationen der Vektoren mit den verschiedenen Inserts wurden nach einem Protokoll von Promega (*Protocols and Applications Guide, Promega 1996*) durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA betrug 1:3 bzw. 1:1. Für die Ligationsreaktionen wurden 200 ng Vektor-DNA eingesetzt. Unter Verwendung von T4-DNA-Ligase, die die Bildung von Phosphodiesterbindungen

zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA katalysiert, werden die kohäsiven Enden der Fragmente mit denen des Vektors verknüpft. Die Ligationen erfolgten in geeignetem Puffer mit je 1 U T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 16 h bei 4°C. Ein Aliquot dieser Ansätze wurde direkt in kompetente Bakterienzellen JM109 transformiert.

#### **2.2.5.2.1 Klonierung von RT-PCR-Produkten in einen *TA-Cloning vector***

Der Original TA-Cloning Kit der Firma Invitrogen ermöglicht die einfache Klonierung von Amplifikationsprodukten in ein bakterielles pCR4-TOPO-Plasmid. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß im Anschluß an die Extensionsreaktion in der PCR an die 3'-Enden des RT-PCR-Produkts einzelne Adenosin-Nukleotide von der Taq-Polymerase, unabhängig von der DNA-Matrize, angehängt werden. Das im Kit enthaltene pCR4-TOPO-Plasmid ist dephosphoryliert und linearisiert, und die beiden 5'-Enden des Vektors verfügen über einen einzelnen Thymidin-Nukleotidüberhang. Die Ligation in den Vektor erfolgte über deren Komplementarität zu den 3'-A-Überhängen der RT-PCR-Produkte C4 und  $\beta$ -Aktin. Die Durchführung erfolgte unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien gemäß den Angaben des Herstellers.

#### **2.2.5.3 Herstellung von kompetenten Bakterien durch die Rubidiumchlorid-Methode**

Bakterien lassen sich zur spontanen Aufnahme von Plasmid-DNA (Frederick Griffith, 1928) durch eine Behandlung mit eiskaltem Calcium und Rubidiumchlorid befähigen. 10 ml LB-Medium wurden mit 20 µl E.coli JM109 angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. 1 ml dieser Vorkultur wurde zu 100 ml Psi-broth Nährmedium pipettiert und – bis zu einer Dichte von  $A_{550} = 0,48$  bei photometrischer Messung – für 4-5 h bei 37°C kultiviert. Die Bakterienkultur wurde 15 min. auf Eis inkubiert, durch Zentrifugation bei 5000 U/min für 5 min. pelletiert, in 40 ml eiskaltem TfbI-Puffer vorsichtig resuspendiert und wieder 15 min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 4 ml Tfb II aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### **2.2.5.4 Transformation kompetenter Bakterien und Selektion**

Für jeden Transformationsansatz wurden 200 µl kompetenter JM109-Bakteriensuspension vorsichtig mit 1 µl Ligationsansatz vermischt und 30 min. auf Eis inkubiert. Nach Aufnahme der Plasmid-DNA wurden die Poren in der Bakterienzellwand durch Hitzeschock bei 42°C für 45 sek. im H<sub>2</sub>O-Bad geschlossen und die Bakterien nochmals für 2 min. auf Eis inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden mit 1 ml LB-Medium (ohne Ampicillin) gemischt für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterienzellen in unterschiedlicher Menge (20-200 µl) auf selektiven, ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Erkennung von Transformanten, d.h. von Klonen, deren Zellen den rekombinanten Vektor enthalten, ist aufgrund der durch das plasmidkodierte Enzym β-Lactamase vermittelten Ampicillinresistenz möglich (siehe Abb. 2.2) Von den makroskopisch sichtbaren Kolonien wurden Einzelklonausstriche angefertigt, um möglichst reine, genetisch identische Klone in ausreichender Zellzahl zu erhalten.

#### **2.2.5.5 Kryokonservierung von Bakterien**

Um einen Vorrat an kompetenten oder transformierten Bakterien anzulegen (siehe 2.2.5.3 und 2.2.5.4), wurden zu 4 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur 1 ml Glycerin (87%ig) gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Bakterienkultur zu je 1ml in Kryoröhrchen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### **2.2.5.6 Identifikation transformierter Klone**

##### **2.2.5.6.1 TELT-Minipräparation von Plasmid-DNA (analytisch)**

Aus den transformierten Bakterien wurden anhand der TELT-Methode kleinere Mengen von rekombinanter Plasmid-DNA isoliert, die dann zur Analyse in die Sequenzierung eingesetzt werden können. Die Methode dient der schnellen Gewinnung von Plasmid-DNA zur Kontrolle der Vektoren auf das korrekte Insert. 10 ml LB-Medium wurden mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt, anschließend mit einer ampicillinresistenten Bakterienkolonie angeimpft und diese über Nacht bei 37°C kultiviert. 3 ml dieser Bakterienkultur wurde 1 min. bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl des hypotonischen TELT-Puffers resuspendiert und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bakterienzellwand aufzubrechen. Proteine, Zellwand und genomische DNA wurden durch Zugabe von 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert (siehe 2.2.2.2.4) und die Plasmid-

DNA anschließend mit 60 µl Isopropanol präzipitiert. Nach dem Waschen mit 70%igem Ethanol wurde die Plasmid-DNA in 40 µl HPLC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Anschließend wurden je 5 µl der Proben mit 3 µl Ladepuffer gemischt und in einem 1%igen Agarosegel analysiert. Die restliche Bakterienkultur wurde für den weiteren Gebrauch (siehe 2.2.5.7) bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

### **2.2.5.6.2 Cycle Sequencing mit fluoreszenzmarkierten Terminatoren und Kapillarelektrophorese**

Die Basenabfolge von DNA-Abschnitten kann mit der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger, 1977) bestimmt werden. Diese Methode basiert auf einer enzymkatalysierten, matrizenabhängigen Extensionsreaktion, die von nur einem Primer ausgeht und basenspezifisch gestoppt wird. Jeder Zyklus beim *Cycle Sequencing* besteht aus den typischen PCR-Schritten Primer-Anlagerung, Verlängerung, thermischer Denaturierung. Durch die dadurch lineare Amplifikation der Produkte ist die Sequenzierung einer geringen Menge an Matrizen-DNA möglich. Die Termination erfolgt durch den Einbau von in geringer Konzentration beigefügten Didesoxynucleosidtriphosphate (ddNTP). Das sind modifizierte dNTPs, denen an der 3'-Position ihrer Desoxyribose die Hydroxylgruppe fehlt, an der ein weiteres Nukleotid angehängt werden könnte. Die entstehenden Fragmente besitzen also ein gleiches 5'-Ende, jedoch unterschiedliche, basenspezifische 3'-Enden. Die verwendeten DyeDeoxy-Terminatoren sind jeweils mit einem von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen verknüpft, deren Fluoreszenzen bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden. Somit entsteht eine Mischung von unterschiedlich langen DNA-Ketten, die zunächst nach ihrer Länge entsprechend in einer Gelmatrix aufgetrennt werden und dann anhand der Fluoreszenz ihrer letzten Base im Strang identifiziert werden. Die Cycle Sequencing Reaktion wurde unter Verwendung des ABI PRISM Dye Terminator bzw. Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits angesetzt und im Thermocycler durchgeführt.

#### **Sequenzieransatz**

8 µl	Dye Terminator Cycl. Seq. Mix
1 µl	Primer (10 µM)
5 µl	Plasmid-DNA
6 µl	Aqua bidest

#### **Sequenzierbedingungen:**

96°C→	5 min.	} 25 Zyklen
96°C→	10 sek.	
55°C→	5 sek.	
60°C→	4 min.	

Die Plasmide wurden auf die Sequenz der Insert-DNA und deren jeweilige Orientierung im Vektor unter Verwendung der folgenden Primer überprüft:

- Primer, die flankierend an die Inserts binden
- Primer, die innerhalb des Vektors binden und somit eine Sequenzierung über die Grenzen der MCS hinweg erlauben (siehe Tabelle 2.1).

Jedes Insert wurde in beiden Richtungen (d.h. jeder Einzelstrang) in zwei Ansätzen mit jeweils einem der beiden Gegenstrangprimer sequenziert. Im Anschluß an eine Sequenzierreaktion wurde die DNA durch Ethanol-fällung von Salzen und überschüssigen Terminatoren befreit. Die Amplifikate wurden in 80 µl HPLC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 250 µl 100%igem Ethanol, 10 µl 3 M Natriumacetat gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei 45°C im Brutschrank in 30-40 min. vollständig getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 25 µl TSR (*Template Suppression Reagent*) aufgenommen.

#### **2.2.5.6.3 Kapillarelektrophorese**

Die Auftrennung der unterschiedlich markierten Fragmente erfolgte entsprechend ihrer Größe nach einer Hitzedenaturierung durch Kapillarelektrophorese. Das ABI PRISM™ System ist ein Mikroprozessor gesteuertes Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektions-System. Die verwendete Kapillare (Länge: 47 cm, Durchmesser: 50 µm) wurde mit einem *Performance Optimized Polymer 6*, POP 6, beschickt. Ein Aliquot jeder Probe wurde nach Anlegen einer Spannung (53 V/cm) elektrokinetisch in die Kapillare injiziert. Die Fragmente wurden im Polymer der Länge nach (30 sek., 2,4 kV) aufgetrennt, wobei die Trennstrecke zum Detektor 36 cm betrug. Der Laufpuffer war ein 1 × Genetic Analyzer Buffer mit EDTA. Erreicht ein markiertes DNA-Fragment den Detektor, so wird das an die DNA gekoppelte Farbmolekül durch einen Argonlaser bei Wellenlängen von 488 nm und 514,5 nm angeregt. Je nach Absorptionsspektrum der Terminatoren wird Fluoreszenzstrahlung einer spezifischen Wellenlänge emittiert, wodurch diese im Detektor unterschieden werden können. Die unterschiedlich emittierten Strahlen wurden durch vier sich überlappende Kurven dargestellt, die die gemessenen Farbintensitäten in bestimmten Zeitintervallen wiedergeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 7,5 kV und 6-7 µA, bei 50°C für 36 min. Aufgrund der sensitiven Laserdetektion reichen sehr geringe DNA-Mengen als Matrize für eine erfolgreiche Sequenzierung aus.

### **2.2.5.7 Präparation großer Mengen an Plasmid-DNA**

Für anschließende Versuche, wie z.B. der Transfektion und Sondenherstellung, wurden die rekombinanten Plasmidkonstrukte in größerer Menge aus den transformierten und selektierten Bakterien isoliert. 500 ml LB-Medium, supplementiert mit 1 ml Ampicillin, wurde mit je 1 ml der bei 4°C gelagerten Bakterienkultur aus der Mini-Telt-Präparation (siehe 2.2.5.6.1) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Präparationen wurden unter Verwendung des Qiagen Plasmid Maxi Kits (25) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Aufschluß der Zellen basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit Hilfe einer equilibrierten Säule gebunden, die mit einem Anionenaustauscherharz beschickt ist. Nach dem Auswaschen von Verunreinigungen (z.B. RNA, Proteine, Metabolite) wurde die Plasmid-DNA von der Säule eluiert, mit 11 ml Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert und für 30 min. bei 4°C und 11000 U/min zentrifugiert. Die DNA wurde mit 5 ml 70%igen Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde getrocknet und in ca. 500 bis 800 µl HPLC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.2.6 Ribonuklease Protection Assay (RPA)**

Der RNase Protection Assay ist eine geeignete Methode mit hoher Sensitivität und Spezifität zur Identifikation und Quantifizierung von mRNA in einem Gemisch aus zellulärer Gesamt-RNA (Ma et al., 1996). Er ist im Vergleich zum Northern Blot wesentlich empfindlicher und erlaubt den Nachweis geringer RNA-Mengen. Für den RPA wird eine markierte RNA-Sonde synthetisiert, welche komplementär zu der zu analysierenden RNA ist. Hierzu wurden die HERV-K(C4) Gene gag, pol und env sowie die zellulären Gene  $\beta$ -Aktin und C4 in den pGEM3Z-Vektor, in dem die klonierten Fragmente unter der Kontrolle der Bakteriophagen Promotoren T7 und Sp6 stehen, gerichtet kloniert. Durch Verwendung der entsprechenden T7- oder Sp6-Polymerase und  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-markierten rCTP wird so eine für die Ziel-RNA spezifische RNA-Sonde in-vitro transkribiert. Die markierte RNA-Sonde wird zusammen mit Gesamt-RNA inkubiert und nach Hybridisierung mit Ribonuklease behandelt. Während die mit der markierten Sonde hybridisierten RNAs vor der Degradation geschützt bleiben, wird einzelsträngige, nicht hybridisierte RNA verdaut (Gilman, 1993; Melton et al., 1984).

### 2.2.6.1 Sondenherstellung

#### 2.2.6.1.1 DNA-Template Präparation

Die zur Sondenherstellung verwendeten Plasmidkonstrukte gag-, pol-, env-, C4-Exon9/LTR2,  $\beta$ -Aktin und C4-pGEM3Z wurden in unabhängigen Ansätzen mit dem Restriktionsenzym EcoRI oder HindIII linearisiert (siehe 2.2.5.1). Die linearisierten Konstrukte wurden anschließend über Säulen gereinigt (siehe 2.2.4.4), in 40  $\mu$ l DEPC-behandeltem Wasser eluiert und die Konzentration im Fluorometer bestimmt. Die linearisierten Plasmidkonstrukte dienten in der anschließenden in-vitro Transkription als DNA-Template zur Synthese von run-off Transkripten, die nur aus Insert-Sequenz bestehen (siehe Abb. 2.3).

#### 2.2.6.1.2 Radioaktive Markierung spezifischer RNA-Sonden

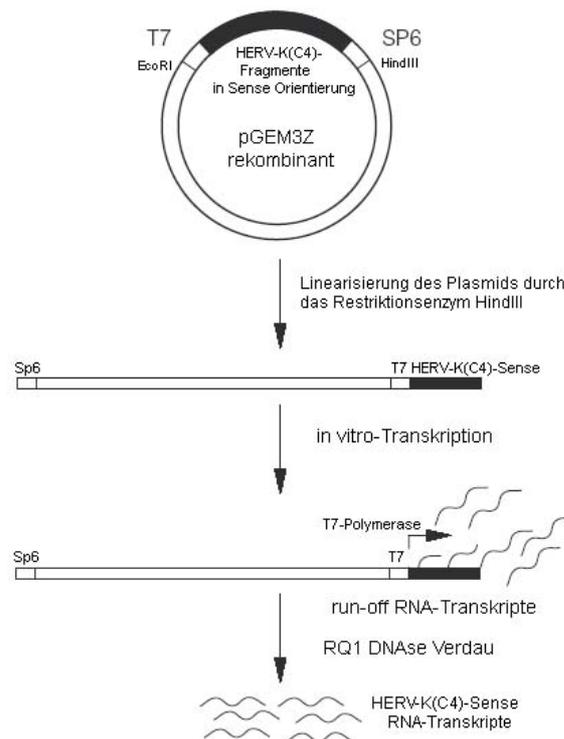
Die Synthese und gleichzeitige Markierung von RNA-Transkripten mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-markierten rCTP wurde unter Verwendung des *Riboprobe*<sup>®</sup> *in-vitro-Transcription Systems* durchgeführt und nach Protokoll des Herstellers verfahren. Die benötigten Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht (ausgenommen die RNA-Polymerasen) und in genannter Reihenfolge in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben.

<b>in- vitro Transkriptions-Ansatz</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>
5x Transkriptionspuffer	4 $\mu$ l
DTT, 100 mM	2 $\mu$ l
RNasin Ribonuclease Inhibitor	20-40 u
rATP, rGTP, rUTP (2,5 mM je Nukleosid)	4 $\mu$ l
100 $\mu$ M rCTP*	2,4 $\mu$ l
linearisierte Template-DNA (1 mg/ml)	1 $\mu$ l
[ $\alpha$ - $^{32}$ P]rCTP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)*	5 $\mu$ l
Sp6 oder T7 RNA-Polymerase	15-20 u

\* nicht hinzugefügt bei der Synthese von unmarkierten RNA-Transkripten

Die Proben wurden 1 h bei 37°C inkubiert. Die Markierung der Sonden erfolgte über den Einbau radioaktiv markierter  $\alpha$ [ $^{32}$ P]-rCTP im Verlauf der in-vitro RNA-Transkription. Zur Synthese von unmarkierten RNA-Transkripten, die zur Kontrolle der Sondenlängen dienten, wurden zu jedem Ansatz 2,5 mM des limitierenden rCTPs hinzugefügt. Die Orientierung der synthetisierten run-off-RNA-Transkripte war abhängig von der verwendeten RNA-Polymerase. Die T7 RNA-Polymerase wurde zur Synthese von HERV-K(C4)-Sense, C4-Sense

und  $\beta$ -Aktin Antisense Transkripten und die Sp6 RNA Polymerase zur Synthese von HERV-K(C4)-Antisense, C4-Antisense und  $\beta$ -Aktin-Sense Transkripten eingesetzt. Die Labeling Reaktion bzw. RNA-Synthese wurde durch Entfernen des DNA-Templates nach Zugabe von 2  $\mu$ l RNase-freie DNase und Inkubation für 30 min. bei 37°C gestoppt.



**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung der Herstellung von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -markierten HERV-K(C4)-Sense RNA-Transkripten mittels in-vitro-Transkription.

Es folgte eine Abtrennung von nicht-inkorporiertem  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{rCTP}$  über eine Sephadex G50 Säule. Zunächst wurde der Puffer aus der Säule gelassen und verworfen. Die Säule wurde mit 400  $\mu$ l sterilem TE-Puffer equilibriert, die markierten RNA-Sonden auf das Gelbett aufgebracht und mit 400  $\mu$ l TE-Puffer einlaufen gelassen. Die Elution der Sonden erfolgte durch erneute Zugabe von 400  $\mu$ l TE-Puffer. Die nicht-inkorporierten  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{rCTPs}$  verblieben in der Säule zurück.

Die Proben wurden mit 0,3 Volumen 7,5M  $(\text{NH}_4)\text{Acetat}$ , Carrier-tRNA (Endkonzentration 0,05  $\mu$ g) und 2,5 Vol. 100%igen Ethanol für 30 min. bei  $-20^\circ\text{C}$  gefällt und anschließend für 20 min. bei 13000 U/min. zentrifugiert. Die  $^{32}\text{P}$ -markierten RNA-Sonden wurden in 50  $\mu$ l Formamid-Hybridisierungspuffer und die unmarkierten in 50  $\mu$ l DEPC-behandeltem Wasser

aufgenommen, resuspendiert und auf Eis gestellt oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für kurzen Zeitraum gelagert. 1  $\mu\text{l}$  der gelabelten Sonde wurde in Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und in einem  $\beta$ -Counter im Cerenkov-Modus gemessen, um die Effektivität des radioaktiven Einbaus zu ermitteln. Die spezifische Aktivität der Sonden lag zwischen  $2-2,5 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$ .

#### **2.2.6.2 Radioaktive Hybridisierung**

Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus verschiedenen humanen Zelllinien und deren Konzentrationsbestimmung wurde die RNA zu je 10  $\mu\text{g}$  aliquotiert, in Formamid-Hybridisierungspuffer aufgenommen und resuspendiert. Für die Hybridisierungsreaktion wurden 10  $\mu\text{l}$  der  $^{32}\text{P}$ -markierten RNA-Sonden und 20  $\mu\text{l}$  Gesamt-RNA (in Formamid-Hybridisierungspuffer vorliegend) in einem sterilen Eppendorfgefäß vereint. Die Proben wurden für 5 min. bei  $85^{\circ}\text{C}$  denaturiert und nach einem raschen Transfer ins Hybridisierungswasserbad über Nacht bei  $42^{\circ}\text{C}$  hybridisiert.

#### **2.2.6.3 RNase Verdau**

Es wurde ein RNase-Cocktail vorbereitet (pro Ansatz 1x Reaktionspuffer, 100 unit RNase I<sub>f</sub> und 10 unit RNase A) und 170  $\mu\text{l}$  des RNase Cocktails zu je 30  $\mu\text{l}$  Hybridisierungsprobe (Endvolumen 200  $\mu\text{l}$ ) gegeben. Nach Degradation der nicht hybridisierten RNA für 45 min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden 4  $\mu\text{l}$  20%iges SDS zugegeben und mit 2  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10 mg/ml) für 15 min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  die enthaltenen Proteine verdaut. Die Ansätze wurden anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert (siehe 2.2.2.2.4). Nach Extraktion wurde das RNA-Pellet getrocknet und in 10  $\mu\text{l}$  Formamidlaufpuffer aufgenommen.

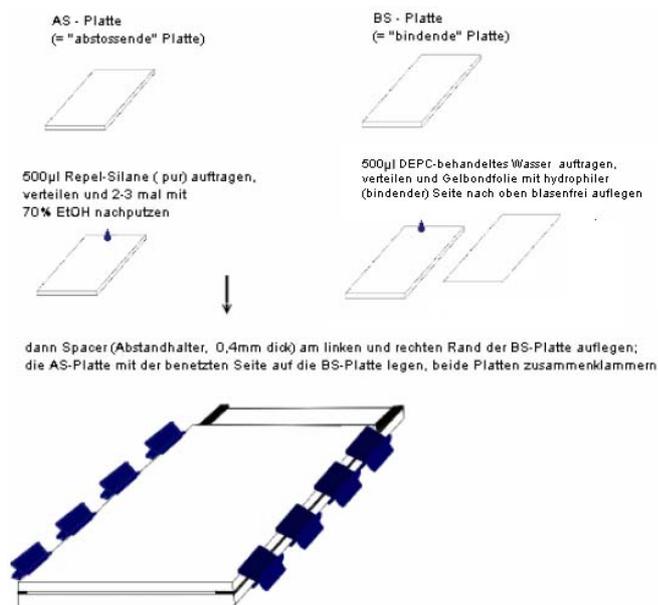
#### **2.2.6.4 Markierung des Längenstandards**

Die Markierung des Längenstandards erfolgte durch eine Polymerase-Austauschreaktion, unter Verwendung einer T4 DNA-Polymerase und radioaktiv markierten  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTPs}$  (nach Herstellerangaben). 2  $\mu\text{g}$  eines 100 bp Längenstandards wurden mit 2 Vol. eisgekühltem 100%igen EtOH gefällt, in 15,35  $\mu\text{l}$  HPLC-  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und resuspendiert. Nach Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer, 2  $\mu\text{l}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (20  $\mu\text{Ci}$ ) und 0,65  $\mu\text{l}$  T4 DNA-Polymerase (5 units) wurde die Probe für 5 min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend die Reaktion mit 1  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA gestoppt. Die T4 DNA-Polymerase besitzt eine  $3' \rightarrow 5'$

Exonuklease Aktivität, die bei Anwesenheit von nur einem Nukleotid (in diesem Falle  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ ) das komplementäre Nukleotid im DNA Doppelstrang ersetzt. Die Abtrennung von nicht-inkorporiertem  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  erfolgte über eine Sephadex G50 Säule (siehe 2.2.6.1.2). Die  $^{32}\text{P}$ -markierte DNA-Leiter wurde mit 2 Vol. eisgekühlten 100%igem EtOH und 1/10 3 M NaAcetat präzipitiert und das Pellet in 20  $\mu\text{l}$  Formamidlaufpuffer resuspendiert.

**2.2.6.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der RNase Protection Assay Produkte erfolgte in denaturierenden 6%igen Harnstoff-Polyacrylamidgelen (8M Harnstoff, 6% Polyacrylamid, 1 x TBE). Es wurde eine vertikale Gelkammer verwendet, deren Aufbau in Abb. 2.4 beschrieben wird.



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung des Aufbaus einer vertikalen Gelkammer (modifiziert nach <http://www.mta-labor.info>)

60 ml Acrylamid-Harnstoff-Lösung wurde mit 48  $\mu\text{l}$  TEMED und 600  $\mu\text{l}$  10%igen APS versetzt und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Die Gelkammer wurde schräg auf Papiertücher gelegt, und die Gellösung wurde zügig und luftblasenfrei zwischen die Platten gegossen. Nach vollständigem Einlaufen der Gellösung wurde die Gelkammer wiederum zügig auf eine Ebene gebracht, der Taschenkamm zwischen die Platten eingelegt und fixiert. Nach Polymerisation des Gels für 45-60 min. (32 cm x 17 cm x 1 cm) wurde die Gelkammer in eine vertikale Laufkammer eingesetzt, 1x TBE Laufpuffer eingefüllt, der Kamm entfernt und die Taschen mit Puffer ausgespült. Das Gel wurde zunächst für 30 min. bei

40 mA und 180 V zur Erwärmung laufen gelassen. Je 10 µl <sup>32</sup>P-markierte RNase Protection Assay Produkte, 10 µl der <sup>32</sup>P-markierten DNA-Sonden und 10 µl des markierten Längenstandards wurden vor dem Auftragen mit 10 µl denaturierenden Formamid-Ladepuffer versetzt und für 5 min. bei 85°C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und das Gel beladen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE Puffer bei 180 V für 3,5 Std.

#### **2.2.6.6 Autoradiografie**

Nach Abschluß der Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Glaskammer genommen, auf Whatman 3MM-Papier getrocknet und anschließend mit Plastikfolie abgedeckt. Die radioaktiv markierten Einzelstränge wurden durch Auflegen eines Röntgenfilms in einer Röntgenkassette und Exposition ü.N. bei -70°C sichtbar gemacht. Die β-Strahlung der Isotope „belichtet“ den Röntgenfilm, der nach Entwicklung an den Stellen geschwärzt ist, an denen sich radioaktiv markierte Nucleinsäuren im Gel befunden haben. Falls die Schwärzungen des Röntgenfilms nach dieser Zeit zu schwach bzw. zu stark waren, wurde erneut ein Film aufgelegt und die Exposition dementsprechend verlängert oder verkürzt. Das Gel wurde in der Röntgenkassette mit Tesafilm fixiert, um nach Auflegen des exponierten Films auf das Gel die positiven Signale zu markieren. Da der Längenstandard nur schwach positive Signale zeigte und bei längerer Exposition durch die stark strahlende <sup>32</sup>P-markierte RNA überschwärzt wurde, erfolgte eine Anfärbung des Gels mittels Silbernitratfärbung.

#### **2.2.6.7 Silbernitratfärbung**

Die nicht-markierten RNA-Transkripte, die auf ihre Länge hin überprüft werden sollten, sowie der <sup>32</sup>P-markierte Längenstandard wurden mittels Silbernitratfärbung sichtbar gemacht (Allen et al., 1989). Das Gel wurde für 2 x 20 min. in einer Ethanol-Essigsäurelösung fixiert und anschließend in deionisiertem Wasser für 5 min. zur Rehydratisierung ausgewaschen. Die Detektion der Nucleinsäuren erfolgte durch Anlagerung von Silbernitrationen an die Nucleinsäuren nach Inkubation für 30 min. in einer Silbernitratlösung, die nach weiterer Inkubation von 5 min. in einer Natriumkarbonat/ Formaldehydlösung differentiell reduziert und als braune Banden sichtbar wurden. Das Gel wurde anschließend für 30-60 min. in einer Essigsäure-Glycerin-Lösung fixiert und zur Aufbewahrung in eine Plastikfolie eingeschweißt.

### 2.2.7 Northern-Blot

Der Northern-Blot dient dem Nachweis von mRNA durch ein radioaktiv markiertes einzelsträngiges RNA-Fragment als Sonde. Die auf einer Nylon Membran fixierte poly(A<sup>+</sup>)-RNA aus 12 humanen Zelllinien und Geweben (Human 12-Lane, BD Biosciences) wurde mit den spezifischen <sup>32</sup>P-markierten pol- und env-Sonden hybridisiert, um die gesuchte HERV-K(C4) mRNA in Form einer Bande auf dem Blot detektieren zu können. Die Hybridisierung und das Waschen des *Multiple Tissue Northern (MTN<sup>TM</sup>) Blot* wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Markierung der Sonden mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]rCTP erfolgte unter Verwendung des *Riboprobe<sup>®</sup> in-vitro-Transcription Systems*, wie unter 2.2.6.1.2 beschrieben. Nach DNase Verdau und Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide über eine Sephadex G50-Säule wurden die in TE-Puffern eluierten Transkripte auf Eis gestellt. Die Hybridisierungslösung des Herstellers wurde bei 68°C gelöst und anschließend auf 42 °C eingestellt. Die Nylon-Membran wurde, mit der markierten Seite nach innen, bündig in ein steriles 50 ml Röhrchen gerollt und mit 8 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung benetzt. Die Prähybridisierung erfolgte bei 42°C rollend für 30 min. in einem Hybridisierungsöfen. 100  $\mu$ l <sup>32</sup>P-markierte Sonde wurde für 2 min. bei 95°C denaturiert und zu 8 ml frischer Hybridisierungslösung pipettiert (ca.  $1 \times 10^7$  cpm/ml). Die Vorhybridisierungslösung wurde abgegossen und 8 ml Hybridisierungslösung, supplementiert mit <sup>32</sup>P-markierter Sonde, zu dem Blot gegeben. Die Hybridisierung des Blots erfolgte bei 42°C rollend über Nacht im Hybridisierungsöfen. Der Blot wurde anschließend in ein Glasgefäß überführt. Unspezifisch gebundene Radioaktivität wurde durch mehrmaliges rotierendes Waschen der Membran in Waschlösung 1 für 30- 40 min. bei RT entfernt. Zwei weitere Waschschritte erfolgten bei RT für je 40 min in Waschlösung 2 im schüttelnden Wasserbad. Der Blot wurde danach mit beiden Seiten kurz auf Whatman 3-MM Papier gelegt, um Reste der Waschlösung zu entfernen, und in Folie eingeschweißt. Die Exposition erfolgte nach Fixierung des Blots in einer Röntgenkassette mit Tesafilm und Auflegen eines x-ray Films bei -70°C über Nacht. Nach Autoradiografie wurde der Blot in einer abgedeckten Glasschale in 90°C heißem Wasser, supplementiert mit 0,5%SDS, für 10 min. im schüttelnden Wasserbad inkubiert, um die radioaktiv markierte Probe zu entfernen. Das Wasser wurde für 10 min. bei RT runtergekühlt und der Blot auf Whatman 3-MM Papier luftgetrocknet. Die Membran wurde danach in Folie eingeschweißt und bei -20°C aufbewahrt.

## **2.2.8 Transiente Transfektionen von adhärennten Zellen**

Die Transfektion ist ein Verfahren, rekombinante DNA in Wirtszellen einzuführen, um Regulation und Funktion von Genen zu studieren. In den unter 3.2 beschriebenen Transfektionsstudien wurden die Fusions-Plasmidkonstrukte HERV-K(C4)-CMV- $\beta$ Fusb in die HepG2-Zelllinie und die Promotorkonstrukte LTR-pGL3-Enhancer in die Zelllinien HepG2 und COS7 transfiziert. Die Transfektion der HERV-K(C4)-pLEGFP-Konstrukte in die Verpackungszelllinien EcoPack293 und GP293 wird unter 2.2.10.1 näher beschrieben.

Um sowohl hohe Transfektionsraten zu erzielen als auch Varianzen bei den Transfektionsexperimenten zu minimieren, ist es wichtig, die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Die Zellen sollen gesund (mycoplasmenfrei) sein, sich gut vermehren und mit gleichbleibender Dichte ausplattiert werden. Aus diesem Grund verwendet man Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die verwendete DNA sollte hoch gereinigt sein (siehe 2.2.5.7), da Verunreinigungen durch bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharide, LPS) und Proteine in der Plasmidpräparation eine Ursache für Toxizität oder niedrige Transfektionsrate sein können (Cotton, 1994; Weber et al., 1995).

### **2.2.8.1 Lipidtransfektion**

Die Transfektion der Zelllinien HepG2, COS7 und HT29 erfolgte durch das Transfektionsreagenz FuGene™6 (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben. FuGene™6 ist eine Mischung von Lipiden und anderen Verbindungen in 80%igem Ethanol. Dieses nicht-liposomale Reagenz transfiziert eine große Vielfalt von Säugerzellen mit hoher Effizienz und minimalen zytotoxischen Effekten. Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß die Lipide spontan mit der DNA interagieren und Lipid-DNA-Komplexe bilden. Diese können die Phospholipiddoppelschicht der Wirtsmembran passieren, gelangen ins Zellinnere und werden exprimiert.

In den unter 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Transfektionsstudien zur HERV-K(C4)-vermittelten Antisense-Inhibierung und Promotoraktivität der LTRs wurden 24 h vor jedem der durchgeführten Transfektionsexperimente  $1 \times 10^5$  Zellen in 30 mm Vertiefungen einer 6-well Platte ausplattiert und in insgesamt 2 ml Kulturmedium kultiviert. Um die Ergebnisse auf ihre Reproduzierbarkeit zu testen, wurden drei parallele Ansätze (entspricht drei 6-well-Platten) von jedem Transfektionsexperiment durchgeführt. Am Tag der Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 50-80% aufweisen. 4  $\mu$ l FuGene 6-Reagenz wurden direkt zu

96 µl Serum-freiem Kulturmedium gegeben, so daß sich ein Endvolumen von 100 µl ergibt, und die Verdünnung wurde für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das verdünnte FuGene6 Transfektions-Reagenz wurde anschließend zu 2 µg DNA gefügt (µl FuGene/µg DNA im Verhältnis 2:1), durch vorsichtiges Antippen des Gefäßes damit gemischt und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung des FuGene-DNA-Komplexes zu ermöglichen. In dieser Zeit wurde das Kulturmedium auf den Zellen erneuert. Die Transfektionslösung wurde tropfenweise über die Zellen verteilt und bei 37°C für 48 h im Brutschrank inkubiert.

Als Kontrolle wurden die Zellen parallel zu jedem Transfektionsexperiment mit 2 µg des jeweiligen insertlosen Expressionvektors transfiziert, um eventuelle Hintergrundsignale detektieren zu können (Negativkontrolle). Als Positivkontrolle dienten 2 µg des konstitutiv exprimierenden β-Galaktosidase-Vektors (pSV-β-Gal) und des Luciferase-Vektors (pGL3-Control), die einen starken SV40-Promotor enthalten. Die Zellen wurden 3 Stunden nach Transfektion mit drei unterschiedlichen Konzentrationen (10 U/ml, 100 U/ml und 200 U/ml) an Interferon-γ stimuliert. Im Anschluß an jede Transfektion wurde nach einer Inkubationszeit von 48 h die für das System spezifische β-Galaktosidase- bzw. Luciferase-Expression durch einen Enzymtest sowie der Gesamtproteingehalt des Zellysates bestimmt.

### **2.2.8.2 Elektroporation**

Eine weitere Transfektionsmethode ist die Elektroporation (Andreason, 1988, Chu et al., 1982; Neumann et al., 1982), die zur Transfektion der LTR-pGL3-Enhancer-Konstrukte in die HT29 Zelllinie angewendet wurde. Im Rahmen der Transfektionsstudien wurden die zwei Systeme getestet: das Gene Pulser II System und das Biolistik Partikel Übertragungssystem.

#### **2.2.8.2.1 Gene Pulser II System**

Hierzu wurden in unabhängigen Versuchsansätzen  $1 \times 10^7$  HT29-Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und mit je 15 µg der LTR-Konstrukte, 15 µg des pGL3-Control- sowie 15 µg des pSV-β-Gal-Vektors gemischt. Die Zell/Plasmid Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette (BIO RAD) überführt und 10 min. auf Eis inkubiert. Die Transfektion der Plasmide in die Zellen erfolgte in einem *Gene Pulser* (BIORAD; freundlichst zur Verfügung gestellt von HD Ross, Universität Mainz) durch einen Strompuls von 260V und 960 µF. Nach dem Stromstoß erfolgte wiederum eine Inkubation für 10 min. auf Eis. Die Zellen wurden in 3 ml Kulturmedium für 48 h inkubiert.

### **2.2.8.2.2 Biolistik-Partikel Übertragungssystem**

Die Biolistik-Partikel Übertragung ist eine effiziente Methode zur Transfektion von DNA-beladenen Mikropartikeln in die Zellen mittels Heliumdruck. 24 h vor Transfektion wurden  $1 \times 10^6$  HT29-Zellen in 60 mm Petrischalen ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden 50  $\mu$ l Gold-Mikrocarrier (3mg) mit 5  $\mu$ l Plasmid-DNA (pGL3-Controll und pSV-Gal), 50  $\mu$ l 2.5 M  $\text{CaCl}_2$  und 20  $\mu$ l 0,1 M Spermidin durch Vortexen für 2-3 min. gemischt, um somit eine gleichmäßige DNA Präzipitation an die Mikrocarrier zu gewährleisten. Nach Inkubation für 5 min. wurden die Proben für 2 min. bei 13000 U/min. zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 140  $\mu$ l 70%igem EtOH gewaschen und in 48  $\mu$ l 100%igem EtOH aufgenommen und resuspendiert. Die DNA-beladenen Mikrocarrier wurden auf eine Makrocarrier-Membran pipettiert und für 15 min. inkubiert, bis die Goldpartikel in die Membran eingezogen waren. Die Makrocarrier-Membran wurde in einen Makrocarrier-Halter eingesetzt und in das *Biolistic PDS-1000/HE instrument* (BIORAD) installiert. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und die Petrischale in die untere Kammer des Gerätes gestellt. Nach Einsetzen eines Heliumdruckplättchens wurde die Kammer geschlossen und ein Vakuum erzeugt. Die HT29-Zelllinie wurde mit einem Heliumdruck von 200psi mit den Goldpartikeln „beschossen“. Nach Platzen des Heliumdruckplättchens wurde die Petrischale entnommen, 2 ml Kulturmedium zugegeben und die Zellen für 48 h inkubiert.

### **2.2.9 Enzymnachweis**

Die unterschiedlichen Transfektionsstudien, die unter 3.3 und 3.4 näher beschrieben werden, wurden mit Plasmiden durchgeführt, die das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen von E.coli oder das Luciferase-Gen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* als Reporter gen enthalten. Deshalb wurde im Anschluß an jede Transfektion die für das System spezifische  $\beta$ -Galaktosidase bzw. Luciferase-Expression durch eine quantitative Messung des Substratumsatzes unter Verwendung des  $\beta$ -Galaktosidase bzw. Luciferase Enzym Assays (Promega) bestimmt.

#### **2.2.9.1 $\beta$ -Galaktosidase-Assay**

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Assay wurde gemäß den Herstellerangaben (Promega) durchgeführt. Durch die quantitative Bestimmung des Substratumsatzes werden keine einzelnen Zellen, sondern die Gesamtaktivität der Enzyme aller Zellen einer Vertiefung bestimmt. Die transfizierten Zellen wurden nach Inkubation zweimal mit PBS gewaschen, durch Zugabe von

300 µl des 1× Reporter Lysis Puffer lysiert und von den Kulturplatten geschabt. Die Zell-Lysate wurden über Nacht bei -72°C eingefroren, um die Lyse zu unterstützen, und am nächsten Tag zusammen mit dem 2× Assay Puffer auf Eis aufgetaut. Die Proben wurden 10-15 sek. gevortext und für 2-3 min. bei 13000 U/min zentrifugiert, um Zellbestandteile aus dem Lysat zu entfernen. Die DNA-haltigen Überstände wurden in neue Eppendorf-Gefäße überführt und nochmals 5 sek. gevortext. 50 µl eines Zell-Lysates wurden in die Vertiefungen einer 96 well-Platte pipettiert, mit 50 µl 2× Assay Puffer gemischt und für mindestens 30 min. bei 37°C inkubiert. Der 2× Assay Puffer enthält das farblose Substrat ONPG (*o*-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid), welches bei Anwesenheit des Enzyms β-Galaktosidase zu gelbgefärbtem *o*-Nitrophenol hydrolysiert wird. Eine Einheit (Unit) β-Galaktosidase hydrolysiert theoretisch bei pH 7,5 und 37°C pro Minute ein µmol ONPG zu *o*-Nitrophenol und Galaktose. Letztlich wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl 1 M Natriumcarbonat gestoppt und der Substratumsatz im ELISA-Reader (*Titertek*<sup>®</sup>*Multiscan Plus*) über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 402 nm gemessen. Die ermittelten Werte in OD wurden anschließend durch eine Regressionsgeradengleichung, die sich aus zuvor erstellten Eichkurven ableiten läßt, in mUnit umgerechnet. Die Eichkurven wurden mit Hilfe der im Kit enthaltenen β-Galaktosidase durchgeführt. Dabei wurde die β-Galaktosidase-Aktivität in einem Bereich zwischen 0 und 6.0 x 10<sup>-3</sup> Units bestimmt. Durch die Regressionsgeradengleichung wird schließlich jedem gemessenen Wert in OD ein Wert in mU zugeordnet:

**Regressionsgeradengleichung für die β-Galaktosidase-Aktivität [mU]:**

$$x_{\beta\text{-gal}} = \frac{y - 0,06}{0,3}$$

y= gemessener Wert in OD  
x= berechnete Aktivität [mU]

### 2.2.9.1.1 Gesamtproteinbestimmung

Um die ermittelte β-Galaktosidase-Expression in den verschiedenen Ansätzen miteinander vergleichen zu können, müssen die β-Gal-Signale in Bezug auf ein konstantes Referenzsignal normalisiert werden. So können Unterschiede in der Zellzahl zwischen den Vertiefungen einer 6-well-Platte, die durch die Nachweisprozedur entstehen (Lösen und Schaben der Zellen von den Platten), rechnerisch ausgeglichen werden. Als konstantes Referenzsignal wurde der Gesamtproteingehalt des Zellysates bestimmt. Der Gesamtproteingehalt des Zell-Lysats wurde unter Verwendung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 (Biorad-Protein-Assay) bestimmt. Es wurden jeweils 10 µl des Zellysats in die Vertiefung einer 96-well-Platte

pipettiert, mit 190 µl Farblösung verdünnt und vor der Messung für 5 bis 50 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der Farbstoff bindet an die im Zellysat gelösten Proteine und bildet Protein-Farbstoff-Komplexe, die über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 560 nm im Titertek® Multiscan Plus-ELISA-Reader gemessen werden können.

Im Vorfeld wurden, ebenso wie für die β-Galaktosidase, Eichkurven mit Hilfe eines Standards erstellt. Dabei wurden unterschiedliche Mengen an BSA (0,1-100 µg) mit dem Farbstoff gemischt und anschließend die OD im ELISA-Reader gemessen. Die gemessenen Werte in OD wurden durch Einsetzen in die Regressionsgeradengleichung in µg umgerechnet.

**Regressionsgeradengleichung für den Gesamtproteingehalt [µg]:**

$$x_{\text{Prot}} = \frac{y - 0,06}{0,68}$$

y= gemessener Wert in OD  
x= berechneter Gesamtproteingehalt [µg]

Die ermittelten Werte wurden anschließend in eine Formel eingesetzt, die sich aus den Regressionsgeradengleichungen für die β-Galaktosidase-Aktivität (mU) und dem Gesamtproteingehalt (µg) ableiten lassen. Der Korrekturfaktor 20 ergibt sich durch den Bezug der ermittelten β-Gal-Aktivitäten in mUnit auf die vermessenen 50 µl, umgerechnet in µUnit. Somit ist das Ergebnis in der Aktivität µU/µg gegeben.

**Aktivität/Protein [µU/µg]**

$$\frac{x_{\beta\text{-gal}} \times 20}{x_{\text{Prot}}}$$

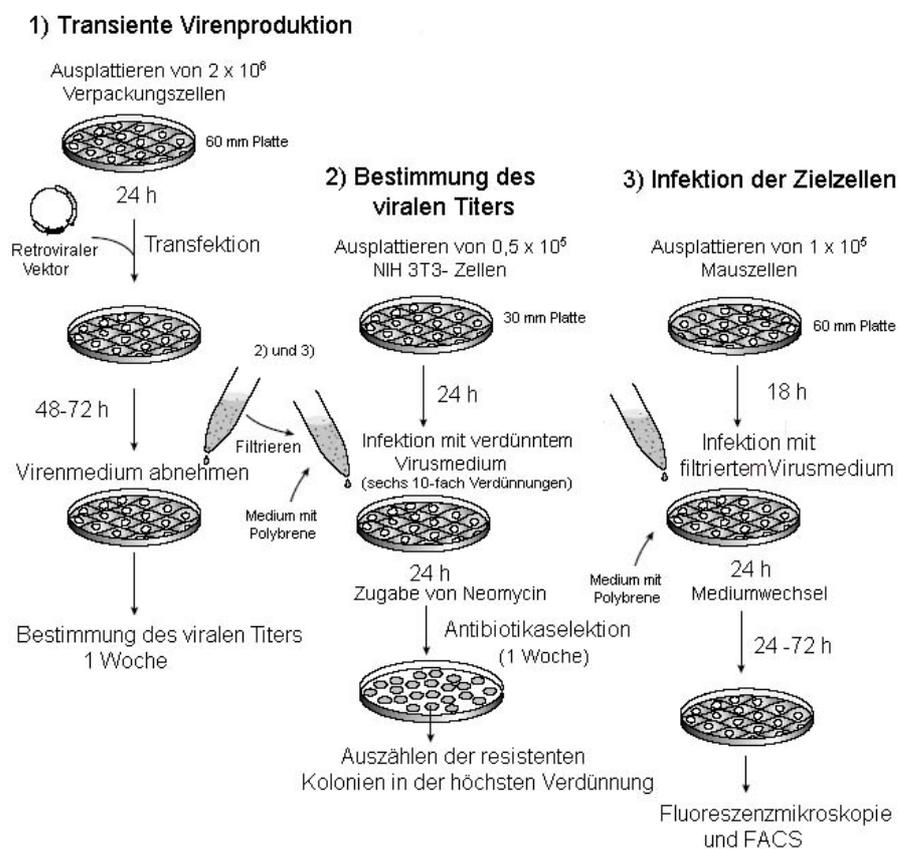
### 2.2.9.2 Luciferase-Assay

Die Aktivität der Luciferase wurde unter Verwendung des Luciferase Assay Systems nach Anweisungen des Herstellers im Luminometer (Berthold, Detection Systems; freundlicherweise von Prof. Neurath zur Verfügung gestellt, Universität Mainz) bestimmt. Die transfizierten Zellen wurden durch Zugabe von 300 µl des *1× Reporter Lysis Puffer lysiert* (siehe 2.2.9.1). Jeweils 10 µl eines Zell-Lysats wurden mit 100 µl des Luciferase Reagenzes versetzt; dabei war es wichtig, daß die Zell-Lysate sowie das Reagenz vor der Messung auf Raumtemperatur equilibriert wurden. Durch eine ATP-abhängige Oxidation des Luciferins entsteht Lumineszenz, die in RLU (*Relative light units*) pro sec. gemessen wird. Die ermittelte Luciferase-Aktivität wurde mit dem Gesamtproteingehalt der Zellen normalisiert, wodurch die Zellaktivität in den einzelnen Ansätzen abgeglichen werden konnte. Der Gesamtproteingehalt der einzelnen Vertiefungen einer Versuchsreihe wurde hierzu auf

den Normalisierungsfaktor 1 bezogen und die erhaltenen Luciferase-Aktivitäten mit diesem multipliziert, so daß das Ergebnis in der Aktivität RLU/sec. gegeben ist. Wie unter 2.2.9.1 beschrieben, wurde eine Eichkurve mit Hilfe eines Standards (Luciferin) erstellt, um den linearen Meßbereich bestimmen zu können.

**2.2.10 Retroviraler Gentransfer**

Da das bisher verwendete transiente Transfektions-Modell nur zum prinzipiellen Nachweis der Interaktion der HERV-K(C4)-Transkripte mit den homologen Sequenzen des Plasmid-Konstruktes gedacht war, sollte ein retrovirales Infektionsmodell an murinen Zelllinien etabliert werden. Die Expression und Herstellung ecotropher infektiöser retroviraler Partikel wurde unter Verwendung der ecotrophen Verpackungszelllinie EcoPack2-293, des retroviralen pLEGFP-N1-Vektors und BD Retro-X Universal Packaging System (BD Biosciences) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der retrovirale Gentransfer gliedert sich in drei Schritte: der transienten Virusproduktion, der Bestimmung des viralen Titors und der Infektion der Zielzellen (siehe Abb. 2.5).



**Abb. 2.5:** Schematische Darstellung des methodischen Verfahrens zum retroviralen Gentransfers.

**2.2.10.1 Transiente Virenproduktion**

Viren lassen sich aufgrund der spezifischen Bindung des envelope-Proteins an Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche (Adsorption) klassifizieren (siehe Tabelle 2.3): ecotrophe Viren erkennen ausschließlich den Rezeptor mCAT-1 auf Maus- und Rattenzellen, amphotrophe Viren den Rezeptor RAM-1 und dualtrophe Viren die Rezeptoren GALV und RAM1 auf einer Reihe von Säugetierzellen. Pantrophe Viren interagieren über das envelope-Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) mit Phospholipidkomponenten auf der Zytoplasmamembran der Wirtszelle und benötigen somit keinen Zelloberflächenrezeptor zur Adsorption. Das BD Retro-X Universal Packaging System enthält als Verpackungszelllinie GP2-293, die nur für pol und gag codiert. Das envelope-Gen wird mit dem retroviralen Fusionsvektor cotransfiziert. Es stehen vier verschiedene Vektoren zur Bestimmung der Wirtsspezifität (Infektionstropismus) der Virionen zur Auswahl: p10A1, pAmpho, pVSV-G und pEco. Es wurden  $2 \times 10^6$  Verpackungszellen/60 mm-Petrischale in 5 ml Kulturmedium ausgesät und 24 h bei Normalbedingungen inkubiert. Zur Gewinnung infektiöser und nicht-replikationsfähiger ecotropher Viruspartikel (Virionen) wurden 4 µg des pEco-Vektors mit je 4 µg des retroviralen HERV-K(C4)-pLEGFP-Fusionskonstruktes liposomal in die GP2-293 cotransfiziert und je 8 µg des retroviralen Fusionskonstruktes in die ecotrophe Verpackungszelllinie EcoPack2-293, welche die retroviralen Gene gag-pol und env exprimiert, transfiziert (siehe Tabelle 2.3). Das Transfektionsreagenz FuGene wurde im Verhältnis 2:1 (µl FuGene/µg DNA) eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde jeweils der Wildtyp-Vektor pLEGFP-N1, der das Translationsstartcodon ATG am 5'-Ende des Fluoreszenzprotein EGFP enthält, transfiziert.

**Tabelle 2.3:** Verpackungssysteme zum retroviralen Gentransfer und Wirtstropismus

Zelltyp	GP2-293	EcoPack2-293 GP2-293*	GP2-293	GP2-293
Cotransfizierter Vektor	p10A1	pEco*	pAmpho	pVSV-G
Tropismus	Dualtroph	Ecotroph	Amphotroph	Pantroph
Zielzellen	Säugetiere	Maus und Ratte	Säugetiere	Säugetiere und Nicht-Säugetiere
Envelope	p10A1	gap70	4070A	VSV-G
Zielzellrezeptor	GALV (Pit1) RAM1 (Pit2)	mCAT-1	RAM1	Phosphatidylserin, Phosphatidyl-inositol, G <sub>M3</sub> Ganglioside

Das Kulturmedium wurde 8-10 h nach Transfektion abgenommen und durch 3 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden zur Produktion der Viruspartikel bei 32°C und 5% CO<sub>2</sub> für weitere 48-72 h inkubiert. Der virale Kulturüberstand wurde von den Zellen abgenommen und durch einen 0,45 µm Zellulose-Acetat-Filter filtriert, um Zellüberreste zu entfernen. Der Kulturüberstand der GP2-293 Zelllinie wurde anschließend zur Konzentrierung der Viruspartikel für 90 min. bei 30000 U/min. zentrifugiert, das Viruspellet in 30 µl TNE aufgenommen und bei 4°C ü.N. inkubiert. Die viralen Stammlösungen wurden zur Bestimmung des viralen Titers und Infektion der Zielzellen eingesetzt. Zur längeren Aufbewahrung wurden die viralen Stammlösungen zu je 1 ml aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Die produzierten Viren waren nicht replikationsfähig, da ausschließlich die Verpackungszelllinien die zur Partikelbildung und Replikation notwendigen viralen Gene gag, pol und env im Genom stabil integriert enthielten (siehe 2.1.9).

#### **2.2.10.2 Bestimmung des viralen Titers**

Die Bestimmung des viralen Titers (# cfu/ml) in Zellkulturüberständen von Verpackungszelllinien ist aus drei Gründen notwendig: zur Überprüfung der viralen Stammlösungen auf die Fähigkeit zur Infektion von Zielzellen, zur Bestimmung der optimalen Infektionsbedingungen bzw. der *multiplicity of infection* (MOI = # Viruspartikel pro Zielzelle; entspricht der eingesetzten # cfu/ml Virusstammlösung in die Infektion), zur Bestimmung der maximalen Anzahl an Zielzellen, die durch ein vorgegebnes Virusvolumen infiziert werden kann. 24 h vor Infektion wurden 0,5 x 1x10<sup>5</sup> NIH 3T3 Zellen in 30 mm Vertiefungen einer 6-well Platte ausplattiert und in insgesamt 2 ml Kulturmedium kultiviert. Es wurden sechs 10fach Verdünnungen der viralen Stammlösungen vorbereitet. Die Zellen wurden mit je 1 ml der logarithmischen Verdünnungen des zu testenden Kulturüberstandes in Gegenwart von 8 µg/ml Polybrene infiziert und für 24 h bei 32°C inkubiert. Polybrene ist ein Polykation, das die ladungsbedingte Abstoßung zwischen Viren und Zellmembran reduziert. Das Kulturmedium wurde von den infizierten NIH 3T3-Zellen abgenommen und Klone, die hohe Virustiter produzieren, in 1 mg/ml G418 (Neomycin) enthaltendem Medium für 1 Woche bei Normalbedingungen selektioniert. Die zur Selektion erforderliche G418-Konzentration ist in Vorversuchen anhand einer Antibiotika-Killkurve empirisch ermittelt worden. Die retroviralen Titer der gewonnenen Kulturüberstände (virale Stammlösungen) wurden aufgrund ihrer Fähigkeit ermittelt, G418-Resistenz von den transfizierten Verpackungszellen auf NIH 3T3-Zellen zu übertragen. Resistente Klone erscheinen nach etwa

8 Tagen. Der virale Titer des getesteten Überstandes entspricht der Anzahl der G418 resistenten Kolonien in der höchsten Verdünnung, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor. Das Auszählen von vier Kolonien in der  $10^6$  Verdünnung würde somit einem viralen Titer von  $4 \times 10^6$  entsprechen:

$4 \text{ colony forming units (cfu)} \times 10^6 = 4 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$ . Die viralen Stammlösungen der EcoPack2-293 und GP2-293 Zelllinien sollten einen viralen Titer von  $>10^6$  aufweisen.

### **2.2.10.3 Infektion der Zielzellen**

Die Mauszelllinien NIH 3T3 und LM(TK<sup>-</sup>) wurden 18h vor Infektion in einer Zelldichte von  $1 \times 10^5/60$  mm-Petrischale ausgesät und bei Normalbedingungen kultiviert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Mauszelllinien mit je 3 ml des filtrierten Kulturüberstands der virusproduzierenden EcoPack2-293-Zelllinie und 30  $\mu$ l der GP2-293-Zelllinie (maximal verfügbare Menge an viraler Stammlösung aus einem Transfektionsexperiment) in Gegenwart von 8  $\mu$ g/ml Polybrene infiziert. Die Zellen wurden zur Infektion für 24 h bei 32°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch 5 ml frisches Kulturmedium ersetzt und die Zellen weitere 24-72 h bei Normalbedingungen kultiviert. Das Kulturmedium wurde wiederum abgenommen und die infizierten Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Cell-Dissociation Buffer und einer Inkubation für 5min. wurden die Zellen von der Platte geschabt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zur Selektion von infizierten Zellen mit stabil integrierter proviraler DNA wurden 10  $\mu$ l der Zellsuspension erneut in 60mm Petrischalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 60-80% in selektivem Medium (1 mg/ml G418) für 1 Woche kultiviert. Die restliche Zellsuspension wurde zum Nachweis der Expression des Reportergens verwendet. Die Expression des Reportergens EGFP wurde visuell unter dem Fluoreszenzmikroskop sowie quantitativ im FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting; Zusammenarbeit mit dem FACS-Lab der Universität Mainz; Dr. Steffen Schmitt; <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de>) nachgewiesen. Fluoreszenz bezeichnet die Eigenschaft einiger Chromophore, bei Anregung mit Licht längerwelliges, d.h. rotverschobenes Fluoreszenzlicht abzugeben. EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) ist die rotverschobene Variante des Wildtyps GFP und absorbiert blaues Licht bei einem Extinktionsmaximum von 488 nm und emittiert grünes Licht bei einem Emissionsmaximum von 507 nm. Bei der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten

monochromatischen Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor detektiert wird, verhält sich proportional zur Menge an exprimierten EGFP/Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und Binnenstruktur der Zellen gewonnen.

### **3. ERGEBNISSE**

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in drei thematische Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil werden die Ergebnisse zum generellen Nachweis von HERV-K(C4)-spezifischen Antisense Transkripten beschrieben. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse zur Funktion der retroviralen Insertion HERV-K(C4) dokumentiert, und im letzten Abschnitt die Vorversuche zum retroviralen Gentransfer vorgestellt.

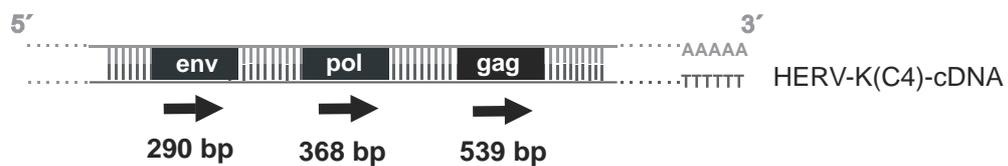
#### **3.1 Untersuchungen zur Expression von HERV-K(C4) im humanen Genom**

Das Vorhandensein von HERV-K(C4)-RNA konnte bereits in vorherigen Untersuchungen über einen funktionellen Reporter-Gen-Assay sowie durch RT-PCR mit spezifischen Primern in HepG2-Zellen belegt werden (Schneider et al., 2001a). Ein spezifischer Nachweis von HERV-K(C4) Transkripten in der Antisense-Orientierung sollte nunmehr mittels RT-PCR, RNase Protection Assays und Northern-Blot Analyse in verschiedenen humanen Zelllinien sowie Geweben erfolgen. Weiterhin sollte geklärt werden, ob es sich bei den bisher nachgewiesenen Transkripten um unabhängig von der C4-Expression entstandene RNA, gespleißte RNA des herausgeschnittenen Intron 9 oder auch ungespleißte C4 prä-mRNA handelt.

##### **3.1.1 RT-PCR-Nachweis von HERV-K(C4)-spezifischer Antisense mRNA**

Der Nachweis von HERV-K(C4)-spezifischen mRNA Transkripten in humanen Zelllinien und Geweben erfolgte zunächst mittels RT-PCR (siehe Abb. 3.1). Im Vergleich zu anderen RNA-Nachweismethoden, wie z.B. der Northern-Blot-Analyse, ist die Sensitivität der RT-PCR erheblich größer (Chen et al., 1997) und ermöglicht es, geringe Mengen an RNA-Kopien zu amplifizieren. Die poly(A<sup>+</sup>)-mRNA wurde unter Verwendung von Streptavidin-markierten Magnetpartikeln aus den humanen Zelllinien HepG2, Mono Mac6 (Monocytenzelllinie), EBV-transformierten B-Zellen, HS27 (Hautfibroblasten), primären Leberfibroblasten und frischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen gewonnen. Zusätzlich konnte die totale RNA aus einer kryokonservierten Leberbiopsieprobe und aus postmortalem Nieren-, Gehirn-, Milz-, Herz-, Muskel-, Haut- und Lebergewebe unter Anwendung der Guanidiniumthiocyanat-Methode extrahiert werden. Im Anschluß an jede RNA-Extraktion wurde eine DNaseI Verdaureaktion durchgeführt, um Reste von kontaminierender genomischer DNA zu entfernen.

Die heterogenen Pools von RNA-Transkripten standen nun zur Analyse der Genexpression in den verschiedenen humanen Geweben und Zelllinien zur Verfügung. Die poly(A<sup>+</sup>)-mRNA wurde mittels Oligo(dT)-Primern revers transkribiert, und definierte Bereiche der synthetisierten cDNA unter Verwendung von sequenzspezifischen Primerpaaren in der anschließenden PCR amplifiziert (siehe Abb. 3.1 und Tabelle 2.2). Eine Amplifikation von DNA-Kontaminationen konnte in allen durchgeführten Ansätzen durch parallel mitgeführte RT-PCR-Reaktionen ohne reverse Transkriptase, aber gleicher Menge an RNA, ausgeschlossen werden.

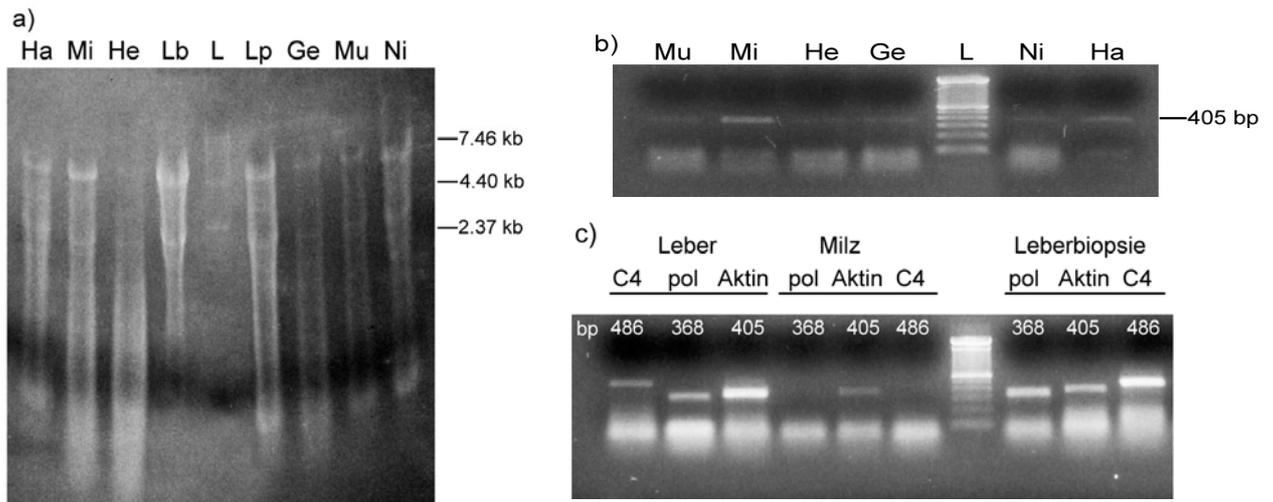


**Abb.3.1:** Schematische Darstellung der Einzelstrang HERV-K(C4)-cDNA nach reverser Transkription. Die HERV-K(C4)-mRNA wurde mittels Oligo(dT)-Primern revers transkribiert und die retroviralen Gene env, pol und gag mittels sequenzspezifischer Primer in der PCR mit einer Länge von 290 bp, 368 bp und 539 bp (Pfeile) amplifiziert.

### 3.1.1.1 Nachweis in humanen Geweben

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA aus den Geweben wurde zunächst in Formaldehydhaltigen Agarosegelen und parallel durch Amplifikation des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin, das konstitutiv in jeder Zelle exprimiert wird, kontrolliert. Diese Kontrollen sind vor allem bei autolytischen Geweben von besonderer Bedeutung, da die RNA bei dem Prozess der Autolyse vollständig degradiert wird. Wie Abb. 3.2 a) zeigt, konnte die isolierte Gesamt-RNA aus dem postmortalen Leber-, Nieren-, Haut-, Muskel-, Gehirn-, Herz- und Milzgewebe sowie der Leberbiopsieprobe mit Hilfe der 28s- (ca. 5 kb) und 18s-rRNA (ca. 2kb) als klare sichtbare Banden unterschiedlicher Intensität detektiert werden. In Abb. 3.2 b) ist die isolierte Gesamt-RNA aus den verschiedenen Gewebeproben auf das Vorhandensein von mRNA-Transkripten des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin durch Amplifikation eines 405 bp langen Fragments unter Anwendung der Primerpaare  $\beta$ -Aktin-for 5'-rev 3' analysiert worden. Wie die Agarosegel-Analyse der RT-PCR-Produkte in Abb. 3.2 b) zeigt, konnten nur wenige Amplifikate als schwache Banden im Gel sichtbar gemacht werden, was auf eine geringe Anzahl von  $\beta$ -Aktin mRNA im Template der Niere, Muskel, Herz, Haut und Gehirn schließen lässt. Die amplifizierten  $\beta$ -Aktin-RT-PCR-Produkte aus der Gesamt-RNA der Milz (Abb. 3.2 b-c), der postmortalen Leber und der Leberbiopsie (Abb. 3.2 c) konnten hingegen als klare sichtbare

Banden mit spezifischer Länge von 405 bp im Gel detektiert werden. Der Nachweis von HERV-K(C4)-Transkripten erfolgte durch Amplifikation von cDNA-Fragmenten der retroviralen Gene gag (539 bp), pol (368 bp) und env (290 bp) unter Verwendung der spezifischen Primerpaare gag-HindIII 5'/gag-HindIII 3', pol-HindIII 5'/pol-HindIII 3', env-HindIII 5'/env-HindIII 3' (siehe Tabelle 2.2 und Abb. 3.1).

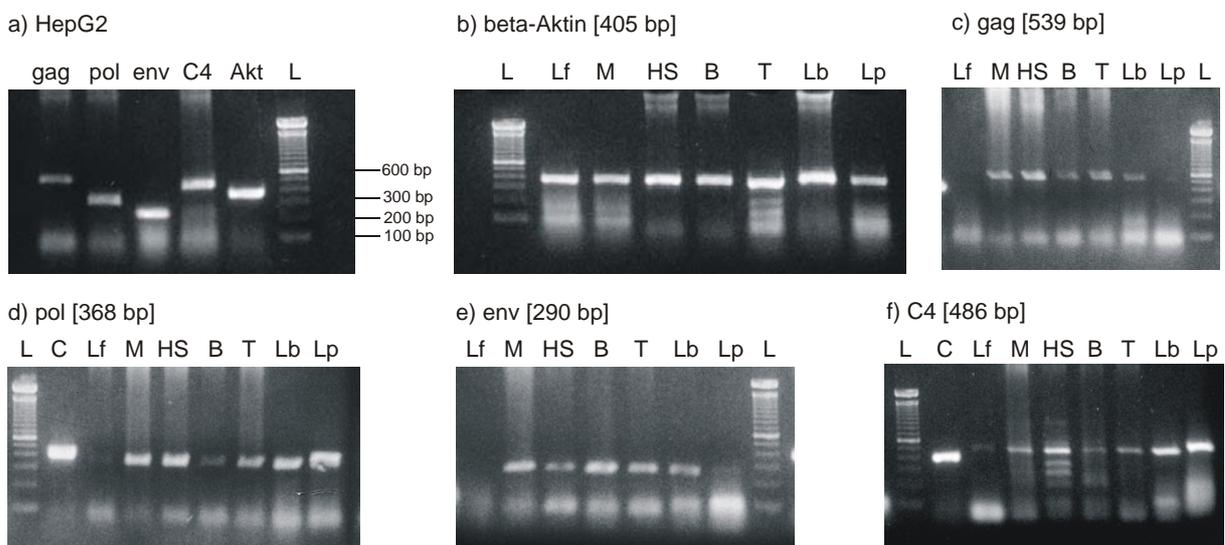


**Abb.3.2:** Nachweis von HERV-K(C4)-spezifischen mRNA-Transkripten in Geweben. Gelelektrophoretische Auftrennung a) der isolierten Gesamt-RNA aus den postmortalen Geweben Haut (Ha), Milz (Mi), Herz (He), Leber (Lp), Gehirn (Ge), Muskel (Mu), Niere (Ni) und der kryokonservierten Leberbiopsieprobe (Lb) in einem denaturierenden Formaldehyd-haltigen Agarosegel, b) der  $\beta$ -Aktin RT-PCR-Produkte in einem 1,5%igen Agarosegel, die mit dem Primerpaar  $\beta$ -Aktin-for 5'/rev 3' aus der RNA der Muskel-, Milz-, Herz-, Gehirn-, Nieren- und Hautgewebeproben amplifiziert wurden, c) der RT-PCR-Produkte HERV-K(C4)-pol,  $\beta$ -Aktin und C4, amplifiziert aus der Gesamt-RNA der postmortalen Leber, Milz und einer Leberbiopsieprobe. Als Längenstandard (L) wurde eine a) 0,24-9,5 kb RNA Leiter, b) und c) 100 bp Leiter aufgetragen

Als positive Kontrolle wurde die C4-Expression unter Verwendung des exonspezifischen Primerpaares C4-exon4-5'/C4-exon9-3' untersucht. Dieses führt nur bei Anwesenheit von gespleißter C4-mRNA zur Amplifikation eines definierten cDNA-Fragments von Exon 4 bis Exon9, mit einer Länge von 486 bp. Wie die Auftrennung der RT-PCR-Produkte in Abb. 3.2 c) und Abb. 3.3 d) zeigt, konnte in der postmortalen Leber und der Leberbiopsieprobe zunächst das HERV-K(C4)-Fragment pol mit einer spezifischen Länge von 368 bp sowie das C4-Fragment mit einer spezifischen Länge von 486 bp nachgewiesen werden. In anschließenden RT-PCR-Reaktionen gelang es, die retroviralen HERV-K(C4)-Gene gag und pol aus der cDNA von Leberproben zu amplifizieren. Es konnten jedoch keine HERV-K(C4)- und C4-Transkripte in den postmortalen Geweben Niere, Milz, Haut, Gehirn, Herz und Muskel detektiert werden, wie in Abb. 3.2 c) beispielhaft für die Milz dargestellt.

3.1.1.2 Nachweis in humanen Zelllinien

Die isolierte poly(A<sup>+</sup>)-mRNA aus den verschiedenen humanen Zelllinien wurde, im Gegensatz zu der Gesamt-RNA aus den Geweben, nicht in einem denaturierenden Formaldehyd-haltigen Agarosegel sichtbar gemacht, da die ribosomale RNA als Marker für die Größenverteilung der RNA in den Proben aufgrund der Extraktionsmethode nicht mehr vorhanden war. Die Qualität der poly(A<sup>+</sup>)-mRNA konnte durch Amplifikation des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin und des C4-Gens überprüft werden. In Abbildung 3.3 sind die nachgewiesenen HERV-K(C4)-spezifischen RT-PCR-Produkte aller positiv getesteten Zelllinien und der Gewebe (a-f) in 1,5%igen Agarosegelen nebeneinander aufgetrennt worden. Die RT-PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer 100 bp Leiter (L) auf ihre spezifische Länge kontrolliert.



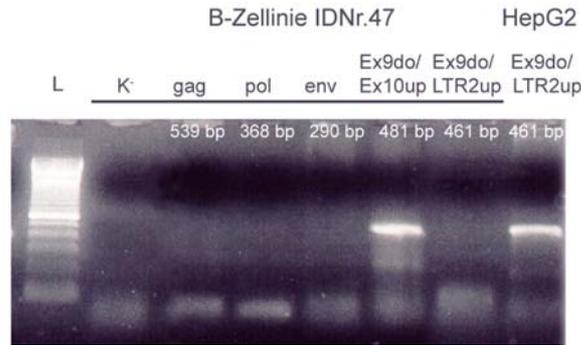
**Abb. 3.3:** Gelelektrophoretische Auftrennung der HERV-K(C4)-spezifischen sowie der C4 und  $\beta$ -Aktin RT-PCR-Produkte, die aus der poly(A<sup>+</sup>)-mRNA verschiedener humaner Zelllinien und Geweben amplifiziert wurden. a) Nachweis der retroviralen Fragmente gag [539 bp], pol [368 bp], env [290 bp] sowie der Gene C4 [486 bp] und  $\beta$ -Aktin [405 bp] in der HepG2-Zelllinie. b-f) In verschiedenen humanen Zelllinien: Leberfibroblasten (Lf), Mono Mac6 (M), HS27 (HS), B-Zellen (B), CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Gewebeproben einer Leberbiopsie (Lb) und postmortaler Leber (Lp). Als Längenstandard (L) wurde eine 100 bp Leiter aufgetragen. Als Kontrolle für die RT-PCR wurde eine Control Neo pa RNA revers transkribiert und mit Primern amplifiziert, die für ein 382 bp Fragment spezifisch sind.

Die retroviralen HERV-K(C4)-Fragmente gag, pol und env konnten mit spezifischer Länge von 539 bp, 368 bp und 290 bp sowohl in der HepG2-Zelllinie (Abb. 3.3 a) als auch in der MonoMac6-, HS27-, CD4<sup>+</sup> T- und B-Zelllinie (Abb. 3.3 c-e) mit unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden. In der Leberfibroblasten-Zelllinie konnte ausschließlich das pol-Fragment als schwache Bande im Gel detektiert werden. Wie schon in Abb. 3.2 c) für das pol-Fragment gezeigt, konnten alle drei retroviralen HERV-K(C4)-RNA-Fragmente gag, pol und

env aus der cDNA der postmortalen Lebergewebs- und Leberbiopsieprobe amplifiziert werden. Die Expression des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin (405 bp Fragment) sowie des C4-Gens (486 bp Fragment) konnte ebenfalls in allen getesteten Zelllinien und Lebergewebsproben nachgewiesen werden. In der Leberfibroblasten Zelllinie konnte nur eine geringe Expression des C4-Gens aufgrund der schwach sichtbaren Bande im Gel detektiert werden, was nicht auf die generelle Syntheseleistung der Zelle zurückzuführen sein kann, da gleichzeitig eine starke, den anderen Zelllinien vergleichbare Expression von  $\beta$ -Aktin nachgewiesen wurde.

Die Spezifität der mittels RT-PCR detektierten HERV-K(C4)-cDNA Fragmente (siehe Abb. 3.3) wurde anhand einer EBV-transformierten B-Lymphozytenzelllinie (ID-Nr.47; siehe 2.1.9) kontrolliert. Diese ist homozygot für den MHC-Haplotyp HLA-A1, Cw7, B8; DR3, C4AQ0B1 und kann wegen der bekannten C4A-Deletion bei vorhandenem kurzen C4B-Gen ohne HERV-K(C4)-Insertion eine HERV-K(C4)-RNA nicht selbst exprimieren. Somit sollte eine unspezifische Bindung der Primer an homologe Sequenzen anderer im menschlichen Genom vorkommenden HERV-K Familien ausgeschlossen werden. Die isolierte mRNA wurde mittels Oligo(dT)-Primern umgeschrieben und eine Amplifikation von unspezifischen Transkripten unter Verwendung der HERV-K(C4)-sequenzspezifischen Primerpaare überprüft. Parallel wurde das Fehlen der Intron 9-Insertion durch die Primerpaare Ex9do/Ex10up und Ex9do/LTR2up untersucht (Schneider et al., 2001). Das Primerpaar Ex9do/Ex10 up führt nur bei Abwesenheit des endogenen Retrovirus (kurzes Intron 9) zur Amplifikation eines 481 bp langen Fragments, weil das andernfalls zu fordernde 7 kb-Produkt während der relativ kurz gewählten PCR-Extensionsphase von 1 min. nicht synthetisiert werden kann. Ausschließlich bei Anwesenheit der HERV-Insertion hingegen ist unter Einsatz des Primerpaares Ex9do/LTR2up ein Amplifikat von 461 bp zu erwarten, da der Primer LTR2up in einer HERV-internen Sequenz bindet.

Wie Abb. 3.4 zeigt, wurden keine unspezifischen Transkripte unter Verwendung der HERV-K(C4)-spezifischen Primerpaare in der RT-PCR amplifiziert. Es konnte jedoch ein spezifisches cDNA-Fragment des gespleißten C4B-Gens, von Exon9 bis Exon 10, mit einer Länge von 481 bp nachgewiesen werden. Die HepG2-mRNA wurde als positive Kontrolle zum generellen Nachweis der retroviralen Insertion im C4-Gen mittels des Primerpaares Ex9do/LTR2 up getestet. Als weitere Kontrolle wurden die HERV-K(C4)-Fragmente im Anschluß an die RT-PCR mittels Cycle Sequencing auf ihre Sequenz überprüft und mit der

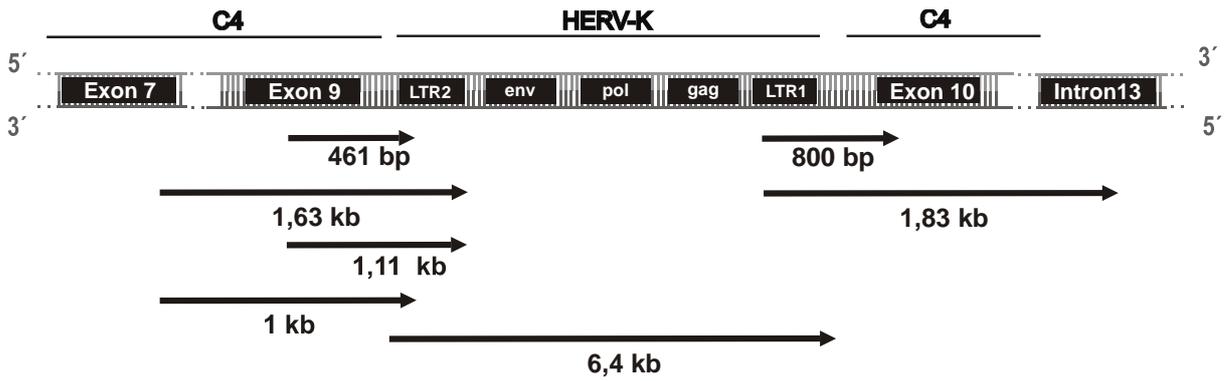


**Abb. 3.4:** Gelelektrophoretische Darstellung der RT-PCR-Produkte, die aus der mRNA der B-Zelllinie IDNr.47 ohne HERV-K(C4)-Insertion mittels der Primerpaare gag-HindIII 5'/3', pol-HindIII 5'/3', env-HindIII 5'/3', Ex9do/Ex10up und Ex9do/LTR2up generiert wurden (Erklärung siehe Text). K<sup>-</sup> = negative Kontrolle auf DNA-Kontaminationen, L = 100 bp Längenstandards. Die HepG2-mRNA wurde als positive Kontrolle zum Nachweis auf das Vorhandensein der HERV-K(C4)-Insertion eingesetzt.

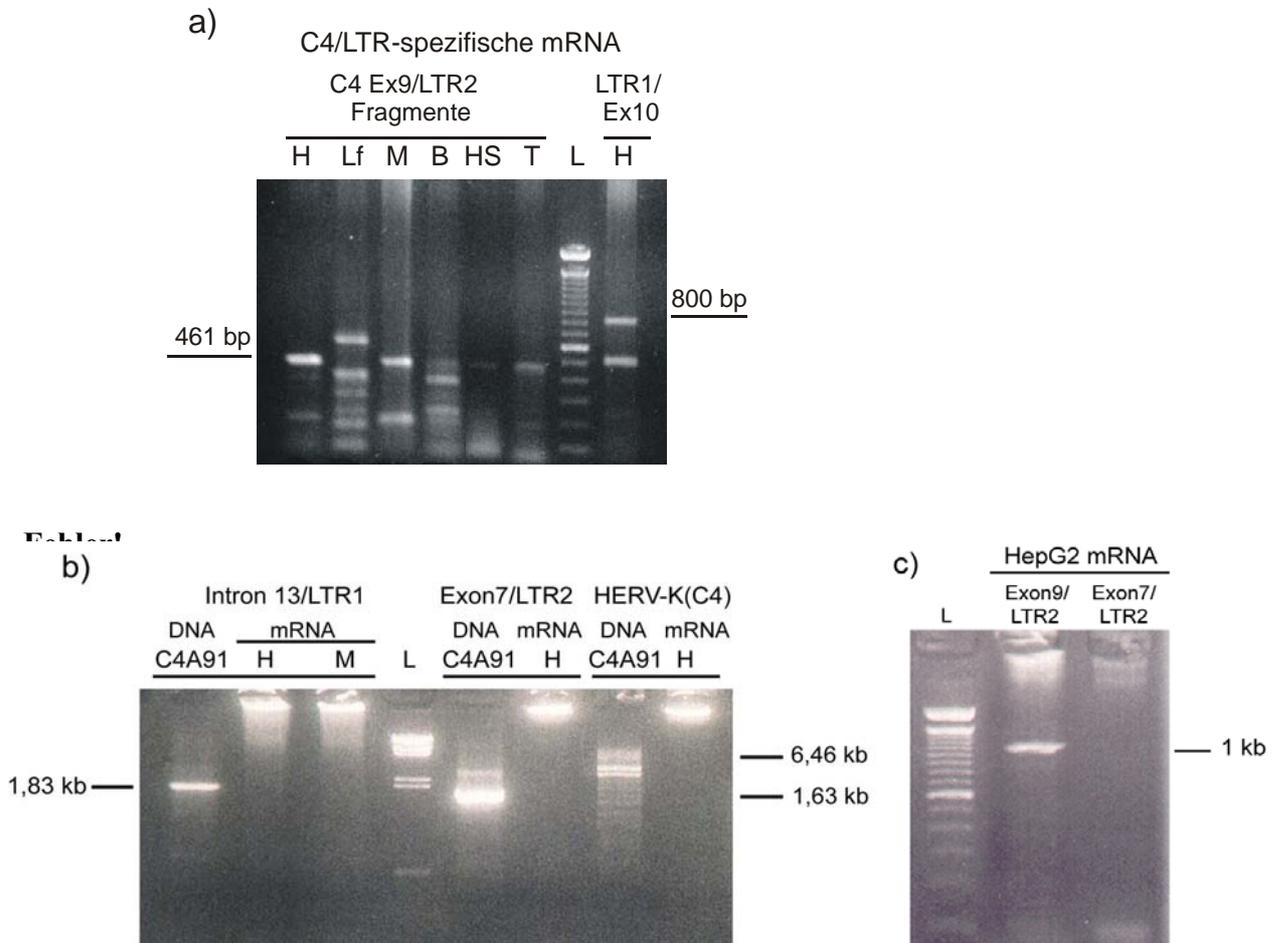
publizierten genomischen Sequenz von HERV-K(C4) aus dem  $\lambda$ -Klon C4A91 (Chu et al., 1995) und einem als C4A3 typisierten Gen (Dangel et al., 1994) verglichen. Die im Rahmen dieser Arbeit amplifizierten cDNA-Fragmente zeigten eine Sequenzidentität von über 99,8% mit der von HERV-K(C4) im C4-Gen.

### 3.1.1.3 Nachweis von C4/HERV-K(C4)-mRNA-Intermediaten

Im Anschluß an die Untersuchungen auf das Vorhandensein von HERV-K(C4)-mRNA in den unterschiedlichen humanen Zelllinien und Geweben sollte mittels RT-PCR geklärt werden, ob die nachgewiesenen HERV-K(C4) mRNA-Transkripte im Rahmen der C4-Expression (C4-prä-mRNA) oder unabhängig, durch den LTR2 initiiert (Dangel et al., 1994), synthetisiert werden. Die Untersuchung zur Struktur der HERV-K(C4)-Transkripte wurde zunächst mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern in der PCR durchgeführt, die an die flankierenden LTRs, LTR1 und LTR2, und die jeweils angrenzenden C4 Exons 9 und 10 binden (siehe Abb. 3.5). Das Primerpaar Ex9do/LTR2up amplifiziert ein spezifisches C4/LTR2-Fragment mit einer Länge von 461 bp und das Primerpaar LTR1-for-Xho/Ex10up ein LTR1/C4-Fragment mit einer Länge von 800 bp (siehe Abb. 3.6 und Tabelle 2.2). In den durchgeführten RT-Reaktionen wurde die mRNA mittels Oligo(dT)-Primern umgeschrieben. In Abb. 3.6 a) sind die C4/LTR-spezifischen RT-PCR-Produkte, die aus der poly(A<sup>+</sup>)-mRNA der humanen Zelllinien HepG2, Leberfibroblasten, MonoMac6, B-Zellen, HS27 und CD4<sup>+</sup> T-Zellen generiert wurden, dargestellt. Ein C4-Exon9/HERV-K(C4)-LTR2 mRNA Intermediat konnte mit der erwarteten Länge von 461 bp in den HepG2-, MonoMac6-, HS27-, B-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden.



**Abb. 3.5:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur des langen C4A-Gens inklusive der HERV-K(C4) Insertion im Intron 9 (nicht maßstabsgetreu, LTR2: 550 bp Exon 9: 135 bp). Die Pfeile definieren die mittels RT-PCR aus mRNA und PCR aus DNA amplifizierte C4/HERV-K(C4)-cDNA Fragmente spezifischer Länge .



**Abb. 3.6:** Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte zum Nachweis von C4/HERV-K(C4)-spezifischen-Intermediaten. a) Nachweis von C4-Exon9/HERV-K(C4)-LTR2-Intermediaten in HepG2- (H), Leberfibroblasten- (Lf), MonoMac6- (M), HS27- (HS), CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T) und HERV-K(C4)-LTR1/C4-Exon10-Intermediaten in HepG2-Zellen. b) Nachweis von HERV-K(C4)-LTR1/C4-Intron13-Intermediaten in HepG2- (H) und MonoMac6-Zellen (M), C4-Exon7/HERV-K(C4)-LTR2-Intermediaten sowie die komplette HERV-K(C4)-Insertion in HepG2-Zellen (H). c) Nachweis von C4-Exon9/HERV-K(C4)-LTR2-Intermediaten und C4-Exon7/HERV-K(C4)-LTR2-Intermediaten in HepG2-Zellen. Längenstandard (L), Kontroll-DNA C4A91.

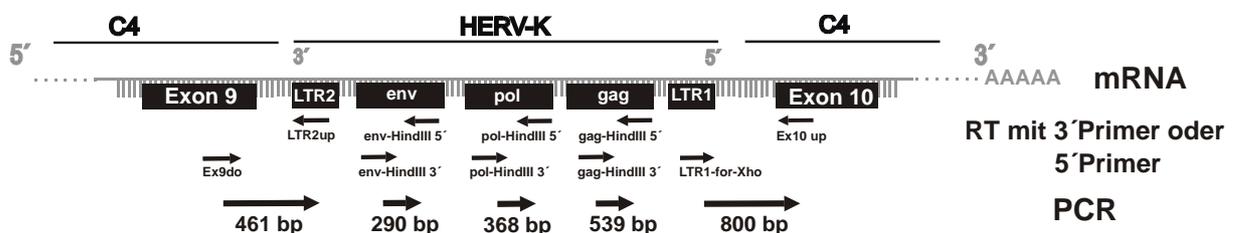
In der Leberfibroblasten-Zelllinie konnte hingegen kein spezifisches Ex9/LTR2-Amplifikat detektiert werden. Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigt, daß ausschließlich zwei unspezifische Banden mit einer Länge von ca. 680 bp und 350 bp im Gel sichtbar wurden. Es ist ebenfalls zu sehen, daß die Intensität der RT-PCR-Produkte jeder Spur und somit jeder getesteten Zelllinie unterschiedlich stark ist. Zum Nachweis eines HERV-K(C4)-LTR1/C4-Exon10-Transkriptes wurde ausschließlich die HepG2-mRNA getestet. Wie Abb. 3.6 a) zeigt, waren zwei Banden im Gel voneinander zu unterscheiden. Die obere Bande entspricht dem spezifischen RT-PCR-Produkt mit definierter Länge von 800 bp, wie ein Vergleich mit dem 100 bp Längenstandard (L) zeigt. Die untere stellt ein knapp 500 bp langes, niedermolekulares Fragment unbekannter Herkunft, aber gleicher Intensität dar. Die RT-PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert und mit der genomischen Sequenz verglichen (siehe 2.2.5.6.2). Dabei konnte insgesamt eine Sequenzidentität von über 99,8% festgestellt werden. Die Sequenz der unspezifischen Exon9/LTR2-RT-PCR-Produkte in der Leberfibroblastenprobe (680 bp und 350 bp) und das 500 bp niedermolekulare LTR1/Exon10-Fragment in der HepG2-Probe konnten nicht bestimmt werden.

In Abb. 3.6 b) wurden in der RT-PCR verschiedene Primerpaare getestet, um die ungefähre Länge der C4/HERV-K(C4)-Intermediate bestimmen zu können. Das Primerpaar 3b/LTR2-rev-Xho amplifiziert ein Fragment von Exon7 bis einschließlich LTR2 mit einer Länge von 1,63 kb, LTR1-for-Xho/6A ein Fragment von LTR1 bis Intron 13 mit einer Länge von 1,83 kb und LTR2-for-Xho/LTR1-rev-Xho die komplette HERV-K(C4)-Insertion mit einer Länge von 6,4 kb (siehe Abb. 3.5). Da die zu amplifizierenden Fragmente eine Länge von > 1kb aufwiesen, wurde das SAWADY 'Mid Range PCR'-System angewendet. Als positive Kontrolle wurde jeweils die DNA des Lambdaklons A12 (C4A91, inklusive HERV-K(C4)) in parallelen PCR-Ansätzen mitgeführt. Die genaue Lage der LTR-for/rev-Xho Primer wird unter 3.2. beschrieben. Die Primer 3b und 6 stammen aus der Arbeit von Chu (1995) zur Untersuchung der Genstruktur der Komplementkomponente C4. Wie Abb. 3.6 b) zeigt, konnten keine C4-Exon7/LTR2-HERV-K(C4)-Transkripte sowie HERV-K(C4)-LTR1/Intron 13-Transkripte mittels RT-PCR in den getesteten Zelllinien HepG2 und MonoMac6 nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu konnte in der positiven Kontrolle (siehe Abb. 3.6 b, DNA C4A91) das Exon7/LTR2 und LTR1/Intron 13 und HERV-K(C4) PCR-Produkt mit definierter Länge von 1,63 kb, 1,83 kb aus dem C4A91-Klon generiert werden. Die Amplifikation eines RT-PCR-Produktes aus der HepG2-mRNA mit einer Länge von 6,4 kb, welches die komplette HERV-K(C4)-Insertion einschließt (siehe Abb. 3.5), war ebenfalls

nicht möglich. In der positiven Kontrolle waren drei nah beieinander liegende Banden im Gel voneinander zu unterscheiden, wobei die obere dem DNA-Fragment mit definierter Länge entspricht. Da keine mRNA-Transkripte > 1 kb mittels RT-PCR detektiert werden konnten, sollte überprüft werden, ob die Ursache hierfür in der RT-Reaktion aufgrund von Abbruchreaktionen während der Synthese des cDNA-Stranges liegen könnte. Daher wurden in zwei anschließenden RT-PCR-Reaktionen das Primerpaar Exon9 HindIII 5'/LTR2-rev-EcoRI 3', das ein Fragment mit einer Länge von 1,11 kb sowie das Primerpaar 3b (Exon7)/LTR2-up, das ein Fragment mit einer Länge von 1 kb amplifiziert, getestet. Als Template wurde die mRNA aus der HepG2-Zelllinie, die ebenfalls in den vorherigen Reaktionen (Abb. 3.6.b) verwendet wurde, eingesetzt. Wie Abb. 3.6 c) zeigt, konnte ein spezifisches Fragment von Exon9 bis einschließlich LTR2, jedoch kein Fragment von Exon 7 bis LTR2 aus derselben HepG2-mRNA amplifiziert werden. Da die zu amplifizierenden Fragmente ungefähr die gleiche Länge aufweisen, waren somit keine C4-Exon7/HERV-K(C4)-LTR2 intermediären Transkripte in der Template mRNA enthalten.

### 3.1.1.4 Untersuchungen zur Orientierung der HERV-K(C4)-Transkripte

Die Orientierung der HERV-K(C4)-mRNA relativ zu der C4 codierenden Sequenz wurde ebenfalls mittels RT-PCR in HepG2-Zellen nachgewiesen. Hierzu wurde die Reverse Transkription in unabhängigen Versuchsansätzen mit je einem der beiden sequenzspezifischen Primer durchgeführt und die RT-Produkte anschließend in der PCR amplifiziert (Abb. 3.7). Zum Nachweis von HERV-K(C4)-Transkripten in der Antisense Orientierung wurden die 3'Primer Ex10 up, gag-HindIII 5', pol-HindIII 5' und env-HindIII 5' in der RT verwendet.



**Abb. 3.7:** Schematische Darstellung der RT-PCR zum Nachweis von HERV-K(C4)-Antisense Transkripten. Die sequenzspezifischen Primer Ex10up, gag-HindIII 5', pol-HindIII 5', env-HindIII 5' und LTR2up binden jeweils 3' an die HERV-K(C4)-Antisense mRNA. Die Primer Ex9do, env-HindIII 3', pol-HindIII 3', gag-HindIII 3' und LTR1-for-Xho binden jeweils 5' an die HERV-K(C4)-Antisense mRNA, wodurch eine Reverse Transkription nicht möglich ist. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend in der PCR mittels der Primerpaare Ex9do/LTR2up, env-HindIII 3'/5', pol-HindIII 3'/5', env-HindIII 3'/5' und LTR1-forXho/Ex10up amplifiziert.



**Abb. 3.8:** Gelelektrophoretische Darstellung der RT-PCR-Produkte zum Nachweis der Orientierung von HERV-K(C4)-Transkripten in der HepG2-Zelllinie. Die HepG2-mRNA wurde jeweils mit dem 3' oder 5'Primer (A Antisense, S Sense), die spezifisch an die retroviralen Gene gag, pol und env sowie Exon9/LTR2, LTR1/Exon10 und das C4A-Gen binden, revers transkribiert. Die RT-Produkte wurden in der anschließenden PCR mittels der 3' und 5'Primer mit definierter Länge von 539 bp (gag), 368 bp (pol), 290 bp (env), 461 bp (Ex9/LTR2), 800 bp (LTR1/Ex10) und 486 bp (C4A) amplifiziert (Erklärung siehe Text und Abb. 3.7). Als Kontrolle wurde artifizielle Sense und Antisense RNA eines 287 bp langen env-Fragments, das zuvor in den pGEM3Z Vektor kloniert wurde, mittels der T7 (S) oder Sp6 (A) Polymerase synthetisiert und als Template in die RT-PCR eingesetzt.

Zur Darstellung von möglichen HERV-K(C4)-Sense Transkripten wurde der 5'Primer Ex9do, env-HindIII 3', pol-HindIII 3' und gag-HindIII 3' und LTR1-for-Xho in die RT eingesetzt. Die Lage der Primer sowie die Länge der RT-PCR-Produkte sind in Abb. 3.7 dargestellt. Wie Abb. 3.8 zeigt, konnten nur HERV-K(C4)-Transkripte in der Antisense-Orientierung (Spur A) mit spezifischer Länge von 539 bp (gag), 368 bp (pol), 290 bp (env) nachgewiesen werden, die mit dem retroviralen 5'Primer revers transkribiert wurden. Es ist ebenfalls zu sehen, daß auch die C4/HERV-K(C4)-Intermediate Ex9/LTR2 und LTR1/Ex10 ausschließlich in der Antisense Orientierung (in Bezug auf die Transkriptionsrichtung von HERV-K(C4), Spur A,) mit spezifischer Länge von 461 bp und 800 bp detektiert werden konnten, die mit dem 3'Primer Ex10up und LTR2up transkribiert wurden. Weiterhin wurde die C4A-mRNA mittels des C4-exon4 5' (Antisense, A) oder C4-exon9 3'Primers (Sense, S) in der RT-Reaktion auf ihre Orientierung überprüft. Die gelelektrophoretische Auftrennung der C4-RT-PCR-Produkte in Abb. 3.8 zeigt, daß die C4-mRNA wie zu erwarten nur in der Sense Orientierung (Spur S) mit dem C4-exon9 3'Primer nachgewiesen werden konnte. Als Templatekontrolle zum möglichen Nachweis von RNA-Transkripten in beiden Orientierungen wurde artifizielle Sense und Antisense RNA des retroviralen env-Gens in die RT-PCR eingesetzt. Hierzu wurde ein 287 bp langes env-Fragment in den pGEM3Z-Vektor kloniert (siehe Tabelle 2.2) und spezifische RNA-Transkripte in je beiden Orientierungen unter Anwendung der T7- (Sense) oder Sp6-Polymerase (Antisense) in-vitro synthetisiert (siehe Abb. 2.3). Es konnte sowohl ein spezifisches RT-PCR-Produkt mit einer Länge von 287 bp aus der env-Sense RNA als auch

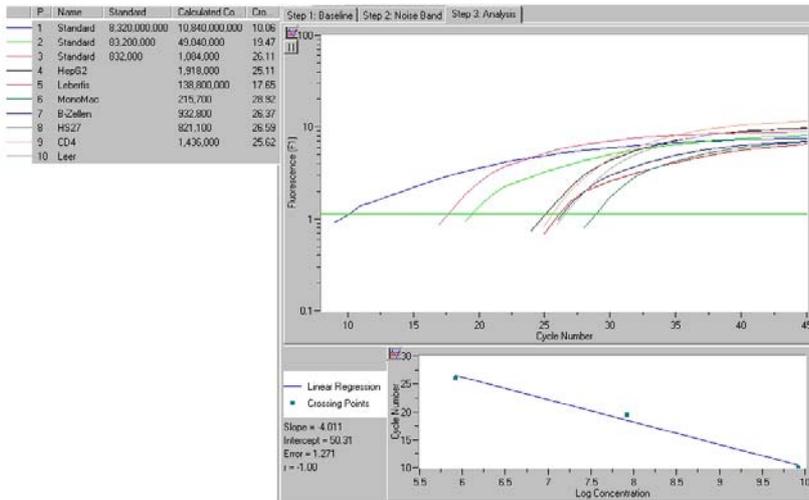
aus der env-Antisense RNA amplifiziert werden, die mit dem jeweiligen env-HindIII 3' (Sense) oder env-EcoRI 5' Primer (Antisense) revers transkribiert wurde.

### 3.1.1.5 Quantifizierung von HERV-K(C4)-Antisense Transkripten

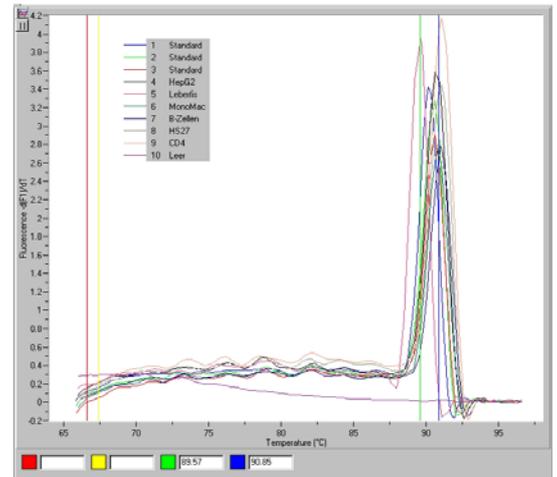
Zur quantitativen Bestimmung der Kopienanzahl von HERV-K(C4)-Antisense Transkripten in verschiedenen humanen Zelllinien wurde die Real time RT-PCR angewendet. Das Light Cycler System ermöglicht eine qualitative und quantitative Amplifikation von spezifischen RNA-Transkripten aus einem heterogenen Pool von RNAs mit Hilfe des sequenzunabhängigen Fluoreszenzfarbstoffes SYBRGreenI und sequenzspezifischen Primern. Die Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA-Sequenzen wurde mit Hilfe eines parallel mitgeführten DNA-Standards homologer Sequenz bestimmt. Die isolierte mRNA aus den humanen Zelllinien HepG2, MonoMac6, HS27, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen und Leberfibroblasten wurde zunächst mittels Reverser Transkription und unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern revers transkribiert. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend mittels der sequenzspezifischen Primerpaare gag-HindIII 5'/3', pol-HindIII 5'/3' und env-HindIII 5'/3' im Light-Cycler quantifiziert. Als interne Expressionskontrolle wurde die Kopienzahl des Haushaltgens  $\beta$ -Aktin und des C4-Gens mittels der Primerpaare  $\beta$ -Aktin-for 5'-rev 3', C4-Exon4 5'/C4-Exon9 3' in parallelen Ansätzen bestimmt. Zur Erstellung einer externen Standardkurve wurden drei bis fünf bekannte Ausgangskonzentrationen der linearisierten Vektoren gag-, pol-, und env- $\beta$ -Gal-fus (siehe 3.2.2) sowie Aktin- und C4-pCR-TOPO, die die zu amplifizierenden cDNA-Fragmente als Inserts enthalten, als Template in der PCR mitgeführt. In Abb. 3.9 a) und c) ist die Quantifizierung der cDNA-Proben am Beispiel einer im Light Cycler durchgeführten Real-Time PCR zur Expressionsanalyse des Haushaltgens  $\beta$ -Aktin und des HERV-K(C4)-Fragments pol dargestellt. Durch die Bestimmung des relativ konstant und stark exprimierten  $\beta$ -Aktin Gens (interne Kontrolle) lassen sich die RNA-Proben der Zelllinien HepG2, MonoMac6, HS27, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen und Leberfibroblasten direkt vergleichen. Wie Abb. 3.9 a) und c) zeigen, verhält sich die Fluoreszenz proportional zur Menge des spezifischen Templates, das sich im Reaktionsgemisch befindet. Die Light Cycler Software kalkuliert automatisch die fraktionelle Zykluszahl, nach der sich die gemessene Fluoreszenzintensität zum ersten Mal von der Hintergrundstrahlung abhebt. Diesen Punkt, an dem die PCR-Reaktion die logarithmische Phase erreicht, nennt man *crossing point* (cp) und kann nach Ende der PCR manuell durch die Baseline (Abb. a) und c), grüne Linie) korrigiert werden.

a)  $\beta$ -Aktin

Amplifikation

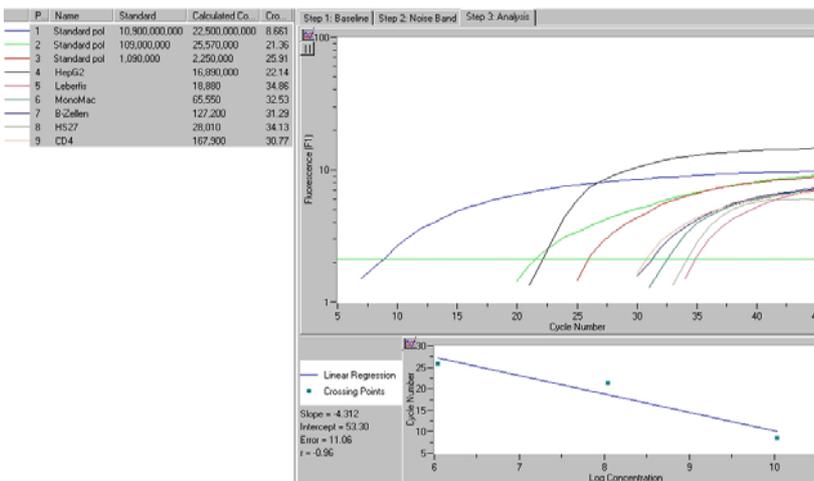


b) Schmelzkurvenanalyse

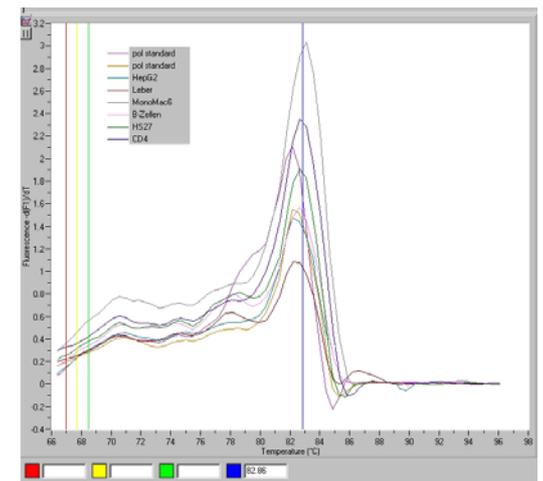


c) HERV-K(C4)-pol

Amplifikation



d) Schmelzkurvenanalyse



**Abb. 3.9:** Quantitativer Nachweis von  $\beta$ -Aktin und HERV-K(C4)-pol-spezifischen RNA-Transkripten in verschiedenen humanen Zelllinien am Beispiel einer durchgeführten Real-Time RT-PCR im Light-Cycler. a ) und c) Quantitative Amplifikation der cDNAs aus den Zelllinien HepG2, Leberfibroblasten, MonoMac6, B-Zellen, HS27 und CD4+ T-Zellen sowie drei bekannter Standardkonzentrationen. Die Amplifikationskurven der spezifischen Fragmente a)  $\beta$ -Aktin und b) pol ergeben sich aus der zunehmenden Fluoreszenzintensität pro Zyklus, die proportional zu der Produktzunahme in jeder Probe ist. Die Baseline (waagrechte grüne Linie) markiert den crossing point, an dem sich die gemessene Fluoreszenz zum ersten Mal vom Hintergrund abhebt und sich die Produktzunahme in der logarithmischen Phase befindet. Die Standardkurve wird in Form einer linearen Regression dargestellt, in der die crossing points gegen die Zykluszahl und logarithmische Konzentration aufgetragen sind (Calculated Concentration). b) und d) Im Anschluß an jeden PCR Lauf erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produktes.

Die Unterschiede in der Templatekonzentration der verschiedenen RNA-Proben ergeben sich entsprechend aus den Abständen ihrer *crossing points* und können aufgrund der mitgeführten Standards direkt quantifiziert werden. Im Anschluß an die letzte Elongationsphase der PCR

wurde jeweils eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produkts durchgeführt (Abb. 3.9 c) und d)). Wie Abb. 3.9 b) und d) zeigen, lag der Schmelzpunkt für das  $\beta$ -Aktin-RT-PCR-Produkt bei 90°C und für das pol-RT-PCR-Produkt bei 83 °C. Die PCR-Produkte wurden zusätzlich gelelektrophoretisch in einem 1,5%igen Agarosegel auf ihre Länge kontrolliert (siehe Abb. 3.3).

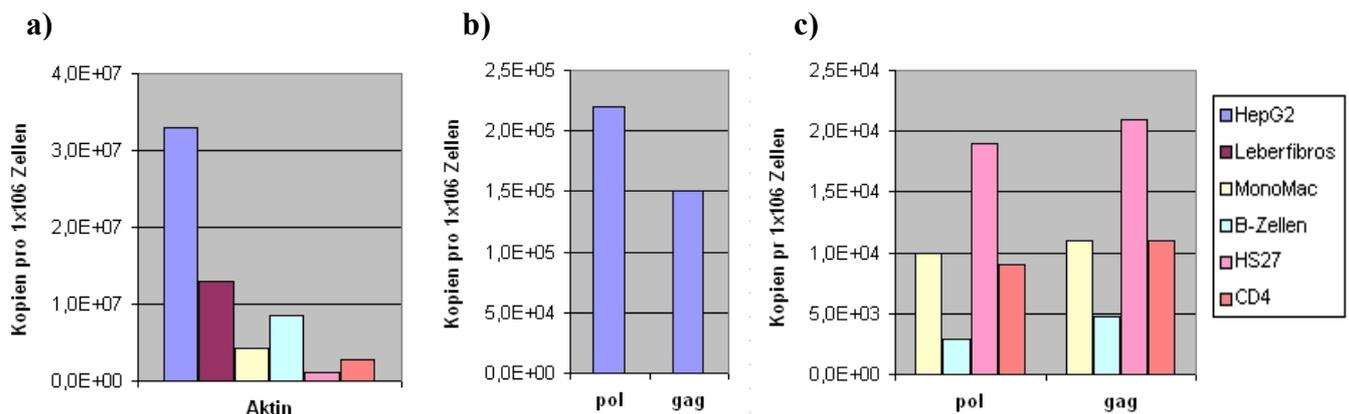
In Tabelle 3.1 ist die ermittelte Kopienanzahl von HERV-K(C4)-spezifischen Antisense Transkripten pro  $1 \times 10^6$  HepG2-, MonoMac6-, HS27, CD4<sup>+</sup> T-, Leberfibroblasten- und B-Zellen zusammengefasst dargestellt. Die Transkriptionsrate von HERV-K(C4) wurde für jede Zelllinie durch Amplifikation der retroviralen Fragmente pol und gag aus insgesamt zehn unabhängig isolierten mRNA-Proben ermittelt. Zusätzlich wurde pro cDNA-Template eine Zweifachmessung durchgeführt. Da die mRNA mittels Oligo(dT)-Primern umgeschrieben wurde, konnte für jedes cDNA-Template parallel und in unabhängigen Versuchsansätzen die Kopienanzahl von  $\beta$ -Aktin bestimmt werden.

**Tabelle 3.1:** Quantitative Bestimmung der Kopienanzahl von HERV-K(C4)-spezifischen RNA-Transkripten in humanen Zelllinien mittels Real-Time RT-PCR

<b>Zelllinie</b>	<b>gag RNA</b>	<b>pol RNA</b>	<b><math>\beta</math>-Aktin RNA</b>
HepG2	$1.5 \times 10^{5*}$	$2.2 \times 10^{5*}$	$3.3 \times 10^{7*}$
Leberfibroblasten	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	$1.3 \times 10^{7*}$
Mono Mac 6	$1.1 \times 10^{4*}$	$1.0 \times 10^{4*}$	$4.3 \times 10^{6*}$
B-Zellen	$4.7 \times 10^{3*}$	$2.9 \times 10^{3*}$	$8.6 \times 10^{6*}$
HS 27	$2.1 \times 10^{4*}$	$1.9 \times 10^{4*}$	$1.2 \times 10^{6*}$
CD4 <sup>+</sup> T Zellen	$1.1 \times 10^{4*}$	$9.0 \times 10^{3*}$	$2.7 \times 10^{6*}$

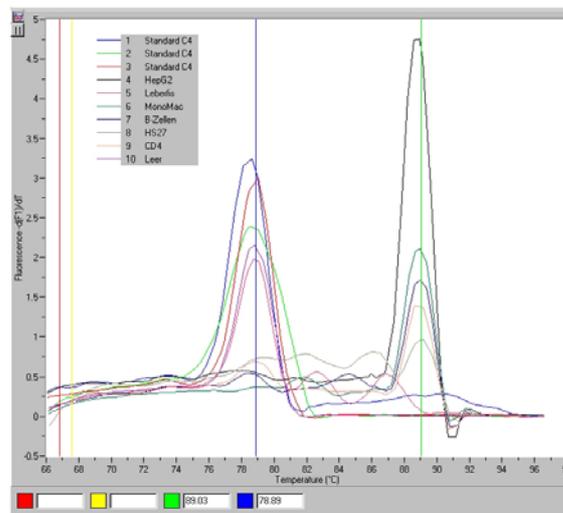
\*Kopien pro  $1 \times 10^6$  Zellen, <sup>a</sup> n.d. nicht detektiert

Wie Tabelle 3.1 zeigt, konnte in der HepG2-Zelllinie eine Kopienanzahl von HERV-K(C4)-spezifischen RNA-Transkripten im Bereich von  $1,5 \times 10^5$  (gag) bis  $2,2 \times 10^5$  (pol), in der Mono Mac6 Zelllinie von ca.  $1,0 \times 10^4$ , in der HS27-Zelllinie von ca.  $2 \times 10^4$ , in der CD4<sup>+</sup>-T-Zelllinie von ca.  $1 \times 10^4$  und in der B-Zelllinie im Bereich von  $2,9 \times 10^4$  bis  $4,7 \times 10^3$  ermittelt werden. In der Leberfibroblasten-Zelllinie konnten hingegen keine HERV-K(C4)-spezifischen RNA-Transkripte nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Transkriptionsrate von HERV-K(C4) mit der des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin zeigt, daß diese in allen Zelllinien um eine Kopienanzahl von durchschnittlich  $10^2$  niedriger liegt.



**Abb. 3.10:** Graphische Darstellung der detektierten Anzahl von  $\beta$ -Aktin-, HERV-K(C4)-pol und -gag Kopien in  $1 \times 10^6$  humanen Zellen. a) Anzahl von  $\beta$ -Aktin Kopien in  $1 \times 10^6$  HepG2-, Leberfibroblasten-, MonoMac6-, HS27-,  $CD4^+$  T- und B-Zellen. b) Anzahl von HERV-K(C4)-pol und -gag Kopien in  $1 \times 10^6$  HepG2-Zellen, c) Leberfibroblasten-, MonoMac6-, HS27-,  $CD4^+$  T- und B-Zellen.

In Abb. 3.10 sind die ermittelten Kopienanzahlen der Fragmente  $\beta$ -Aktin, pol und gag pro  $1 \times 10^6$  Zellen zum besseren Vergleich graphisch dargestellt. Die Expressionsrate von  $\beta$ -Aktin sowie HERV-K(C4) war in der HepG2-Zelllinie mit einer Kopienanzahl von  $3,3 \times 10^7$  ( $\beta$ -Aktin, Abb. 3.10 a) und  $2,2 \times 10^5$  (pol, Abb. 3.10 b) im Vergleich zu den anderen getesteten Zelllinien am höchsten. Wie Abb. 3.10 b) und c) ebenfalls zeigen, konnte in der HepG2-Zelllinie in Bezug auf die Transkriptionsrate der HERV-K(C4)-Fragmente gag und pol eine um das 1,47 fache höhere Anzahl von pol-Fragmenten und in den Zelllinien MonoMac6, HS27  $CD4^+$  T- und B-Zellen eine um das 1.1 bis 1,6 fache höhere Anzahl von gag-Fragmenten (Abb. 3.10 c) detektiert werden. Ein Vergleich der HERV-K(C4)-Expression in den MonoMac6-, HS27-,  $CD4^+$  T- und B-Zellen zeigt deutlich, daß das Verhältnis zwischen der ermittelten Kopienanzahlen von gag und pol korrelierte. Wie aus Tabelle 3.1 und Abb. 3.11 hervorgeht, konnte die Expression des C4-Gens sowie des HERV-K(C4)-env-Fragments nicht quantitativ bestimmt werden. Bei der im Anschluß an die Amplifikation des env-Fragments durchgeführten Schmelzkurvenanalyse konnten ausschließlich Primerdimere in den cDNA-Proben der Zelllinien detektiert werden, die aufgrund eines charakteristisch niedrigeren Schmelzpunktes von dem spezifischen Amplifikationsprodukt des mitgeführten Standards zu unterscheiden waren. Wie Abb. 3.11 zeigt, ergab sich ein umgekehrtes Bild bei der Schmelzkurvenanalyse der C4-RT-PCR-Produkte. Es konnten zwar spezifische C4-Amplifikate mit einem Schmelzpunkt von  $89^\circ\text{C}$  in den cDNA-Proben der HepG2, MonoMac6, HS27,  $CD4^+$  T- und B-Zelllinie detektiert werden, jedoch nicht in den DNA-Proben der mitgeführten Standards mit bekannter Ausgangskonzentration sowie in der cDNA-Probe der Leberfibroblasten-Zelllinie.



**Abb. 3.11:** Schmelzkurvenanalyse der mittels Real-Time PCR amplifizierten C4-Produkte. Die Schmelzkurven mit einer  $T_m$  von  $79^\circ\text{C}$  stellen Primerdimere dar, die sich durch ihren charakteristisch niedrigeren Schmelzpunkt von den spezifischen C4-Amplifikaten mit einer  $T_m$  von  $89^\circ\text{C}$  unterscheiden lassen.

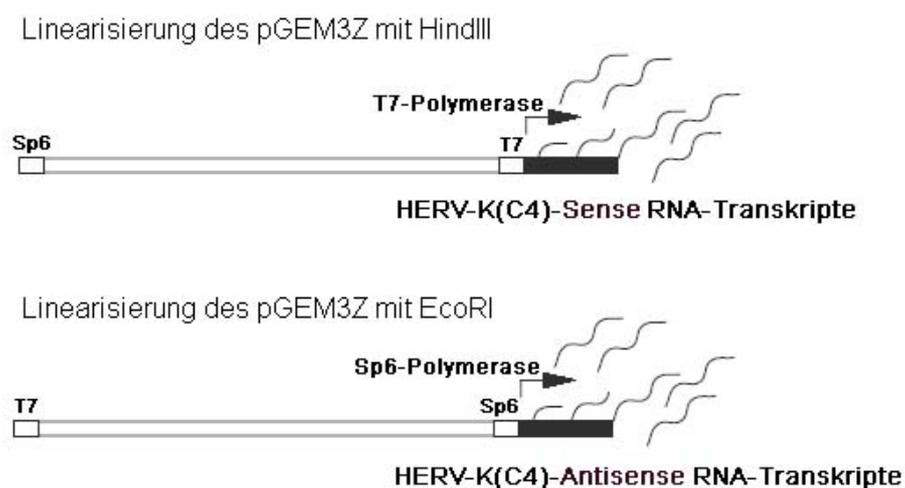
Da die Standards auch in weiteren Versuchsreihen nur Primerdimere mit einem Schmelzpunkt ( $T_m$ ) von  $79^\circ\text{C}$  aufwiesen, war eine Quantifizierung der Ausgangskonzentration der cDNA Proben der Zelllinien nicht möglich. Die Quantifizierung der C4- sowie der HERV-K(C4)-Expression wurde in der von mir betreuten Diplomarbeit von Beißmann (2004) unter Verwendung von RNA-Standards wiederholt und ist unter 4.2 näher beschrieben.

### 3.1.2 Detektion von HERV-K(C4)-spezifischer Antisense mRNA mittels RNase Protection Assays

Um die unter 3.1.1 mittels RT-PCR nachgewiesenen und quantifizierten HERV-K(C4)-Antisense Transkripte in den verschiedenen humanen Zelllinien auf ihre Spezifität zu prüfen, wurden RNase Protection Assays etabliert. Im Rahmen der RT-PCR Untersuchungen in dieser Arbeit konnte bisher nur für die B-Zelllinie ID-Nr. 47, die nicht die HERV-K(C4)-Insertion in der genomischen Sequenz aufweist, eine unspezifische Bindung der verwendeten Primer an homologe Sequenzen anderer HERVs ausgeschlossen werden. Das Vorhandensein homologer Transkripte anderer HERV-Familien zum HERV-K(C4)-Provirus sollte nunmehr für die Gesamt-RNA aus den unter 3.1.1 getesteten humanen Zelllinien HepG2, Leberfibroblasten, Mono-Mac6 und B-Zellen untersucht werden. Da diese Zelllinien aus verschiedenen humanen Geweben und Individuen etabliert wurden, unterscheiden sich diese in der Expression ihrer zellulären Gene.

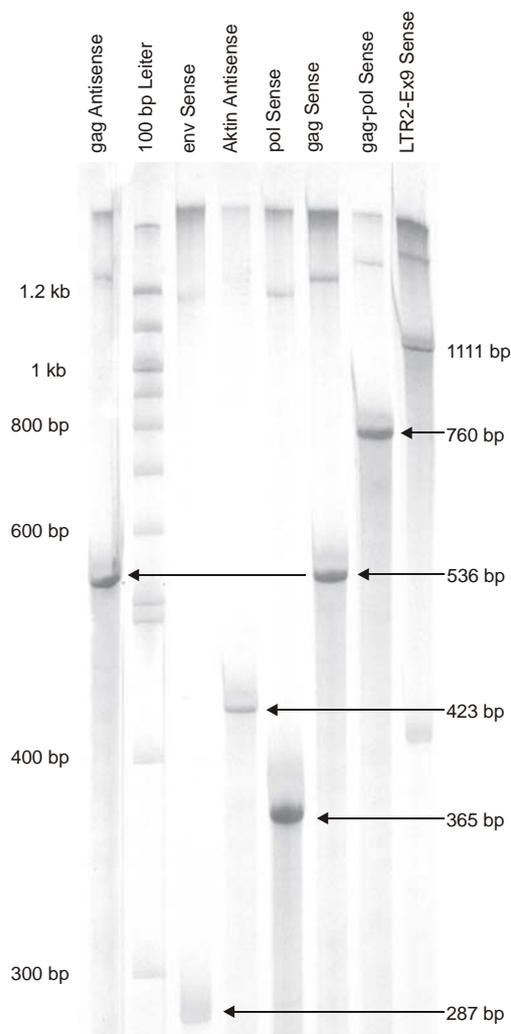
### 3.1.2.1 Herstellung von HERV-K(C4)-spezifischen Sense und Antisense RNA-Sonden

Die RNase Protection Assays wurden mit radioaktiv markierten RNA-Sonden durchgeführt, die in der Sequenz offenen Leserastern aus den retroviralen HERV-K(C4) Genen gag, pol, env sowie dem C4/HERV Intermediat Exon9/LTR2 in beiden Orientierungen komplementär sind. Hierzu wurden Fragmente von gag, pol, env und Exon9/LTR2 mittels PCR und unter Verwendung der sequenzspezifischen Primerpaare gag-EcoRI 5'/-HindIII 3', pol-EcoRI 5'/-HindIII 3', env-EcoRI 5'/-HindIII 3' sowie Exon9-HindIII 5'/LTR2-EcoRI 3' aus dem C4A91 Klon generiert. Nach Doppelrestriktion mit den Enzymen HindIII und EcoRI wurden diese in der retroviralen Sense Orientierung, (d.h. in Bezug auf die ursprüngliche Transkriptionsrichtung von HERV-K(C4)) relativ zu der codierenden Sequenz des pGEM3Z-Vektors in die MCS gerichtet kloniert, die von zwei Promotorbindestellen für die T7 RNA-Polymerase und Sp6 RNA-Polymerase flankiert wird (siehe 2.2.5). Als Expressionskontrolle wurden cDNA-Fragmente des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin und des C4-Gens in Antisense ( $\beta$ -Aktin) und Sense (C4) Orientierung auf gleiche Weise in den pGEM3Z-Vektor kloniert. Die Orientierung der synthetisierten RNA-Transkripte war abhängig von der verwendeten RNA-Polymerase. Zur Synthese von run-off-RNA-Transkripten, die nur die Insert-Sequenz enthalten, wurden die Plasmidkonstrukte mit EcoRI oder HindIII linearisiert und anschließend die entsprechende RNA-Polymerase in die in-vitro Transkription eingesetzt.



**Abb. 3.12:** Schematische Darstellung der RNA-Sondenherstellung für die RNase Protection Assays. Zur Synthese von run-off RNA-Transkripten wurden die verwendeten Plasmidkonstrukte HERV-K(C4)-pGEM3Z mit dem Restriktionsenzym HindIII oder EcoRI linearisiert. Die T7 RNA-Polymerase wurde zur Synthese von HERV-K(C4)-Sense Transkripten und die Sp6 RNA-Polymerase von HERV-K(C4)-Antisense-Transkripten eingesetzt.

Die Herstellung von run-off-Transkripten ist von Vorteil, da eine mögliche komplementäre Bindung von Vektorsequenz mit homologen Sequenzen zellulärer RNA während der Hybridisierungsreaktion ausgeschlossen werden kann. Zudem wird die Ausbeute an spezifischer SONDENSEQUENZ während der in-vitro-Transkription erhöht. Die T7-Polymerase wurde zur Synthese von HERV-K(C4)-Sense, C4-Sense und  $\beta$ -Aktin-Antisense RNA-Transkripten und die Sp6-Polymerase zur Synthese von HERV-K(C4)-Antisense, C4-Antisense und  $\beta$ -Aktin-Sense Transkripten eingesetzt. In Abb. 3.12 ist die Synthese von HERV-K(C4)-Sense und Antisense RNA-Sonden, die in den RNase Protection Assays verwendet wurden, schematisch dargestellt. Die RNA-Sonden wurden zunächst unmarkiert auf ihre Länge hin in einem denaturierenden 6%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Silbernitratfärbung sichtbar gemacht (siehe 2.2.5.5 und 2.2.6.7).

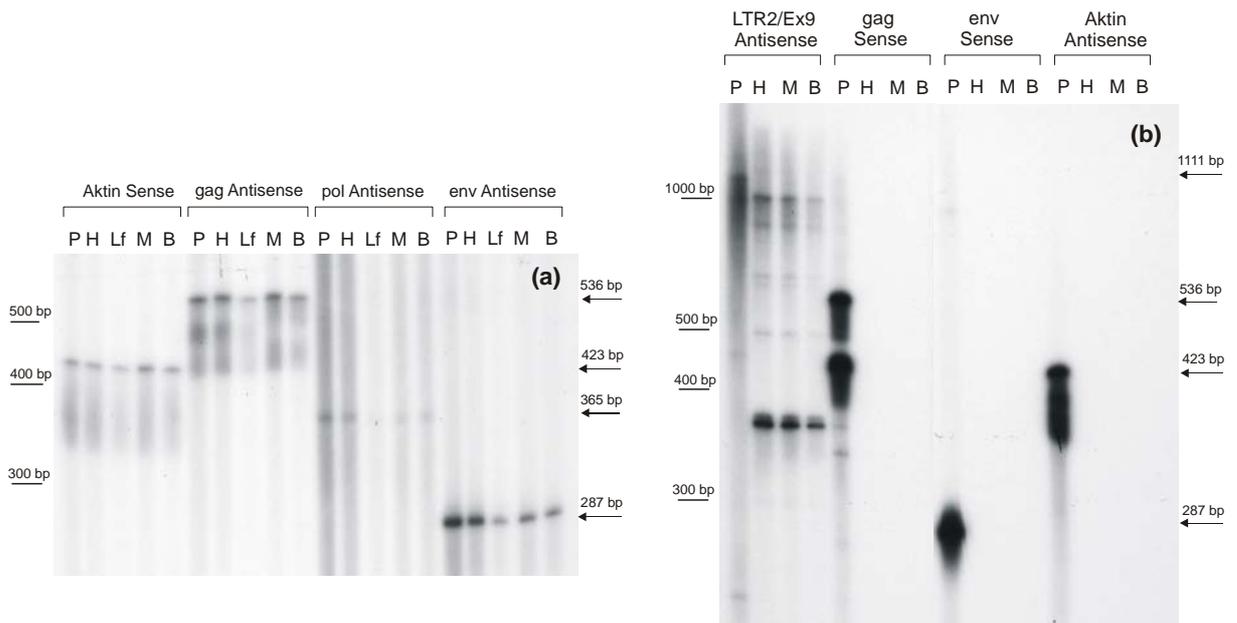


**Abb.3.13:** Gelelektrophoretische Auftrennung der mittels T7- und Sp6-Polymerase synthetisierten RNA-Transkripte in einem 6%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel (Erklärung siehe Text).

Wie Abb. 3.13 zeigt, konnten die mittels T7-Polymerase in-vitro synthetisierten HERV-K(C4)-RNA-Sonden in der Sense Orientierung mit spezifischer Länge von 536 bp (gag), 365 bp (pol), 287 bp (env) und 1111 bp (LTR2-Exon9) sowie  $\beta$ -Aktin in der Antisense Orientierung mit einer Länge von 423 bp sichtbar gemacht werden. Die komplementären RNA-Transkripte wiesen aufgrund der identischen DNA-Consensussequenz jeweils die gleiche Länge auf, was der direkte Vergleich der Sp6/gag-Antisense Sonde mit der T7/gag-Sense Sonde in Abb. 3.13 beweist. Das ebenfalls auf dem Gel zu sehende T7/RNA-Transkript, welches Sequenzen der gag- sowie der pol-Region enthält, wurde in den anschließend durchgeführten RNase Protection Assays nicht verwendet. Weiterhin konnten keine C4-spezifischen T7- oder Sp6-RNA-Transkripte synthetisiert werden. Eine mögliche Ursache dafür könnten Terminationssignale innerhalb der Sequenz des C4-Fragments gewesen sein, die zu einer Abbruchreaktion während der Synthese geführt haben.

### 3.1.2.2 Autoradiografischer Nachweis von HERV-K(C4)-spezifischer Antisense RNA

Für die RNase Protection Assays wurden  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-markierte gag-, pol-, env- und Exon9-LTR2 RNA-Sonden in der Sense (in Bezug auf die ursprüngliche Transkriptionsrichtung des HERV-K(C4) Provirus) und Antisense Orientierung (in Bezug auf die Transkriptionsrichtung des C4-Gens) mittels T7- und Sp6-Polymerase synthetisiert (siehe 2.2.6.1), welche in der Sequenzabfolge exakt komplementär zu der analysierenden HERV-K(C4)-RNA waren (siehe Abb. 3.11). Die  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-markierten Sense und Antisense RNA-Sonden wurden in unabhängigen Versuchsansätzen zusammen mit der Gesamt-RNA aus der HepG2-, Leberfibroblasten-, MonoMac6 und B-Zelllinie inkubiert und nach Hybridisierung mit Ribonuklease behandelt. Durch die RNase-Aktivität werden unspezifische Hybridisierungen mit RNA-Transkripten, die mit der spezifischen Sonde nur partiell komplementär sind und somit Fehlbasenpaarungen aufweisen, für die RNasen zugänglich und zusammen mit der einzelsträngigen nicht hybridisierten RNA verdaut, während die mit der Ziel-RNA hybridisierte markierte Sonde geschützt bleibt. Als positive Kontrolle wurden in parallelen Ansätzen  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-markierte Sp6/Sense- (in Bezug auf die codierende DNA-Sequenz) und T7/Antisense- $\beta$ -Aktin Sonden eingesetzt. Die RNase Protection Assay Produkte wurden in denaturierenden 6%igen Harnstoff-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, und die Auswertung erfolgte anschließend mittels Autoradiografie.



**Abb. 3.14:** Autoradiographische Auswertung der RNase Protection Assay Produkte, die in einem denaturierenden 6%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe der einzelsträngigen komplementären  $\alpha^{[32}\text{P}]$ -markierten-Sonden (P) auf ihre Länge kontrolliert wurden. a) Nachweis von gag-, pol- und env- Antisense RNA-Transkripten,  $\beta$ -Aktin Sense RNA-Transkripten und b) LTR2/Exon9 Antisense RNA-Transkripten in der Gesamt-RNA aus HepG2- (H), Leberfibroblasten- (Lf), MonoMac6- (M) und B-Zellen (B).

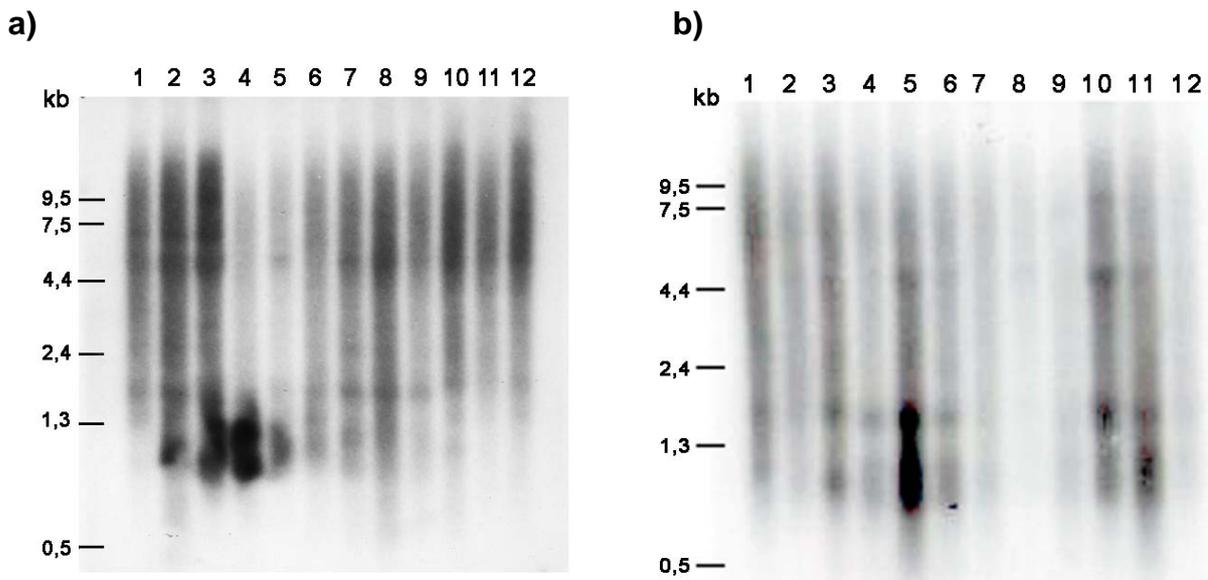
In Abb. 3.14 sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten RNase Protection Assay Produkte nach Autoradiografie dargestellt. Die RNase Protection Assay Produkte wurden jeweils mit Hilfe der für die Hybridisierung eingesetzten, komplementären einzelsträngigen  $\alpha^{[32}\text{P}]$ -markierten-Sonden (Spur P) auf ihre Länge kontrolliert. Der ebenfalls im Gel aufgetrennte  $\alpha^{[32}\text{P}]$ -markierte Längenstandard konnte nicht mit den Produkten ausgewertet werden, da die Signalstärken bzw. Expositionszeiten unterschiedlich waren. Die Gelspur des Längenstandards wurde daher getrennt exponiert oder mittels Silbernitratfärbung sichtbar gemacht und die Größenverhältnisse im Anschluß übertragen. Wie Abb. 3.14 a) zeigt, konnten HERV-K(C4)-Antisense Transkripte den komplementären  $\alpha^{[32}\text{P}]$ -markierten Sonden gag (536 bp), pol (365 bp) und env (287 bp) entsprechend in spezifischer Länge in den Zelllinien HepG2 (Spur H), Leberfibroblasten (Spur Lf), MonoMac6 (Spur M) und B-Zellen (Spur B) mit unterschiedlicher Signalstärke nachgewiesen werden. Durch die autoradiografische Auswertung der RNase Protection Assays konnten die Untersuchungen zum Nachweis von HERV-K(C4)-spezifischen Transkripten in den nebeneinander aufgetragenen Zelllinien gleichzeitig quantitativ analysiert und verglichen werden, da die spezifische Aktivität der radioaktiven  $\alpha^{[32}\text{P}]$ -Strahlung der Menge an detektierten RNase Protection Assay Produkt entspricht und somit ein Maß für die Anzahl an HERV-K(C4)-

spezifischen Antisense RNA-Transkripten ist. Wie Abb. 3.14 a) zeigt, konnte in der HepG2-Zelllinie das stärkste Signal und somit die höchste Anzahl an HERV-K(C4)-Antisense Transkripten mittels der drei in die Assays eingesetzten retroviralen RNA-Sense Sonden gag, pol und env detektiert werden. Im Vergleich dazu war die Anzahl an detektierten HERV-K(C4)-Antisense Transkripten in den Leberfibroblastenzellen am geringsten. Die  $\alpha[^{32}\text{P}]$ -markierte pol-Sense Sonde (Spur P, pol Antisense) wies nur eine geringe spezifische Aktivität auf, wodurch die Aktivität der entsprechenden spezifischen Produkte ebenfalls gering ausfiel. Als Positivkontrolle wurde die Expression des zellulären  $\beta$ -Aktin-Gens parallel mittels der  $\alpha[^{32}\text{P}]$ -markierten  $\beta$ -Aktin-Antisense Sonden untersucht und entsprechende RNase Protection Assay Produkte mit der erwarteten Länge von 432 bp in den getesteten Zelllinien detektiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der mittels der radioaktiven  $\alpha[^{32}\text{P}]$ -markierten LTR2/Exon9-spezifischen-Sense Sonde detektierten C4-Sense/HERV-K(C4)-Antisense Intermediate in der HepG2, MonoMac6 und B-Zelllinie in Abb. 3.14 b) zeigt, daß mehrere komplementäre RNA-Transkripte unterschiedlicher Länge detektiert werden konnten. Anhand der in Spur P als Längenvergleich aufgetrennten Sonde ist zu sehen, daß keine Exon9-Sense/LTR2-Antisense Transkripte mit spezifischer Länge von 1111 bp detektiert werden konnten. Weiterhin konnten zwei mit der Sonde hybridisierte Exon9-Sense/LTR2-Antisense RNA-Transkripte aufgrund der starken  $\alpha[^{32}\text{P}]$  Markierungsintensität der Produkte mit Sonden-unspezifischer Länge von ca. 1000 bp und 360 bp, sowie zwei weitere schwacher Intensität mit einer Länge von ca. 900 bp, 600 bp und 480 bp nachgewiesen werden. Die in Spur P aufgetragene LTR2-Sense/Exon9-Antisense Sonde wies jedoch ebenfalls die unspezifischen Transkripte mit einer Länge von 1000 bp neben der spezifischen auf. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß mehrere LTR2-Sense/Exon9-Antisense Transkripte gleicher Consensussequenz, jedoch unterschiedlicher Größe und Anzahl nebeneinander in den drei getesteten Zelllinien HepG2, MonoMac6 und B-Zellen vorkommen, was auf eine posttranskriptionale Prozessierung von HERV-K(C4)-Antisense RNA-Transkripten in dem Sequenzabschnitt Exon9-Sense/LTR2-Antisense schließen läßt. Zum Nachweis von HERV-K(C4)-Sense Transkripten in humanen Zelllinien wurden die radioaktiv  $\alpha[^{32}\text{P}]$ -markierten gag-Antisense und env-Antisense RNA-Sonden in den RNase Protection Assay eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich in einem unabhängigen Versuchsansatz die  $\alpha[^{32}\text{P}]$ -markierte Aktin-Sense RNA-Sonde mit der Gesamt-RNA der Zelllinien in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt, um die im Anschluß durchgeführte RNase Reaktion auf den vollständigen Verdau einzelsträngiger, nicht hybridisierter  $\alpha[^{32}\text{P}]$ -markierter Sonde zu

überprüfen, die ansonsten die Ergebnisse verfälschen könnten. Wie Abb. 3.14 zeigt, konnten keine HERV-K(C4)-gag-Sense und pol-Sense RNA-Transkripte mit einer Länge von 536 bp (gag) und 365 bp (pol) im Vergleich zu der in Spur P aufgetrennten Sonde detektiert werden. Ebenfalls konnten keine  $\beta$ -Aktin-Antisense Transkripte nachgewiesen werden sowie Rückstände von unverdauter einzelsträngiger  $\alpha$ [ $^{32}\text{P}$ ]-markierter Sonde.

### 3.1.3 Northern-Blot Analyse

Um die Gesamtlänge der nachgewiesenen HERV-K(C4)-Antisense mRNA bestimmen zu können, wurde die Northern-Blot Analyse angewendet. In den unter 3.1.1 und 3.1.2 beschriebenen Untersuchungen wurden ausschließlich einzelne Fragmente der HERV-K(C4)-RNA mittels RT-PCR und RNase Protection Assays detektiert und analysiert. Die Northern-Blot Analyse sollte klären, ob die nachgewiesenen Fragmente auf ein einzelnes, der genomischen Gesamtlänge von ca. 6,4 kb entsprechendes HERV-K(C4)-Antisense Transkript zurückzuführen ist oder sogar HERV-K(C4)-RNA Transkripte unterschiedlicher Größe nebeneinander existieren. Hierzu wurde der *Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN<sup>TM</sup>) Blot* von BD Biosciences verwendet, der die gelelektrophoretisch aufgetrennte und anschließend auf einer Nylon Membran fixierte poly(A<sup>+</sup>)-mRNA aus 12 verschiedenen humanen Geweben und Zellen enthält. Um die gesuchte HERV-K(C4)-Antisense mRNA in Form einer Bande auf dem Blot detektieren zu können, wurden die unter 3.1.2 beschriebenen  $\alpha$ [ $^{32}\text{P}$ ]-markierten env-Sense und pol-Sense RNA-Sonden in unabhängige Hybridisierungsreaktionen eingesetzt und nach stringentem Waschen mittels Autoradiografie sichtbar gemacht. Abb. 3.15 zeigt die Northern-Blot Analyse (horizontal gespiegelt) von poly(A<sup>+</sup>)-mRNA verschiedener humaner Gewebe mit den env- (a) und pol-RNA-Fragmenten (b) als Sonde. Die Spuren 1-12 entsprechen der poly(A<sup>+</sup>)-mRNA aus: peripheren Blutleukozyten (1), Lunge (2), Plazenta (3), Dünndarm (4), Leber (5), Niere (6), Milz (7), Thymus (8), Dickdarm (9), Skelettmuskel (10), Herz (11) und Gehirn (12). Die Länge der mRNA-Transkripte, die durch Hybridisierung mit der  $\alpha$ [ $^{32}\text{P}$ ]-markierten env-Sense und pol-Sense RNA-Sonde in Form einer Bande auf dem Blot sichtbar wurden, konnten mit Hilfe des markierten Längenstandards bestimmt werden. Abb. 3.15 zeigt, daß drei bis vier Banden in den Spuren der jeweils als positiv gestesteten Gewebe auf dem Blot zu erkennen sind, die mRNA-Transkripten entsprechen, welche komplementäre Sequenzen zu dem retroviralen HERV-K(C4)-env- (a) bzw. pol-Gen (b) enthalten.



**Abb. 3.15:** Autoradiographische Auswertung der Northern-Blot Analyse unter Verwendung der a) env-Sense und pol-Sense RNA-Sonde. Der Blot enthält die poly(A<sup>+</sup>)-mRNA aus 12 Geweben und Zelllinien: periphere Blutleukozyten (1), Lunge (2), Plazenta (3), Dünndarm (4), Leber (5), Niere (6), Milz (7), Thymus (8), Dickdarm (9), Skelettmuskel (10), Herz (11) und Gehirn (12). Die mit der poly(A<sup>+</sup>)-mRNA jeder Spur hybridisierte Sonde wurde mittels Autoradiografie sichtbar gemacht und mit dem vorgegebenen Längenstandard verglichen.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei einigen der detektierten Banden um Kreuzreaktionen bzw. unspezifische Bindungen der Sonde an homologe RNA-Sequenzen verwandter HERV-K-Familien handelt, die trotz stringentem Waschen nicht entfernt werden konnten. Wie Abb. 3.15 a) zeigt, konnten prominente Signale für mRNA-Transkripte mit einer Länge von ca. 1 bis 1,3 kb in der Lunge (2), Plazenta (3), Dünndarm (4) detektiert werden, sowie schwächere Signale in der Leber (5), Niere (6) und in der Milz (7). Weiterhin wurden schwache Signale entsprechend RNA-Transkripten mit einer Länge von ca. 2 kb in peripheren Blutleukozyten (1), Lunge (2), Plazenta (3), Niere (6) Milz (7), Thymus (8) und Dickdarm (9), sowie mit einer Länge von ca. 5 kb in peripheren Blutleukozyten (1), Lunge (2), Plazenta (3), Leber (5), Milz (7), Thymus (8), Skelettmuskel (10) und Gehirn (12) auf dem Blot sichtbar. In den peripheren Blutleukozyten (1), Lunge (2) und Plazenta (3) konnte zudem mit Hilfe der env-Sense Sonde die Expression eines weiteren Transkripts mit einer Länge von ca. 6,8 kb nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigt Abb. 3.15 b), daß bei einer Hybridisierung mit der  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-markierten pol-Sense Sonde ebenfalls 2 bis 3 Banden auf dem Blot zu sehen sind, die in der Länge mit denen in Abb. 3.15 a) übereinstimmen. Es konnten deutlich starke Signale entsprechend mRNA-Transkripten mit einer Länge von ca. 1 kb und ca. 2 kb in der Leber (5), Skelettmuskel (10) und Herz (11) nachgewiesen werden sowie schwächere Signale in peripheren Blutleukozyten (1), Lunge (2), Plazenta (3),

Dünndarm (4) und Niere (6). In der Spur der Plazenta (3), Leber (5), Skelettmuskel (10) und Herz (11) sind zudem mRNA-Transkripte, die komplementäre Sequenzen zu der pol-Sense Sonde einschließen, mit einer Länge von ca. 5 kb vorhanden. Die Ergebnisse zeigen, daß beide Northern-Blot Analysen das gleiche Bandenmuster mit unterschiedlicher Signalstärke in den Geweben aufweisen, was sowohl auf eine Gewebe-spezifische Expression von HERV-K(C4)-Transkripten als auch auf das alternative Spleißen eines Primärtranskriptes schließen läßt.

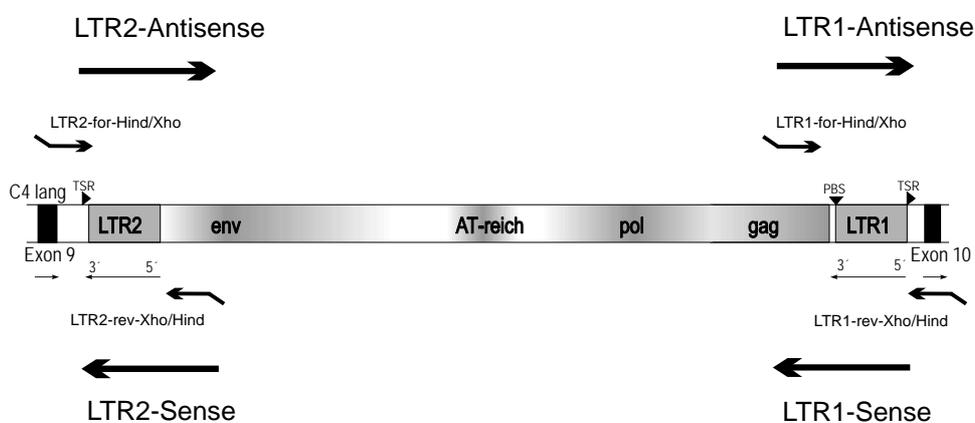
### 3.2 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von HERV-K(C4)

Im Anschluß an die Untersuchungen zur Expression von HERV-K(C4)-Antisense Transkripten in unterschiedlichen humanen Zelllinien und Geweben wurde deren funktionelle Bedeutung im menschlichen Genom analysiert. In diesem Teil der Arbeit werden zuerst die Ergebnisse zur Promotoraktivität der LTRs dokumentiert und anschließend die Ergebnisse der Untersuchung zur Antisense-Inhibierung retroviraler Transkripte.

#### 3.2.1 Ergebnisse zur Promotoraktivität der *Long Terminal Repeats* (LTRs)

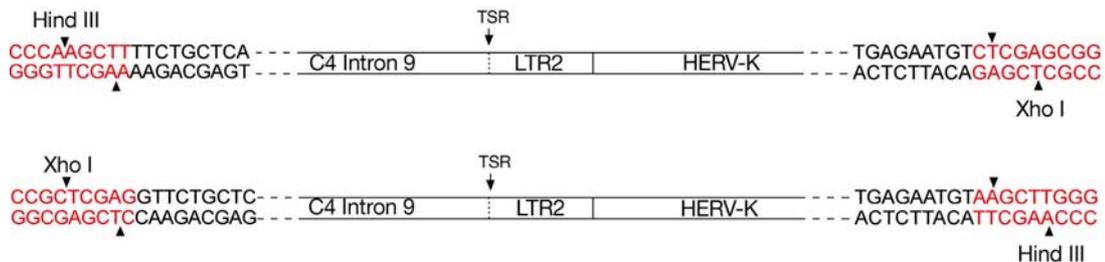
##### 3.2.1.1 Herstellung der LTR-Promotorkonstrukte

Die beiden LTRs (LTR1 und LTR2), welche die retrovirale Insertion HERV-K(C4) im langen Intron 9 flankieren, haben eine Länge von 548 bp bzw. 550 bp (Dangel et al., 1994), und wurden vollständig aus dem bekannten genomischen Lambdaklon A12 (C4A91, inklusive HERV-K (C4)) amplifiziert.



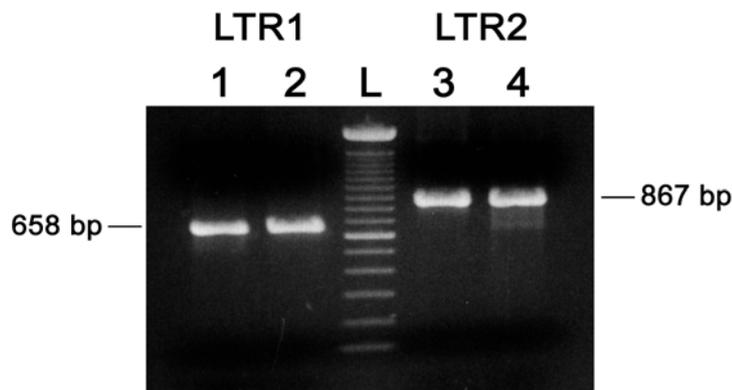
**Abb. 3.16:** Schematische Darstellung der HERV-K(C4)-Insertion im Intron 9. Die Lage der verwendeten Primer in der PCR ist angegeben. Die Pfeile definieren die Orientierung der LTR-Promotorkonstrukte in Bezug auf die Transkriptionsrichtung des C4-Gens (Antisense) sowie des HERV-K-Provirus (Sense).

Um die beiden LTRs gerichtet in einen Reporter-gen-Vektor klonieren zu können, enthielten alle PCR-Primer eine zusätzliche 9 bp Oligonukleotidsequenz am 5'-Ende, die entweder eine XhoI- oder HindIII-Schnittstelle einschloss. Somit wurde jeder LTR mit zwei Primerpaaren amplifiziert, die sich jeweils durch die reversen Schnittstellen unterschieden.



**Abb.3.17:** Schematische Darstellung der LTR2-PCR-Produkte (C4-Orientierung). Die durch die entsprechenden Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen für die Enzyme XhoI und HindIII sind rot unterlegt.

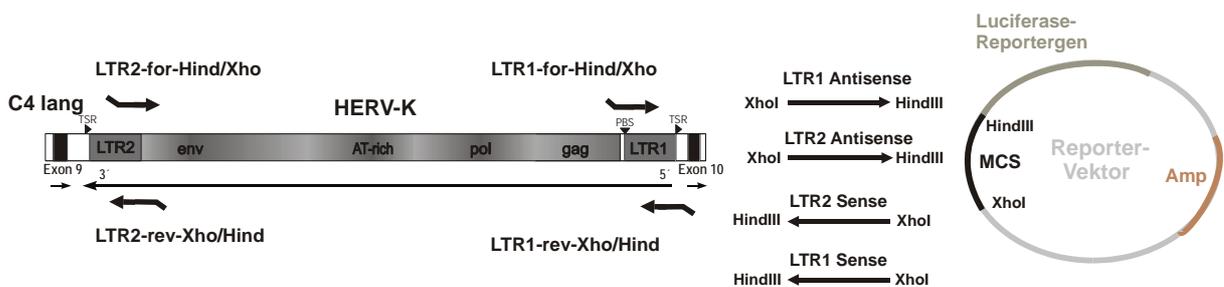
In Abb. 3.17 sind die beiden LTR2-PCR-Produkte in Antisense-Orientierung schematisch dargestellt. Ein analoges Erscheinungsbild ergibt sich für die LTR2-PCR-Produkte. Durch die Lage der für die PCR eingesetzten Primer (Abb. 3.16 und 3.17) enthielten die Amplifikationsprodukte zusätzlich Sequenzen des Introns 9 und der HERV-K-Sequenz. LTR1 enthält am 5'-Ende 68 bp der HERV-K(C4)-Sequenz und am 3'-Ende 24 bp der Intron 9-Sequenz inklusive des TSR (*Target Site Repeat*). Die LTR2-PCR-Produkte enthalten dagegen am 5'-Ende 78 bp der Intron 9-Sequenz inklusive des TSR und am 3'-Ende 221 bp der HERV-K(C4)-Sequenz. Die genannten Sequenzen enthielten jedoch keine Startcodons in einem der drei Leserahmen sowie in beiden Orientierungen, die nicht durch ein Stopcodon wieder aufgelöst worden wären.



**Abb. 3.18:** Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte in einem 1,5%igen Agarosegel, die mit den Primerpaaren LTR1-for-Hind/rev-Xho (1), LTR1-for-Xho/rev-Hind (2), LTR2-for-Hind/rev-Xho (3) und LTR2-for-Xho/rev-Hind (4) amplifiziert wurden. Als Längenstandard (L) wurde eine 100 bp-Leiter aufgetragen.

In Abbildung 3.18 sind die PCR-Produkte (1-4) in einem Agarosegel mit Hilfe einer 100 bp Leiter (Spur L) auf ihre Länge kontrolliert worden. Die beiden LTR1-Produkte sind 658 bp (Spur 1 und 2), die beiden LTR2-Amplifikate hingegen 867 bp (Spur 3 und 4) lang. Dies steht im Einklang mit der Länge der genomischen Sequenz, inklusive der jeweiligen Primersequenz.

Durch Einführung der reversen Schnittstellen an die Enden der LTR-PCR-Produkte ist es möglich, diese nach Restriktion mit den Endonukleasen HindIII und XhoI gerichtet (d.h. in festgelegter Orientierung) in die multiple Klonierungsstelle des pGL3-Enhancer-Vektors zu ligieren (siehe 2.2.5). Die ringförmige DNA des Vektors wurde vor Ligation ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen linearisiert. In Abb. 3.19 ist das Klonierungsexperiment, das unter 2.5 ausführlich beschrieben worden ist, schematisch dargestellt.



**Abb. 3.19:** Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie bzw. der Ligation der vier verschiedenen PCR-Produkte in den p $\beta$ -Gal-Enhancer-Vektor nach Doppelrestriktion mit den Enzymen HindIII und XhoI. Die Orientierung der Inserts nach Ligation in den Vektor ist angegeben.

Vor den anschließenden Transfektionsversuchen wurden die in den pGL3-Enhancer Vektor ligierten LTR-Fragmente auf ihre Sequenz und Orientierung im Vektor überprüft. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit denselben Primern durchgeführt, mit denen die Fragmente für die Ligation generiert worden waren (siehe Tabelle 2.1). Die Orientierung der Inserts im Vektor wurde mit Hilfe von Primern überprüft, die an angrenzende Bereiche der MCS innerhalb der Vektorsequenz binden. Es zeigte sich, daß die beiden LTRs, wie erwartet, in vollständiger Länge und in jeweils reverser (Sense und Antisense) Orientierung in den Vektor einkloniert worden waren (siehe Abb. 3.19).

### **3.2.1.2 Untersuchungen zur generellen Promotoraktivität der HERV-K(C4)-LTRs**

Da die HERV-K(C4) LTRs regulative Promotorelemente enthalten (Abb. 4.5), besteht prinzipiell die Möglichkeit, daß sie die HERV-K(C4)-Transkription unabhängig von der des C4-Gens regulieren oder die Transkription nahegelegener Gene initiieren. Durch in-vitro-Tests sollten grundlegende Erkenntnisse über die Promotoraktivität der beiden LTRs sowie die funktionelle Bedeutung der endogenen retroviralen Insertion HERV-K im C4-Gen des Menschen gewonnen werden. Ziel der nachfolgenden Transfektionsstudien war es, die beiden LTRs mit Hilfe der vier LTR-Luciferase-Konstrukte (siehe 3.2.1.1 und Abb. 3.19) auf ihre Promotoraktivität in jeweils beiden Orientierungen in der HepG2 und COS7-Zelllinie hin zu untersuchen. Die Promotoraktivität der LTRs wurde über die Expression des jeweils nachfolgenden Reportergens und somit über die Aktivität des Enzyms Luciferase bestimmt. Die Menge an umgesetztem Substrat, die sich in einer Lichtreaktion (Lumineszenz) zeigt, entspricht der spezifischen Luciferase-Aktivität und ist ein Maß für die Funktion eines Promotors bzw. hier der LTRs. Eukaryotische Zellen exprimieren keine endogene Luciferase, so daß die beobachtete bzw. gemessene Enzymaktivität für Zellen spezifisch war, die mit dem rekombinanten LTR-Promotor-Konstrukt transfiziert wurden. Da ein Luminometer sehr geringe Mengen an umgesetztem Substrat quantifizieren kann, war der Luciferase-Reportergen-Assay die geeignete Methode, um auch geringe Aktivitäten der LTRs detektieren zu können.

In Vorversuchen wurden die optimalen Transfektionsbedingungen wie z.B. Zelldichte, Länge der Inkubationszeit, Menge an Transfektionsreagenz sowie die Transfektionseffizienz bestimmt, die als Richtlinien für die Experimente mit den LTR-Vektoren dienten (Mack, 2000). Die jeweilige Menge an zu transfizierender Plasmid-DNA, nach deren Transfektion jeweils ausreichende Enzymaktivitäten im linearen Meßbereich detektiert werden konnten, wurde unter Verwendung des Kontrollvektors pGL3-Controll bestimmt, der als regulatives Element einen SV40 Promotor und Enhancer (Promotorelemente des Simian Virus) enthält.

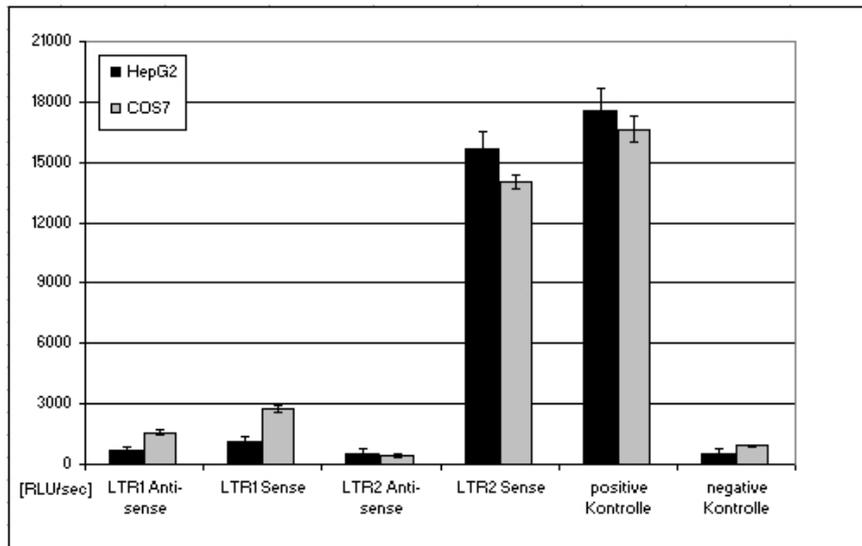
In unabhängigen Versuchsreihen wurden für die LTR-Vektoren

- die Promotoraktivität von LTR1 und LTR2 in beiden Orientierungen über die Expression des Reportergens in der HepG2 und COS7-Zelllinie bestimmt, und somit gleichzeitig eine zelltypspezifische Expression getestet,
- der Einfluß von IFN- $\gamma$  auf die Promotoraktivität der LTRs untersucht.

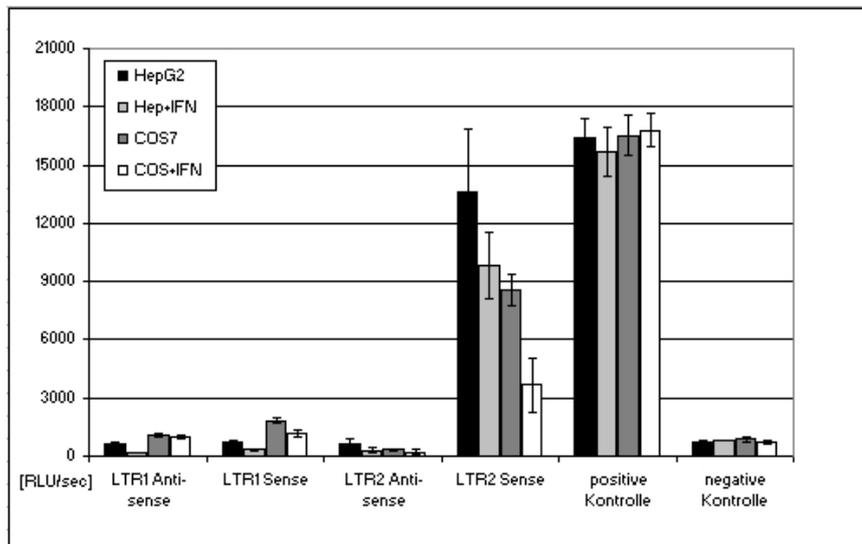
Hierzu wurden  $1 \times 10^5$  logarithmisch wachsende HepG2- und COS7-Zellen (siehe 2.2.8) in unabhängigen Versuchsreihen mit 2  $\mu\text{g}$  jedes der vier LTR-Konstrukte transient transfiziert. Parallel dazu wurden Transfektionen mit derselben Menge an den Kontrollplasmiden pGL3- $\beta$ -Controll (positive Kontrolle) und dem insertlosen pGL3-Enhancer (negative Kontrolle) durchgeführt. Die Gesamtmenge an exprimierten Reportergen eines jeden Ansatzes wurde unter Verwendung des Luciferase-Enzym-Assays im Luminometer nach einer Inkubationszeit von 48 h ermittelt. Die Enzymaktivität der exprimierten Luciferase wurde quantitativ über den Substratumsatz des zugegebenen Luciferins in *Relative Light Units pro sec.* (RLU/sec.) gemessen. Die Menge des umgesetzten Substrats ist proportional zur Menge exprimierter Luciferase und somit indirekt zu der Aktivität des Promotorkonstrukts. Zur quantitativen Analyse wurden die erhaltenen spezifischen Signale auf eine im Experiment konstant bleibende Größe bezogen. Dazu wurde im Anschluß an den Luciferase-Assay der Gesamtproteingehalt in  $\mu\text{g}$  aller Zellen eines Ansatzes photometrisch bestimmt. Da Zytokine eine bedeutende Rolle sowohl bei der Immunantwort als auch bei der Regulation der Genexpression spielen, wurde deren Einfluß auf die Aktivität der HERV-K(C4)-LTRs getestet. Dazu wurden die Zellen nach Transfektion der LTR-Konstrukte in unabhängigen Versuchsansätzen mit 200 U/ml IFN- $\gamma$  oder 100 U/ml IL-6 stimuliert. In Abb. 3.20 sind die Ergebnisse zur Promotoraktivität der HERV-K(C4)-LTRs in beiden Orientierungen von insgesamt drei unabhängigen Transfektionsexperimenten, die ihrerseits drei Versuchsreihen mit jeweils drei parallel durchgeführten Ansätzen umfassen, graphisch dargestellt.

Wie Abb. 3.20 a) zeigt, waren die ermittelten Luciferase-Aktivitäten (RLU/sec.) normalisiert durch den Gesamtproteingehalt sowohl in den unstimulierten HepG2- als auch in der COS7-Zelllinie nach Transfektion mit dem LTR1-Antisense-, LTR1-Sense und LTR2-Antisense Konstrukt im Vergleich zu der positiven Kontrolle sehr niedrig. Die gemessenen Aktivitäten lagen in der HepG2-Zelllinie bei 545 RLU/sec. für LTR2-Antisense, 731 RLU/sec. für LTR1-Antisense, 1116 RLU/sec für LTR1-Sense und in der COS7-Zelllinie bei 439 RLU/sec für LTR2-Antisense, 1588 RLU/sec. für LTR1-Antisense sowie 2766 RLU/sec für LTR1-Sense. In den positiven Kontrollen konnte dagegen eine um das 6 bis 32fache höhere Luciferase-Aktivität von 17599 RLU/sec. in der HepG2-Zelllinie und 16645 RLU/sec. in der COS7-Zelllinie detektiert werden. Ein Vergleich mit den detektierten Hintergrundsignalen in den negativen Kontrollen (517 RLU/sec. in der HepG2-Zelllinie und 945 RLU/sec. in der COS7-Zelllinie) zeigt, daß die Luciferase-Aktivitäten der transfizierten LTR-1-Antisense-, LTR1-Sense- und LTR2-Antisense-Konstrukte nur um ein 0,5 bis 3faches höher lagen.

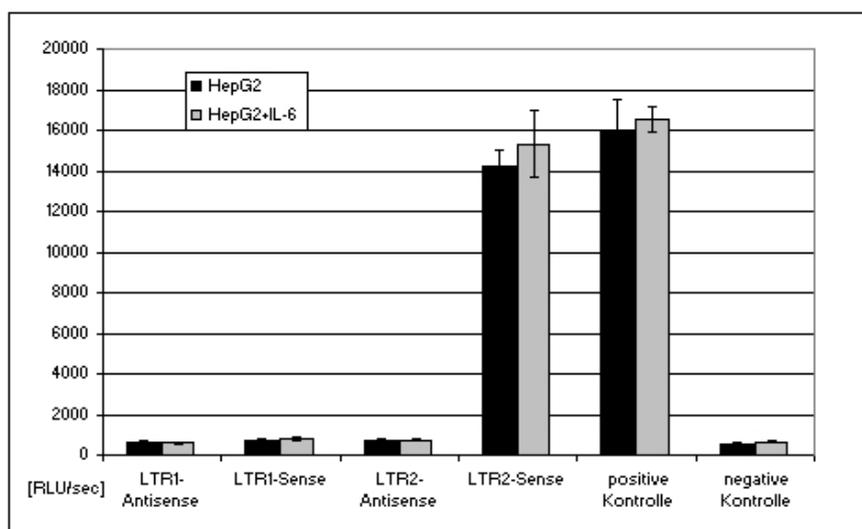
a)



b)



c)



**Abb. 3.20:** Promotoraktivität der HERV-K(C4)-LTRs in HepG2 und COS7-Zellen, die über ein Luciferase-Reportergensystem detektiert wurde. a) Aktivität des LTR1- und LTR2-Promotors in Sense und Antisense Orientierung, b) nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ . c) Aktivität des LTR1 und LTR2 in beiden Orientierungen in HepG2-Zellen nach Stimulation mit IL-6. RLU/sec, *Relativ Light Units pro sec.*

Aufgrund der schwachen Luciferase-Aktivitäten des LTR1-Sense-, LTR1-Antisense- und LTR2-Antisense-Konstrukts in allen durchgeführten Transfektionsversuchen (Abb.3.20 a-c) kann davon ausgegangen werden, daß diese als Promotor funktionell inaktiv sind. Im Gegensatz dazu konnte für das transfizierte LTR2-Sense-Konstrukt sowohl in der HepG2- als auch in der COS7-Zelllinie eine signifikante Luciferase-Aktivität von 15675 RLU/sec. und 16645 RLU/sec. detektiert werden, die nur um ein 1,1faches niedriger lag als in den positiven Kontrollen. Der LTR2-Promotor in der retroviralen Sense Orientierung zeigte somit eine vergleichbar hohe Aktivität wie der starke SV40 Promotor der positiven Kontrollen. Wie Abb. 3.20 b) zeigt, konnte nach Stimulation mit 200 U/ml IFN- $\gamma$  für das LTR2-Sense-Konstrukt eine signifikante Abnahme der Luciferase-Aktivität von 23% der in HepG2-Zelllinie und um 50% in der COS7-Zelllinie nachgewiesen werden, die nicht in den ebenfalls stimulierten Positivkontrollen beobachtet werden konnte. Abb. 3.20 c) zeigt dagegen, daß nach Stimulation der HepG2-Zellen mit IL-6 kein Einfluß auf die Expression des Reportergens und somit auf die transfizierten LTR-Konstrukte detektiert werden konnte. Die ermittelte Luciferase-Aktivität war sowohl für das LTR2-Sense-Konstrukt als auch für die Positivkontrolle um ein 1,1faches höher als in den unstimulierten Zellen. Da sich die Untersuchungen zur Promotoraktivität der HERV-K(C4)-LTRs an den Ergebnissen von Dangel und Kollegen (1994) orientierten, die mit Hilfe eines CAT-Assays lediglich für den LTR2 in der Antisense Orientierung in den Zelllinien WES, HT29, HeLa und Nalm6 eine Aktivität nachweisen konnten, sollte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls die HT29-Zelllinie zum besseren Vergleich der Daten mit den LTR-Luciferase-Konstrukten transfiziert werden. Es zeigte sich, daß mittels der Lipidtransfektion nur eine geringe Transfizierbarkeit der HT29 Zelllinie sowohl mit dem Kontrollplasmid pGL3-Control als auch mit den LTR-Konstrukten erbracht werden konnte. Die ermittelten Luciferase-Aktivitäten lagen unterhalb des linearen Messbereiches und entsprachen den Aktivitäten der Negativkontrollen in Abb. 3.20. Daraufhin wurde die HT29 mittels Elektroporation (siehe 2.2.8.2) mit dem pGL3-Kontrollvektor transfiziert, der einen starken SV40 Promotor enthält und als Reportergen die Luciferase konstitutiv exprimiert. Die Auswertung erfolgte 48 h nach Transfektion über den Substratumsatz im Luminometer. Es gelang weder mit dem Gene Pulser System II noch mit dem Biolistik-Partikel Übertragungssystem (siehe 2.2.8.2.1 und 2.2.8.2.2), das Kontrollplasmid mit ausreichender Effizienz in die HT29 zu transfizieren.

### **3.2.2 Untersuchungen zur Antisense Abwehrstrategie:**

#### **Das HERV-K(C4) Modell**

Im Rahmen der bisher erfolgten Arbeiten (Schneider et al., 2001a; Mack et al., 2004) zur Untersuchung der möglichen Bedeutung der retroviralen Insertion im Intron 9 des C4-Gens wurde eine blockierende Wirkung des HERV-K(C4) durch Transkription einer Antisense-RNA, die mit der C4-Expression reguliert wird, diskutiert. Da die retrovirale Insertion im Intron 9 in Bezug auf das C4-Gen in umgekehrter Orientierung angeordnet ist (Dangel et al., 1994; Chu et al., 1995), könnte sich der Wirt daraus einen protectiven Schutz vor verwandten exogenen Retroviren angeeignet haben (Dangel et al., 1994; Schneider et al., 2001a). In diesem Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels RT-PCR und RNase Protection Assays die Existenz von HERV-K(C4) spezifischer Antisense-mRNA, die Sequenzen des flankierenden C4-Gens umfasst, in verschiedenen humanen Zelllinien und Geweben nachgewiesen werden (siehe 3.1). Um die Hypothese einer Antisense-Inhibierung nach Infektion eines homologen exogenen Retrovirus zu überprüfen, wurde von Schneider und Kollegen ein Modell-System für die retrovirale Expression etabliert (siehe Abb. 1.8). Als "exogene retrovirale Sequenz" wurden Fusionsplasmide, die Fragmente der retroviralen gag- und pol-Gene 5' vom LacZ-Gen in Sense Orientierung enthielten, verwendet. In der hier beschriebenen Transfektionsstudie sollte überprüft werden, ob nach Transfektion der retroviralen Konstrukte gag- und pol- $\beta$ -fus-Sense (siehe 2.2.5) in die humane Zelllinie HepG2 eine Hybridisierung der "retroviralen" Sense-mRNA mit der HERV-K-Antisense-mRNA nachgewiesen werden kann, da HepG2 konstitutiv C4 exprimiert. Eine Heteroduplexbildung würde die Translation des vektoriiellen Fusionsproteins blockieren und könnte somit über die  $\beta$ -Galaktosidase-Expression nachgewiesen werden. Die ermittelte  $\beta$ -Gal-Aktivität wäre dann proportional zur Expression der retroviralen Konstrukte nach transienter Transfektion. Die bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (Mack, 2000) erarbeiteten Daten zu dieser Hypothese wurden durch erneute Transfektionsstudien überprüft und vervollständigt.

#### **3.2.2.1 Inhibierung der Expression des retroviralen Fusionsproteins nach Stimulation der C4-Genexpression mit dem Cytokin Interferon- $\gamma$**

Verschiedene Autoren konnten bereits früher zeigen, daß Zytokine die Gen-Expression modulieren und daß insbesondere die C4-Expression durch Zusatz von IFN- $\gamma$  erhöht wird (Miura et al., 1987; Kulics et al., 1991). Daher wurden  $1 \times 10^5$  logarithmisch wachsende

HepG2-Zellen in unabhängigen Versuchsansätzen mit 1,3 µg gag- oder 1,5 µg pol-β-fus-Sense transfiziert und mit steigenden Konzentrationen an IFN-γ, d.h. 10 U/ml, 100 U/ml und 200 U/ml Medium stimuliert. Die Zellen einer Vertiefung wurden nicht stimuliert, um die Auswirkung von IFN-γ auf die C4- bzw. β-Gal-Expression abschätzen zu können. Parallel zu jedem Experiment wurden HepG2-Zellen mit dem pSV-β-Galaktosidase-Vektor (Positivkontrolle) und dem pCMV-β-fus-Vektor (Negativkontrolle) transfiziert. Der Vektor der Negativkontrolle enthält das gag-Gen in Antisense-Orientierung (siehe Abb. 2.2) und kann daher aufgrund von Stop-Codons in der Sequenz das Reportergen nicht exprimieren. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 48h bei 37°C inkubiert, anschließend die β-Galaktosidase-Aktivität [mU] und der Gesamtproteingehalt [µg], wie unter 2.2.9 beschrieben, photometrisch bestimmt und die Aktivität in µUnits/µg berechnet. Von jedem der insgesamt fünf unabhängigen Transfektionsexperimente wurden parallel drei Ansätze durchgeführt, um die Ergebnisse, die in Tabelle 3.2 zusammengefaßt sind, auf ihre Reproduzierbarkeit zu überprüfen.

**Tabelle 3.2:** Dosis-abhängige Abnahme der retroviralen Fusionsproteinexpression nach IFN-γ Stimulation transfizierter HepG2-Zellen

<i>IFN-γ</i> <i>units/ml</i>	<i>gag-β-fus-Sense</i> <i>β-Gal-Aktivität</i>		<i>pol-β-fus-Sense</i> <i>β-Gal-Aktivität</i>		<i>Kontrolle</i> <i>positive negative</i> <i>β-Gal-Aktivität [µU/µg]</i>	
	<i>[µU/µg]</i>	<i>[%]</i>	<i>[µU/µg]</i>	<i>[%]</i>		
0	116,3 ± 9,1	100 ± 7,8	87,2 ± 8,4	100 ± 9,6	111,4 ± 4,9	3,7 ± 0,4
10	102,1 ± 14,7	87,8 ± 12,7	67,1 ± 6,9	77,0 ± 7,9	100 ± 4,6	5,4 ± 0,5
100	86,2 ± 19,1	72,4 ± 16,5	52,6 ± 15	60,4 ± 17,1	99,3 ± 3,2	1,6 ± 1
200	72,9 ± 20,3	62,8 ± 17,4	48,2 ± 17	55,3 ± 19,5	102,4 ± 1,9	4,9 ± 2,4

Tabelle 3.2 zeigt, daß nach der Transfektion von HepG2-Zellen mit dem gag-β-fus-Sense-Vektor die β-Gal-Aktivität in den unstimulierten Zellen 116,3 µU/µg betrug und diese nach der Stimulation mit 10 U/ml IFN-γ auf 87,8 µU/µg, mit 100 U/ml auf 86,2 µU/µg und mit 200 U/ml auf 72,98 µU/µg sank. Im Vergleich dazu konnte eine Abnahme der β-Gal-Expression nach Transfektion mit dem pol-β-fus-Sense-Vektor von 87,2 µU/µg auf 67,1 µU/µg nach Zugabe von 10 U/ml IFN-γ, auf 52,6 µU/µg nach 100 U/ml und auf 48,2 µU/µg nach 200 U/ml detektiert werden.

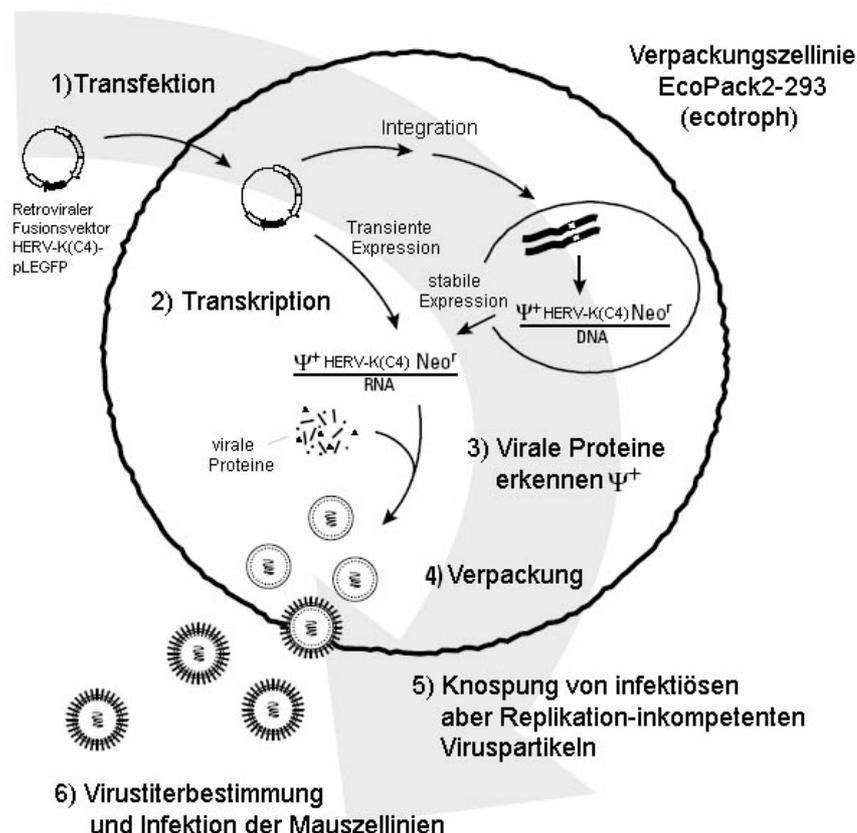
Somit konnte eine dosis-abhängige Abnahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auf 62,8 % bzw. 55,3% für die retroviralen Konstrukte gag- $\beta$ -fus-Sense und pol- $\beta$ -fus-Sense nach steigender IFN- $\gamma$ -Dosis im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (100%) nachgewiesen werden. Die Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität um 37,2% (gag) bzw. 44,7% (pol) ist zudem signifikant. Anhand der Positivkontrolle konnte gezeigt werden, daß die Zellaktivität nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  nicht beeinflußt wurde oder sich auf Promotoraktivität sowie die Translation der  $\beta$ -Galaktosidase auswirkte. Nach der Bildung des Mittelwertes der fünf unabhängigen Transfektionsexperimente traten relativ hohe Standardabweichungen im Bereich von 7,8% bis 17,4% (gag) bzw. 9,6% bis 19,5% (pol) auf, wobei diese proportional mit der IFN- $\gamma$  Stimulation anstiegen. Dies gilt auch für die drei Parallelansätze eines Einzelversuches, und die berechneten Standardabweichungen entsprechen in der Größenordnung denen in Tabelle 3.4. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die Blockierung der Luciferase-Expression durch die Hybridisierung der transfizierten Sense-Transkripte mit den zellulär exprimierten Antisense-Transkripten in den einzelnen Versuchsansätzen unterschiedlich war.

### **3.3 Etablierung eines retroviralen HERV-K(C4)-homologen Infektionsmodells an murinen Zelllinien**

Da das unter 3.2.2 beschriebene transiente Transfektions-Modell nur zum prinzipiellen Nachweis der Interaktion der HERV-K(C4)-Transkripte mit den homologen Sequenzen des Plasmid-Konstruktes gedacht war, sollte ein retrovirales Infektionsmodell an humanen und murinen Zelllinien etabliert werden. Dieses sollte zur Aufklärung der komplexen Abläufe einer retroviralen Infektion mit Integration in das Genom der Wirtszelle und nachfolgender Expression proviraler Sequenzen sowie deren mögliche Beeinflussung durch HERV-K(C4)-Antisense-Transkripte dienen. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von Experimenten durchgeführt, deren Ergebnisse in diesem Teil zusammengefaßt dargestellt werden.

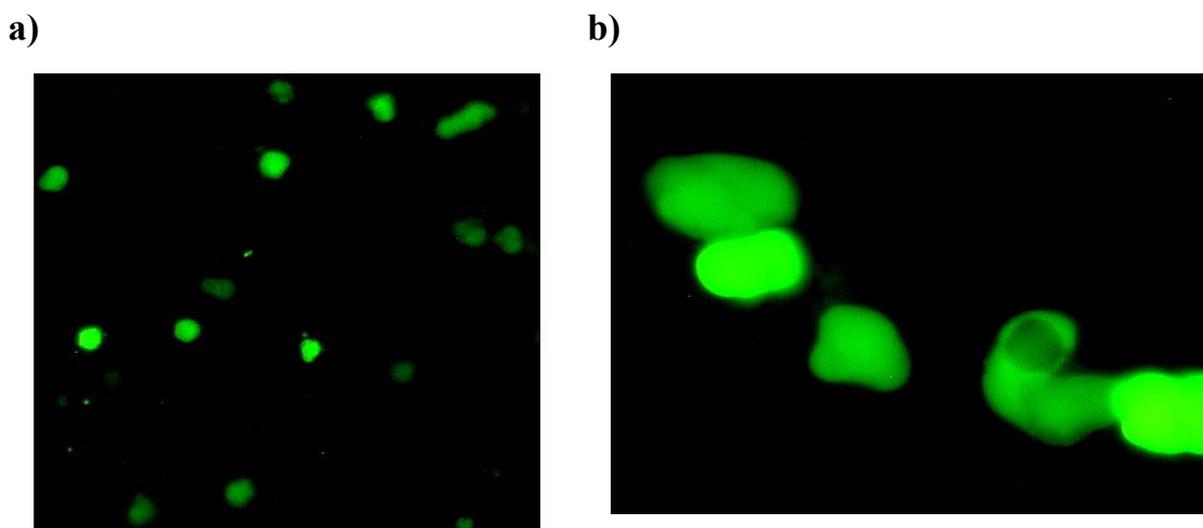
Die HERV-homologen Sequenzen gag, pol und env wurden als offene Leseraster mittels der Primerpaare gag-HindIII 5'/3', pol-HindIII 5'/3' und env-HindIII 5'/3' aus dem C491 Lambda-Klon amplifiziert. Nach Restriktion mit der Endonuklease HindIII wurden diese in codierender proviraler Orientierung 5' vom Reportergen EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) in den retroviralen Vektor pLEGFPN1 kloniert, der die Expression eines HERV-K(C4)-EGFP-Fusionsprotein erlaubt. Der retrovirale Vektor enthält den 5'-LTR aus

MoMuLV (*Moloney murine leukemia virus*) als viralen Promotor, die CMV-IE-Sequenz (*human cytomegalovirus immediate early promotor*) als aktiven Promotor zur Expression des Konstrukts, das Verpackungssignal  $\psi$  zur Produktion der Virionen sowie  $Neo^r$  als Selektionsmarker in eukaryotischen Zellen. Das Klonierungsexperiment sowie die Versuchsdurchführung wurden unter 2.5 ausführlich beschrieben. Zur Gewinnung infektiöser und nicht-replikationsfähiger Viruspartikel wurden die Konstrukte sowie der Wildtyp-Vektor liposomal in die ecotrophen Verpackungszellen EcoPack2-293 transfiziert, welche die retroviralen Strukturgene des MoMuLV gag-pol und env stabil im Genom integrieren und konstitutiv exprimieren. Nach Transkription der rekombinanten HERV-K(C4)-EGFP-RNA vermittelt das Verpackungssignal  $\psi$  die Produktion der Virionen durch die im Zytoplasma vorliegenden viralen Strukturproteine, die anschließend ins Medium freigesetzt werden (siehe Abb. 3.21).



**Abb. 3.21:** Transiente Transfektion des rekombinanten retroviralen Fusionsvektors HERV-K(C4)-pLEGFP in die ecotrophe Verpackungszelllinie Eco2-293 (1), mit anschließender transienter oder stabiler Expression des rekombinanten retroviralen Fusionsgens (2) und dadurch vermittelten Virusproduktion (3-6). (Modifiziert nach Retroviral Gene Transfer and Expression User Manual, BD Clontech, 2002)

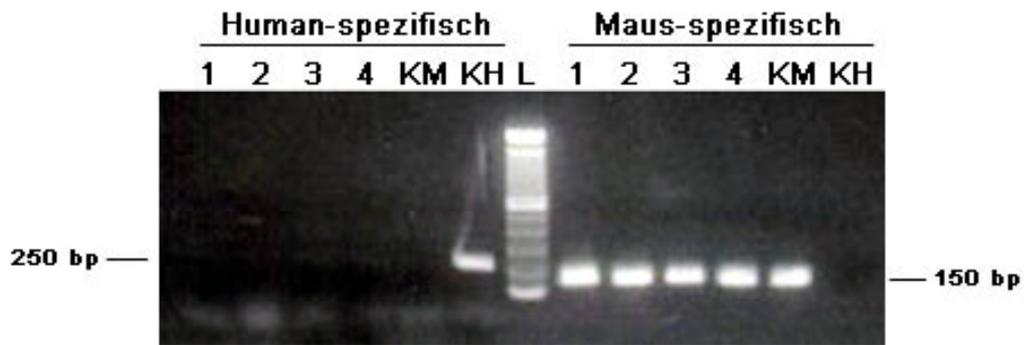
Die Transfektionseffizienz wurde nach 48 h unter dem Fluoreszenzmikroskop und im FACS durch den Expressionsgrad von EGFP in den transfizierten EcoPack2-293-Zellen und somit über den Anteil fluoreszierender Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Sowohl das Kontrollplasmid (pLEGFP-N1 Wildtyp) als auch die Fusionskonstrukte gag-, pol-, und env-pLEGFP wurden mit einer Effizienz von 60-80% in die EcoPack2-293-Zelllinie transfiziert. In Abb. 3.22 sind die EGFP-exprimierenden EcoPack2-293 48 h nach Transfektion mit dem Kontrollplasmid pLEGFP-N1 bei einer 40fachen Vergrößerung und mit dem pol-Fusionskonstrukt bei 100facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Da die Zellen für die mikroskopische Analyse von den Platten gelöst und tröpfchenweise auf das Objektglas überführt wurden, spiegelt die photographische Abbildung nicht die eigentliche Effizienz dar.



**Abb. 3.22:** Photographische Darstellung des Ergebnisses der liposomalen Transfektion a) des Kontrollvektors pLEGFP-N1 und b) des Fusionskonstrukts pol-EGFP in Eco2-293 Verpackungszellen. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion von den Platten gelöst und der Expressionsgrad des Fluoreszenzmikroskops EGFP in den transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei a) einer 40fachen und b) 100fachen Vergrößerung analysiert.

Nach Aufreinigung der gewonnenen infektiösen Viruspartikel (nach 48 h und 72 h) aus dem Kulturüberstand wurde der virale Titer (siehe 2.2.10.2) durch die von den Virionen übertragene Neo<sup>r</sup> Resistenz auf NIH 3T3-Zellen, über das Auszählen Antibiotika-resistenter Kolonien empirisch bestimmt. Die gewonnenen viralen Stammlösungen der EcoPack2-293-Zellen wiesen einen viralen Titer von  $2 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$  cfu/ml auf. Nach Angaben des Herstellers sollte der virale Titer des gereinigten Kulturüberstandes bei  $>10^6$  liegen. Daher wurde die maximal verfügbare Menge an viraler Stammlösung zunächst zur Infektion der

murinen LM(TK<sup>-</sup>) sowie NIH3T3 eingesetzt, um die retrovirale de novo Expression in Abwesenheit von HERV-K(C4) zu testen. Weiterhin wurden die Zellen in einem zeitlichen Abstand von 12 h erneut infiziert, um die Effizienz der Infektion zu erhöhen. Es zeigte sich in mehrmonatigen Versuchen, daß eine generelle retrovirale Infektion der Mauszelllinien nicht möglich war. Zwar gelang die Transfektion der retroviralen Konstrukte, wie in Abb. 3.22 dargestellt, jedoch konnte keine ausreichende Expression des EGFP-Reportergens in den mit den viralen Stammlösungen infizierten Maus-Linien LM(TK<sup>-</sup>) und NIH3T3 nachgewiesen werden. Es konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop nur vereinzelt fluoreszierende Zellen detektiert werden, die eine geringere Intensität in der Fluoreszenz im Vergleich zu den transfizierten Verpackungszelllinien aufwiesen. Die anschließend durchgeführte FACS-Analyse zeigte, daß der Anteil EGFP-exprimierender Zellen an der Gesamtzellzahl zwischen 1-5% betrug. Um Unterschiede in der Expressionsrate des Reporterproteins EGFP in den späteren Infektionsversuchen mit den LC4A und LC4B-Zellen detektieren zu können, die den Nachweis einer Antisense-Inhibierung der retroviralen Sense-Fusionskonstrukt-RNA durch provirale HERV-K(C4)-Antisense-RNA erbringen würden, sollte die Expressionsrate von EGFP in den LM(TK<sup>-</sup>) sowie NIH3T3 über 50% liegen. Die Versuchsbedingungen wurden daher mehrfach in Hinblick auf die Kultivierung der Zelllinien, Virusaufreinigung und Infektion optimiert sowie die infizierten Zellen über 1 Woche lang jeden Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Nach mehreren durchgeführten Versuchsansätzen konnte jedoch keine Erhöhung des Virustiter sowie der Anzahl infizierter bzw. EGFP-exprimierender Mauszellen detektiert werden. Da ecotrophe Virionen ausschließlich über das in der Hüllmembran eingelagerte envelope Hüllprotein gap70 an den murinen zellulären Zielzelloberflächen-Rezeptor m-CAT-1 absorbieren können, wurde die Reinheit der Mauszelllinien NIH3T3, LM(TK<sup>-</sup>) sowie LC4A und LC4B durch Isolierung und Testung der DNA auf Kontaminationen überprüft. Hierzu wurde eine Spezies-spezifische PCR nach Parodi und Kollegen (2002) unter Verwendung von murinen sowie humanspezifischen PCR-Primerpaaren durchgeführt. Das Primerpaar mit der GenBank Accession No. coxI/J01415 bindet an spezifische Abschnitte der humanen mitochondrialen DNA und amplifiziert ein 228 bp Fragment, das Primerpaar mit der GenBank Accession No. coxI/J01420 bindet an die mitochondriale DNA der Maus und amplifiziert ein 150 bp Fragment. Als Kontrollen wurden jeweils die DNAs der Mauszelllinie AKR/14C und der humanen Zelllinie HepG2 mit beiden Spezies-spezifischen Primerpaaren getestet.

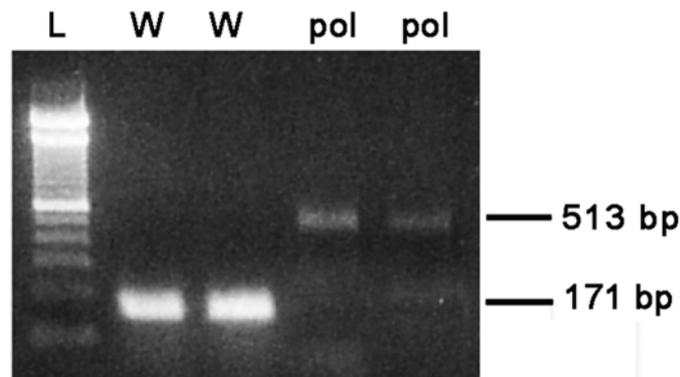


**Abb. 3.23:** Elektrophoretische Auftrennung der Human- sowie Maus-spezifischen PCR-Produkte in einem 1,5%igen Agarosegel, die mittels der Spezies-spezifischen Primerpaare *coxI/J01415* (Human) und *coxI/J01420* (Maus) amplifiziert wurden. Als Template wurde die DNA aus den Mauszelllinien NIH3T3 (1), LM(TK<sup>-</sup>) (2), LC4A (3), LC4B (4), AKR/14C (KM) und aus der humanen Zelllinie HepG2 (KH).

Wie Abb. 3.23 zeigt, konnte nur mittels der Maus-spezifischen Primer *coxI/J01420* das spezifische PCR-Produkt mit einer Länge von 150 bp (1-4) nachgewiesen werden. Anhand der Kontrollen konnte gezeigt werden, daß mittels des Human-spezifischen Primerpaares zwar ein 250 bp Fragment aus der humanen HepG2-DNA (KH), jedoch kein PCR-Produkt aus der

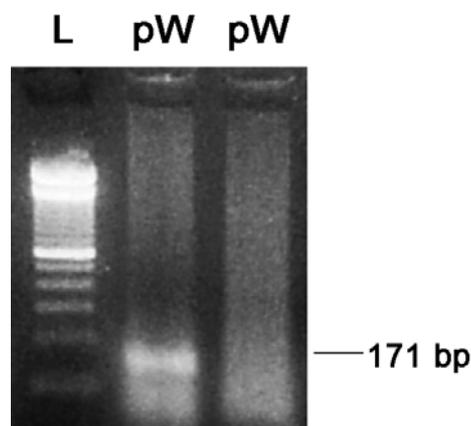
AKR/14C Maus-DNA (KM) generiert werden konnte, was im umgekehrten Fall für das Maus-spezifische Primerpaar ebenso gilt. Somit konnte ausgeschlossen werden, daß die Mauszelllinie mit einer humanen Zelllinie kreuzkontaminiert hat, die zum gleichen Zeitpunkt in Kultur gehalten wurde. Weiterhin wurde das Vorliegen von Viruspartikeln aus vier unabhängig gewonnenen Kulturüberständen der EcoPack293-Zelllinie, die mit dem Kontrollplasmid pLEGFP-N1 sowie mit dem pol-EGFP-Fusionskonstrukt transfiziert wurde, über den Nachweis von retroviraler RNA durch eine RNA-Extraktion und anschließender RT-PCR untersucht. Die Reverse Transkription wurde unter Verwendung des EGFPN2 Primers durchgeführt, der 3' innerhalb der EGFP-RNA-Sequenz bindet. In der anschließenden PCR wurde das Primerpaar EGFPN1/2 eingesetzt, welches die MCS der cDNA des Wildtyp-Vektors pLEGFP-N1 flankiert und somit ein 171 bp Produkt sowie für die cDNA des pol-EGFP-Fusionskonstrukt ein 513 bp RT-PCR-Produkt generiert.

Wie Abb. 3.24 zeigt, konnten retrovirale Wildtyp- sowie HERV-K(C4)-pol RNA in den vier getesteten Kulturüberständen der transfizierten EcoPack2-293-Zelllinie mittels RT-PCR aufgrund der amplifizierten spezifischen Produkte mit einer Länge von 171 bp (Wildtyp) und 513 bp (pol) nachgewiesen werden.



**Abb. 3.24:** RT-PCR-Nachweis der ecotrophen Virionen-RNA aus den Kulturüberständen der EcoPack2-293-Zelllinie, die in vier unabhängigen Versuchsansätzen mit dem Wildtyp-Vektor pLEGFP-N1 (W) und dem pol-EGFP-Fusionskonstrukt (pol) transfiziert wurden. In allen durchgeführten Ansätzen wurde in die RT-Reaktion der EGFPN2 3'-Primer und in die PCR-Reaktion das Primerpaar EGFPN1/2 eingesetzt. Als Längenstandard wurde eine 100 bp Leiter (L) aufgetragen.

Zuletzt wurde die DNA infizierter LM(TK<sup>-</sup>)-Zellen auf das Vorhandensein von stabil in das Wirtsgenom integrierter proviraler Sequenz nach Infektion mit ecotrophen Virionen, die durch Transfektion der EcoPack293-Zelllinie mit dem Wildtyp-Vektor produziert wurden, untersucht. Hierzu wurde die genomische Maus-DNA zweier unabhängiger Versuchsansätze 72 h nach der letzten Infektion isoliert (siehe 2.2.2.1). Es wurden je 500 ng DNA sowie das Primerpaar EGFPN1/N2 in die PCR-Reaktion eingesetzt. Wie in Abb. 3.25 zu sehen ist, konnte das zu erwartende PCR-Produkt nur aus der isolierten DNA eines Infektionsansatzes mit einer Länge von 171 bp generiert werden, was auf eine durchschnittlich geringe Effizienz der Infektion der Mauszellen durch die produzierten ecotrophen Virionen zurückzuführen ist.



**Abb. 3.25:** PCR-Nachweis von proviralen Wildtyp-pLEGFPN1-Sequenzen (pW) mittels des Primerpaares EGFPN1/N2 aus der genomischen DNA von LM(TK<sup>-</sup>)-Zellen, die in zwei unabhängigen Versuchsansätzen mit ecotrophen Wildtyp-Virionen infiziert wurden.

Daher wurde als Alternative das BD Retro-X Universal Packaging zur Expression und Herstellung infektiöser retroviraler Partikel unter Verwendung der bereits hergestellten Vektorkonstrukte getestet. Dieses System enthält als Verpackungszelllinie GP-293, die nur für pol und gag codiert. Das envelope-Gen wird mit dem retroviralen Fusionsvektor HERV-K(C4)-pLEGFP cotransfiziert. Das System enthält insgesamt vier verschiedene Vektoren, die jeweils für ein bestimmtes envelope Protein codieren und in Tabelle 2.2 dargestellt sind. Die Wirtsspezifität der Virionen wird demzufolge durch den cotransfizierten Vektor festgelegt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich ecotrophe Viren zur Infektion der Mauszelllinien LM(TK<sup>-</sup>) und NIH3T3 hergestellt. Hierzu wurde der pEco-Vektor, der für das envelope Protein gap70 codiert, mit dem Wildtyp-Vektor pLEGFP-N1 sowie dem pol-EGFP-Fusionskonstrukt in parallel durchgeführten Ansätzen in die GP-293-Zelllinie cotransfiziert. Nach Aufreinigung der Viruspartikel aus den Kulturüberständen wurden die Mauszelllinien LM(TK<sup>-</sup>) und NIH3T3 mit den infektiösen retroviralen Partikeln infiziert. Es wurden auch hier mehrere Versuchsreihen mit veränderten Parametern (wie z.B. Länge der Inkubationszeit nach Infektion, Menge an eingesetzter viraler Stammlösung, sequentielle Infektionsabfolgen) durchgeführt, die im Detail nicht beschrieben werden können. Die Analyse der infizierten Mauszelllinien unter dem Fluoreszenzmikroskop ergab, daß der durchschnittliche Anteil fluoreszierender Zellen an der Gesamtzellzahl 72 h nach Infektion zwischen 10% bis 15% lag. Es konnte somit nur eine geringe Steigerung der Infektionseffizienz um ca. 5% erzielt werden.

## 4. DISKUSSION

Es wurde schon mehrfach darüber spekuliert, welche Rolle im Genom vorkommende Retroviren bei der Gen-Regulation der Wirtszelle spielen und auf welche Weise sie die zellulären Funktionen beeinflussen könnten (Kato et al., 1990; Samuelson et al., 1990; Feuchter et al., 1992).

In diesem Zusammenhang wurde eine mögliche Beeinflussung durch

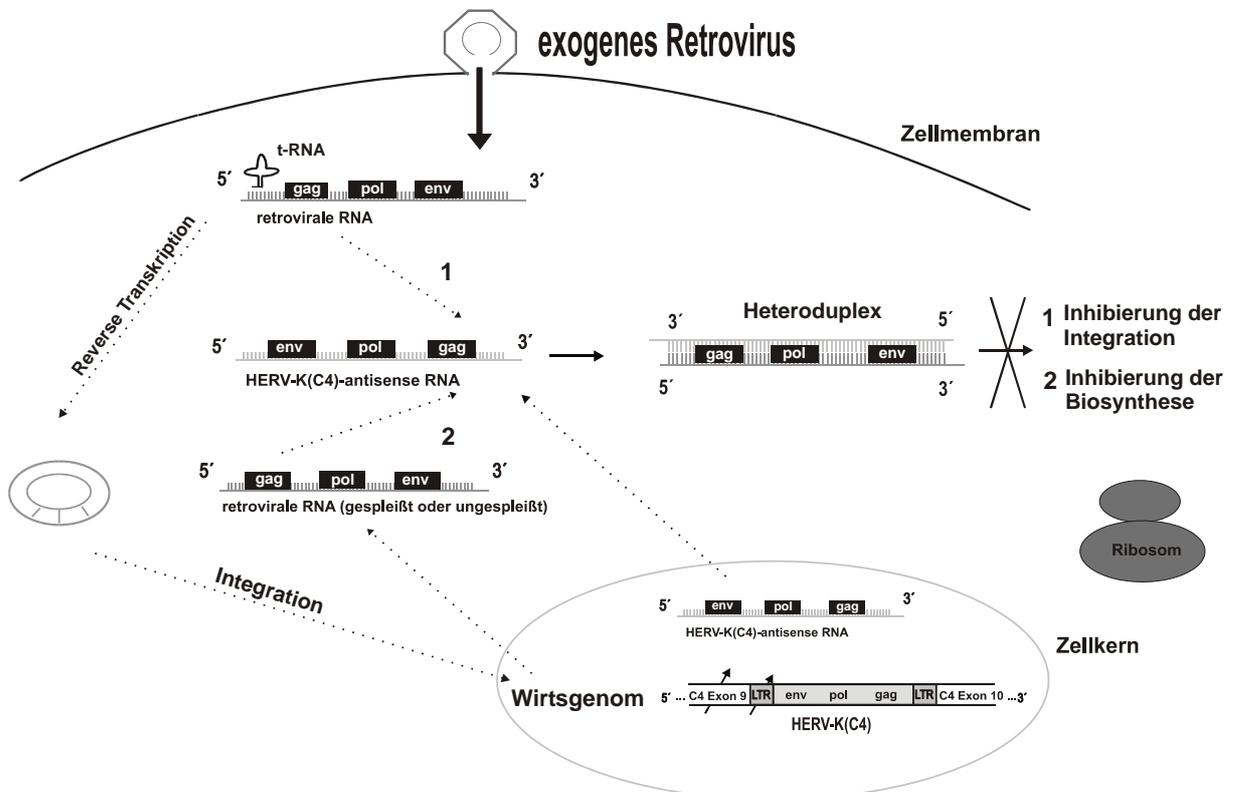
- die Retrotransposition der HERVs und die dadurch verursachten Rearrangements der betroffenen Genorte,
- die Expression bzw. Transkription retroviraler Gene sowie
- die Möglichkeit der LTRs, benachbarte Gene zu regulieren,

diskutiert (Leib-Mösch und Seifarth, 1996; Löwer et al., 1996; Britten, 1997; Sverdlov, 2000).

In bezug auf die Evolution sind sich die meisten Autoren darüber einig, daß es sich bei den im menschlichen Genom nachweisbaren HERVs wohl um retrovirale Fossile handelt, deren unmittelbar verwandte exogene Korrelate längst verschwunden sind bzw. offenbar bisher nicht entdeckt werden konnten. Dennoch gibt es eine strukturelle Verwandtschaft zu tierspezifischen Retroviren wie dem *Mouse mammary tumor virus* (MMTV) und dem *Jaaktsiekte sheep retrovirus* (JSRV), bei denen exogene und endogene Proviren nachgewiesen werden konnten (Moore et al., 1987; York et al., 1992). Interessanterweise besitzt die HERV-K(C4)-Insertion gerade zu diesen beiden Viren signifikante Homologien (Chu et al., 1995). Der Einfluß der HERVs und vor allem der retroviralen LTRs auf die Struktur und Plastizität (Löwer et al., 1996) des menschlichen Genoms ist vor allem durch Vermittlung von chromosomalen Rekombinations- und Duplikationsereignissen sowie im Zusammenhang mit der Retrotransposition als Mechanismus der horizontalen Ausbreitung von Genen gegeben. Es ist durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms nunmehr zuverlässig etabliert, daß zwischen 35% und 45% des Genoms aus Repeat-Elementen bestehen und ca. 8% aus LTRs und HERVs (IHGSC, 2001, Venter et al., 2001). Von allen HERV/LTR-Gruppen scheint allerdings nur die K10-Familie innerhalb der letzten 7 Mio. Jahre (nach der Trennung von Mensch/Schimpanse) transpositionsaktiv gewesen zu sein, während die übrigen Familien ihre Hauptaktivität vor mehr als 100 Mio. Jahren hatten (Medstrand und Mager, 1998). Im Rahmen der Genomsequenzierung konnten offensichtlich nur drei komplette HERV-Kopien mit intakten Leserahmen identifiziert werden.

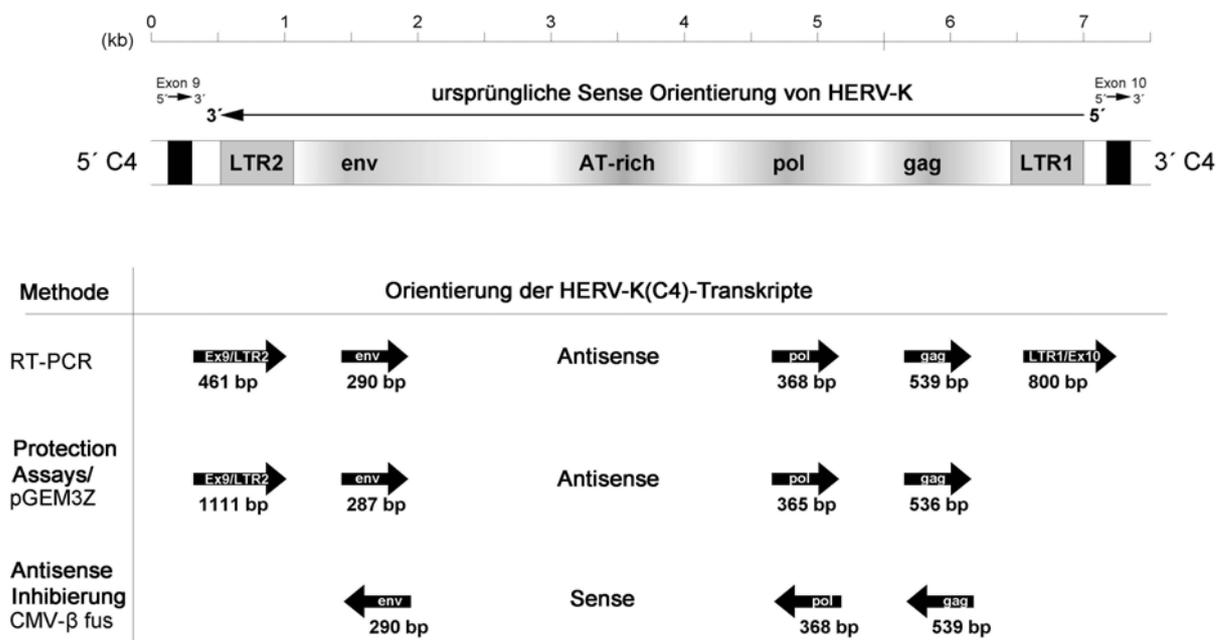
In bezug auf die funktionelle Bedeutung von HERVs sind drei Sichtweisen von Interesse: 1. der mögliche Beitrag in der Pathogenese von Tumor- und Autoimmunkrankheiten, 2. eine adaptierte zellphysiologische Bedeutung und 3. eine mögliche Schutzwirkung vor exogenen Infektionen. Die Rolle von HERVs in der Pathogenese basiert einerseits auf der möglichen Wirkung viraler Proteine oder Viruspartikel durch Expression endogener retroviraler Gene, die in einer Reihe von Studien nachgewiesen werden konnte (Mayer et al., 1997, 2004). Dabei wurde untersucht, ob diese endogenen retroviralen Genprodukte selbst als Antigene zur Induktion von Autoimmunität wirken (Venables & Brooks, 1992; Conrad et al., 1997), oder ein Zusammenhang mit bestimmten malignen Erkrankungen wie dem Teratokarzinom besteht, bei dem sowohl gag-Genprodukte als auch Typ-C Viruspartikel intrazellulär nachgewiesen konnten (Sauter et al., 1995; Löwer et al., 1993). Andererseits wird erforscht, inwieweit es durch Positionseffekte von LTRs und kompletten HERVs zu einer Veränderung der Expression benachbarter Gene kommen kann (Di Cristofano et al., 1995; Domansky et al., 2000). Anhand von Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß endogene retrovirale Genprodukte eine wichtige Rolle im Hinblick auf funktionelle oder regulative Zellmechanismen sowie die Abwehr einer retroviralen Infektion spielen können. Die Zell-Zell Fusion während der Plazentabildung wird u.a. durch die envelope Proteine Syncytin und Syncytin 2 (Blond et al., 2000; Mi et al., 2000; Blaise et al., 2004) vermittelt. Eine indirekte Schutzwirkung vor exogenen Infektionen wird bisher vorwiegend auf der Proteinebene durch Wechselwirkungen retroviraler Genprodukte mit dem Immunsystem diskutiert. Dabei soll es durch Expression endogener retroviraler Superantigene zu einer Depletion von für die Infektion mit exogenen Viren suszeptiblen Zellen des Wirtes kommen (Löwer et al., 1996). Env Proteine können den Zelleintritt (Penetration) verwandter exogener Retroviren verhindern, die für denselben Zelloberflächenrezeptor spezifisch sind (Best et al., 1996). Eine Vielzahl der HERV-Viren bzw. HERV-LTRs einschließlich der HERV-K(C4)-Insertion liegen in umgekehrter Orientierung zu der codierenden Sequenz (d.h. die Transkriptionsrichtung des Wirtsgens ist der des Virus entgegengesetzt) integriert im humanen Genom vor. In neuesten Studien konnte mittels BLAST-Homologie-Sequenzanalysen gezeigt werden, daß 13 % der HERVs innerhalb von Genen lokalisiert sind bzw. 813 Gene ein oder mehrere HERV-Regionen enthalten. Interessanterweise liegen HERVs in Introns vorwiegend in Antisense-Orientierung vor: Von ca. 1300 in Introns von Genen lokalisierten HERVs liegen 900 in Antisense Orientierung vor (Villesen et al., 2004). Dies könnte durch Selektionsmechanismen begünstigt worden sein, die einer Gen-

Zerstreuung oder -Beeinflussung durch retrovirale Elemente wie Promotor, Spleißseiten und Polyadenylierungssignalen bei gleichzeitiger Bevorzugung proviraler Integrationen in der Nähe oder innerhalb von Genen entgegenwirken (Medstrand et al., 2002; Smit, 1999; Mitchell et al., 2004; Schroder et al., 2002). Die von Dangel und Kollegen (1994) formulierte und von Schneider und Kollegen 2001a experimentell etablierte Hypothese eines Antisense-Schutzes durch endogene retrovirale Transkripte, der zu einem Selektionsvorteil für den Wirt geführt haben kann, stellt einen vollkommen neuen und von anderen Arbeitsgruppen bisher noch nicht verfolgten Forschungsansatz dar. Der HERV-K(C4)-LTR2-Promotor, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, könnte die Transkription einer Antisense-Provirus-RNA initiieren, die dann durch Heteroduplexbildung mit einer viralen, komplementären (homologen) Sense-mRNA die Translation der Gene infektiöser exogener Retroviren blockiert (siehe Abb. 4.1) (Schneider et al., 2001a). Das würde bedeuten, daß die retrovirale endogene Insertion im Rahmen einer Antisense-Funktion Schutz gegen akute exogene retrovirale Infektionen der Zelle vermitteln könnte, obwohl sie selbst aufgrund zahlreicher Mutationen funktionell inaktiv ist.



**Abb. 4.1:** Modell der Antisense-Abwehrstrategie von Wirtszellen zum Schutz vor infektiösen exogenen Retroviren durch die Expression von homologer proviraler Antisense-RNA, die über eine Heteroduplexbildung zur (1) Inhibierung der Integration oder (2) der Biosynthese führt.

In Untersuchungen zum möglichen therapeutischen Nutzen einer Antisense-Strategie konnte gezeigt werden, daß Antisense-Oligonukleotide, die komplementär zur HIV-gag-mRNA sind, erfolgreich zur Blockierung der Virusreplikation in humanen T-Zellen sowie in peripheren Blutzellen eingesetzt werden können (Lisziewicz et al., 1994). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Nachweis einer spezifischen HERV-K(C4)-Antisense mRNA erbracht. Weiterhin wurde ein Reporter-gen-System etabliert, mit dessen Hilfe die Promotoraktivitäten der LTRs von HERV-K(C4) in je beiden Orientierungen nach transienter Transfektion in verschiedenen Zelllinien bestimmt werden konnte, um dadurch weitere Erkenntnisse über eine unabhängige Transkription von HERV-K(C4) sowie einen möglichen Einfluß auf die zelluläre Genexpression zu erhalten. Parallel dazu wurde eine mögliche antivirale Wirkung des HERV-K(C4) durch Transkription einer Antisense-RNA anhand eines Modell-Systems untersucht. In Abb. 4.2 ist eine schematische Übersicht der Längen und Orientierungen der nachgewiesenen bzw. verwendeten Transkripte in den unterschiedlichen Studien angegeben. Da die Studien in einem engen Zusammenhang zueinander stehen, sollen die Ergebnisse in Bezug zueinander gesetzt und diskutiert werden.



**Abb. 4.2:** Schematische Übersicht der Lage und Orientierung des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K(C4)) im Intron 9 des C4-Gens sowie der mittels RT-PCR und RNase Protection Assays nachgewiesenen Antisense Transkripte und retroviralen Sense Fragmente, die zum Nachweis einer Inhibierung durch endogene Antisense Transkripte in der HepG2-Zelle in den CMV-β-FusB kloniert worden sind.

#### 4.1 Struktur und Vorkommen von HERV-K(C4)-Antisense Transkripten

In den Untersuchungen von Schneider und Kollegen (2001a) konnte, wie schon erwähnt, HERV-K(C4)-spezifische Antisense-RNA über einen funktionellen Reporterassay sowie durch RT-PCR in HepG2-Zellen belegt werden. Dabei handelt es sich entweder um 1. Spleißprodukte des herausgeschnittenen Intron 9, 2. ungespleißte prä-mRNA, die durch die C4-Expression entstanden ist, oder 3. um ein C4-unabhängiges durch den LTR2-Promotor induziertes HERV-K(C4)-Antisense-Transkript. Das Vorhandensein von HERV-K(C4)-spezifischen RNA-Transkripten in der Antisense-Orientierung wurde auch in dieser Arbeit zunächst mittels RT-PCR an humanen Zelllinien und Geweben untersucht, da dieses Nachweisverfahren sich durch seine hohe Sensitivität gegenüber anderen Methoden hervorhebt (Melcher et al., 1996; Kielar et al., 2001; Chen et al., 1997). Eine hohe Sensitivität war erforderlich, da keine Erkenntnisse darüber vorlagen, wie hoch die Transkriptionsrate von HERV-K(C4) ist und welchen Regulationsmechanismen diese unterliegt. Schneider und Kollegen (2001a) konnten diesbezüglich zeigen, daß erst nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ , welches vermutlich eine Erhöhung der HERV-K(C4)-Transkription in der Antisense Orientierung induziert, eine signifikante Abnahme des Reporterproteins durch die Hybridisierung von retroviralen Sense- und Antisense-Transkripten detektiert werden konnte. Dies läßt vermuten, daß HERV-K(C4)-Transkripte unter Normalbedingungen in geringer Anzahl exprimiert werden. In den von Löwer und Kollegen (1993) durchgeführten RT-PCR-Untersuchungen zur Expression von HERV-K-10 in Teratocarcinoma Zelllinien sowie von Yi und Kollegen (2004) zur Expression von HERV-W in 12 humanen Geweben und 18 Krebszelllinien konnten in allen getesteten Zelllinien und Geweben retrovirale Transkripte nachgewiesen werden, deren Expressionsrate jedoch zu gering war, um diese durch eine Northern Analyse zu belegen. Ein Großteil der RNA wird zudem durch tRNAs (*transfer-RNAs*) und rRNAs (*ribosomale RNAs*) dargestellt. Eine stoffwechselaktive Säugetierzelle enthält 10-30 pg Gesamt-RNA, doch nur 1 bis maximal 5% davon, abhängig von Zelltyp und physiologischem Status, ist mRNA (*messenger-RNA*). Die meisten eukaryotischen mRNAs besitzen im Gegensatz zu tRNAs und rRNAs einen sogenannten poly-A-Schwanz, der aus 20-250 Adenosin-Nukleotidresten besteht. Unter den durchschnittlich 360.000 mRNA-Molekülen einer einzigen Säugetierzelle befinden sich durchschnittlich 12.000 verschiedene mRNA-Spezies, wobei einige mehr als 3% des mRNA-Pools und andere weniger als 0,01% ausmachen. Die Kopienanzahl dieser *low abundance*-mRNA beträgt 5-15 Moleküle pro Zelle (Nelson et al., 1999; Steinmüller, 2001).

Indem der Gehalt von rRNA und tRNA in den RNA-Proben durch gezielte mRNA Isolation mittels Magnetpartikeln (siehe 2.2.2.2) vermindert wurde, konnte der relative Gehalt der mRNA erhöht werden, wodurch es möglich war, *low abundance*-mRNA zu detektieren. Die extrahierte poly(A<sup>+</sup>)-mRNA wurde zunächst mittels Oligo(dT)-Primern revers transkribiert und die retroviralen HERV-K(C4) Gene gag, pol und env unter Verwendung von spezifischen Primern amplifiziert (siehe 2.2.4.1, 3.1.1). Ebenfalls wurde in den untersuchten Zelllinien und Geweben die Expression des zellulären Komplementgens C4 im Zusammenhang mit der HERV-K(C4)-Transkription untersucht. Es konnten in allen getesteten humanen Zelllinien – HepG2 (Hepatomzelllinie), HS27 (Hautfibroblasten), primäre Leberfibroblasten, B-Zellen, frischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und Monocyten (MonoMac6) – HERV-K(C4)-spezifische Transkripte (wenn auch in unterschiedlicher Stärke) sowie eine C4- und  $\beta$ -Aktin Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.3).

Der Nachweis von HERV-K(C4)- und C4-Transkripten in den postmortalen Geweben Niere, Haut, Muskel, Milz, Herz, Gehirn konnte nicht erbracht werden (siehe Abb. 3.2). Die extrahierte totale RNA aus diesen Geweben konnte zwar auf einem denaturierenden Agarosegel anhand der ribosomalen RNA sichtbar gemacht werden, die  $\beta$ -Aktin RT-PCR-Produkte waren jedoch in diesen Geweben von schwacher Intensität, was auf geringe Mengen an  $\beta$ -Aktin mRNA in der isolierten Template-RNA zurückzuführen war. Da  $\beta$ -Aktin ein Haushaltsgen ist und somit in jeder Zelle konstitutiv exprimiert wird (durchschnittlich 1000-3000 Kopien pro Zelle, Femino et al., 1998), ist wahrscheinlich ein Großteil der mRNA im Verlauf des Prozesses der Autolyse postmortaler Gewebszellen durch RNasen abgebaut worden. Somit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob in den postmortalen Geweben grundsätzlich keine C4-Expression sowie HERV-K(C4)-Transkription stattfindet oder ob diese aufgrund der autolytischen Prozesse nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Für die stoffwechselaktiven Hautfibroblasten-Zellen konnte z.B. der Nachweis einer C4-Expression sowie HERV-K(C4)-Transkription erbracht werden, nicht aber für die postmortal entnommene Hautgewebsprobe. Um weitere Erkenntnisse über die HERV-(C4)-Expression in humanen Geweben zu erlangen, sollte daher die RNA stoffwechselaktiver Gewebe aus kryokonservierten Biopsieproben isoliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich, weitere frische Gewebebiopsieproben für molekulargenetische Untersuchungen zu erhalten, ausgenommen der Leberbiopsieproben. Da C4 hauptsächlich in den Hepatozyten der Leber synthetisiert und daher in höheren Kopienanzahlen als in anderen getesteten Zelllinien exprimiert wird (Morris et al., 1982; Beißmann, 2004), konnte nur in der

postmortalen Leber (und in der kryokonservierten Leberbiopsieprobe) ein Nachweis von C4- sowie HERV-K(C4)-Transkripten erzielt werden. Im Gegensatz dazu wird C4 in Leberfibroblastenzellen anscheinend nur in geringem Maße aufgrund der beobachteten schwachen Intensität der Produkte exprimiert, da  $\beta$ -Aktin in der Signalstärke den anderen Zelllinien entsprach. Eine HERV-K(C4)-Transkription war in dieser Zelllinie nur durch die Amplifikation des pol-Fragments nachzuweisen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte ein durch Mutationen verursachtes verändertes Expressionsmuster der Genexpression sein, die im Verlauf zahlreicher Zellkultur-Passagen entstanden ist.

Es wurde schon mehrfach darüber spekuliert, ob HERV-K(C4) 1. im Rahmen der C4-Expression transkribiert 2. durch diese reguliert oder 3. unabhängig durch den LTR2 initiiert wird (Dangel et al., 1994; Chu et al. 1995; Schneider et al., 2001a). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten RT-PCR Untersuchungen geben Hinweise darauf, daß die C4-Expression wahrscheinlich mit der HERV-K(C4)-Expression im engen Zusammenhang steht. In allen positiv getesteten Zelllinien und Geweben konnte sowohl gespleißte C4-mRNA durch Exon-spezifische Primer als auch HERV-K(C4)-mRNA durch HERV-K(C4)-spezifische Primer nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.3). Durch die Verwendung von Oligo(dT)-Primern in der reversen Transkription kann es sich bei den nachgewiesenen HERV-K(C4)-Transkripten nur um mRNA handeln, da nur diese über einen poly(A<sup>+</sup>)-Schwanz verfügt. Somit kann ausgeschlossen werden, daß die RT-PCR-Produkte aus Spleißprodukten des Intron 9 generiert wurden, die im Verlauf der C4-mRNA Prozessierung herausgeschnitten werden und keinen poly(A<sup>+</sup>)-Schwanz aufweisen. Um zu prüfen, ob die amplifizierten HERV-K(C4)-mRNA Fragmente gag, pol und env letztendlich auf die C4-prä-mRNA zurückzuführen sind, wurde eine RT-PCR-Strategie verfolgt, die auf der Amplifikation verschiedener RNA-Bereiche vom 5'-Bereich vor dem LTR2 (C4-Region) bis in den LTR2 hinein und vom LTR1 bis zum Ende des Intron 13 beruhte (siehe Abb. 3.5). Durch den Einsatz von Primerpaaren, die an die LTRs und die jeweils angrenzenden C4 Exon 9 und 10 binden, konnte der Nachweis von C4/HERV-K(C4) Intermediaten in den Zelllinien HepG2, MonoMac6, HS27, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen erbracht werden, die Sequenzen der Exons 9 und 10 des C4-Gens umfassen (siehe Abb. 3.6). Es konnten jedoch keine C4/HERV-K(C4)-Intermediate aus HepG2- und MonoMac6-RNA amplifiziert werden, die von LTR1 bzw. LTR2 aus größer als 1kb sind und Sequenzen von Exon7/LTR2 und LTR1/Intron 13 enthalten. Bei den detektierten HERV-K(C4)-Transkripten kann es sich somit nicht um C4-prä-mRNA handeln, da keine RNA-Transkripte generiert werden konnten, die Sequenzen von

Exon 7 und Intron 13 einschließen. Aufgrund der Tatsache, daß die HERV-K(C4)-Transkripte jedoch eindeutig Sequenzen von Exon 9 sowie Exon 10 umfassen, kann darüber spekuliert werden, ob diese auf eine C4-prä-mRNA zurückzuführen sind, die im Verlauf der C4-mRNA Prozessierung durch alternatives Spleißen hervorgegangen sein könnten. Danach würde es sich um ein eigenständiges C4/HERV-K(C4)-Transkript mit poly(A<sup>+</sup>)-Schwanz als typisches Merkmal gereifter prozessierter mRNA handeln, dessen Expression im Zusammenhang mit der des C4-Gens kontrolliert wird. In Hinblick auf den Einfluß HERVs postulierte Brosius (1999), daß diese die Expression sowie Regulation und Prozessierung des Wirtsgens durch die Bereitstellung retroviraler alternativer Transkriptionsinitiationssignalen, Spleißakzeptor- und donatoren sowie Polyadenylierungssignale verändern könnten (siehe Abb. 1.1).

In diesem Zusammenhang konnten in mehreren Studien mittels RT-PCR in humanen Zelllinien (z.B. T47-D (Brustkrebszelllinie) PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) und Northern Blot Analyse in verschiedenen Geweben (Lunge, Leber, Bauchspeicheldrüse, Niere, Plazenta) provirale mRNA-Transkripte der HERV-K10, ERV-9 und ERV-3 Familie und verschiedener HML-Gruppen (*Human endogenous mouse mammary tumor virus-like*) beobachtet werden, welche die komplette retrovirale Sequenz einschließen und zusätzlich zelluläre Sequenzen am 3' und/oder 5' Ende enthalten (Löwer et al., 1993; Medstrand et al., 1993; Franklin et al., 1988; Kato et al., 1987; Lindeskog et al., 1993; Ono et al., 1987). Löwer und Kollegen (1996) spekulierten diesbezüglich, daß es sich dabei um "readthroughs" in angrenzende zelluläre Gene handelt oder die Initiation der Transkripte sogar von einem in 5' Richtung gelegenen zellulären Promotor in Sense aber auch Antisense Orientierung ausgehen könnte. Es kann daher auch im Rahmen dieser Arbeit über das Vorhandensein eines zellulären Promotors 5' vom LTR2 gelegen (z.B. C4 Exon 1 bis 9) spekuliert werden, der die nachgewiesenen HERV-K(C4)-Transkripte bzw. HERV-K(C4)/C4-Intermediate unabhängig von der C4-Expression initiiert und reguliert. Diese Hypothesen werden durch Studien unterstützt, die immer mehr zum Vorschein bringen, daß das Säugetiergenom ein komplexes Netzwerk von cis-regulierenden Elementen umfaßt und darüber hinaus mit transaktiven Faktoren interagiert, um eine spezifische Genexpression und -regulation zu gewährleisten. Die cis-regulierenden Elemente können dabei in weiter Entfernung (über hunderte von Kilobasenpaaren) von den unter ihrer Kontrolle stehenden Genen liegen (Bonifer, 1999; Vinogradova et al., 2001). Dangel und Kollegen spekulierten in diesem Zusammenhang über die Möglichkeit einer unabhängigen HERV-K(C4)-Transkription, die durch den LTR2 in der Antisense Orientierung initiiert werden könnte. Da die nachgewiesenen Transkripte

Sequenzen des C4-Gens enthalten, erscheint eine LTR2 induzierte Transkription des Provirus als eher unwahrscheinlich. Die Bedeutung der HERV-K(C4)-LTRs wird unter 4.2 ausführlich besprochen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, daß posttranskriptionale Mechanismen bei der HERV-K(C4)-Expression wahrscheinlich eine wesentliche Rolle spielen, was zuerst durch die RT-PCR-Nachweise der C4/HERV-K(C4)-Intermediate zum Vorschein kam (Abb. 3.6). Das RT-PCR-Produkt LTR1/Exon10 konnte in der HepG2-Zelllinie mit der erwarteten spezifischen Länge von 800 bp ebenso wie ein niedermolekulares Fragment vergleichbarer Signalstärke mit einer Länge von ca. 500 bp nachgewiesen werden. In der Leberfibroblasten-Zelllinie hingegen konnten keine spezifischen Exon9/LTR2-Produkte mit erwarteter Länge von 461 bp amplifiziert werden, jedoch größere von ca. 680 bp und ein kleineres von 360 bp. Die genauen Mechanismen sowie die Struktur der gespleißten retroviralen mRNAs werden im Zusammenhang mit den Ergebnissen der RNase Protection Assays und Northern-Blot Analysen im nächsten Abschnitt diskutiert. Eine Reamplifikation der unspezifischen RT-PCR-Produkte als Template für die Sequenzanalyse war vermutlich aufgrund des Fehlens der Primerbindungsstellen am 3'- und/oder 5'-Ende in der Sequenz der niedermolekularen Fragmente nicht möglich. Mittels einer Gelelektion der Produkte und Sequenzierung unter Verwendung verschiedener Primerpaaren, die sowohl flankierend als auch innerhalb des Fragments binden, war es ebenfalls nicht möglich, die Sequenz dieser Fragmente zu analysieren.

Die Amplifikation des kompletten Provirus einschließlich der LTRs und der retroviralen Gene gag, pol und env mittels RT-PCR zur Identifikation der 5' und 3' Ende konnte nicht erbracht werden (siehe Abb. 3.6 b). Dies ist entweder auf das nicht Vorhandensein eines die komplette HERV-K-Sequenz umfassenden mRNA-Transkripts oder auf Probleme bei der Amplifikation einer immerhin 6,4 kb langen mRNA zurückzuführen. Die bisher erzielten RT-PCR Untersuchungen beschränkten sich auf die Amplifikation einzelner Sequenzabschnitte der retroviralen HERV-K(C4)-mRNA (siehe 3.1 und 3.6). Chu (1995) vermutete, daß es im Bereich des HERV-C4 Provirus aufgrund der viralen Struktur zur Ausbildung von Sekundärstrukturen kommen kann, welche die korrekte Amplifikation des Bereichs erschweren. Der GC-Gehalt im Bereich des HERV-K(C4)-Provirus liegt bei 38%. Neben einem hohen GC-Gehalt können aber auch strukturelle Besonderheiten die Ausbildung von Sekundärstrukturen begünstigen. Separovic und Kollegen (1994) beschrieben diesbezüglich eine erleichterte Heteroduplexbildung bei der PCR eines Bereichs des SIV, die auf

Sekundärstrukturen der DNA-Matrize zurückzuführen sind. Ähnliches wurde von Chu bei der Amplifikation des langen Intron 9 (mit HERV-C4-Provirus), aber auch des kurzen Intron 9 beobachtet.

In den bisher beschriebenen RT-PCR-Nachweisen wurden Oligo(dT)-Primer in die reverse Transkription eingesetzt, die sequenzunabhängig binden und somit keine Aussage über die Orientierung der mRNA zulassen. Die Orientierung der HERV-K(C4)-Transkripte wurde daher in Hinblick auf das Vorkommen von Antisense als auch Sense HERV-K(C4)-Transkripten in der HepG2-Zelllinie untersucht (siehe Abb. 3.7). Schneider und Kollegen (2001a) konnten bereits HERV-K(C4)-Antisense Transkripte in der HepG2-Zelllinie unter Verwendung des 5' spezifischen retroviralen Primers in der RT nachweisen, der ausschließlich Transkripte in der Antisense Orientierung revers transkribiert. Durch den Einsatz des 5' sowie des 3' Primers in unabhängigen RT-Reaktionen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß ausschließlich HERV-K(C4)-spezifische Transkripte der drei ORFs (*Open reading frames*) env, pol und gag in der Antisense Orientierung (in bezug auf die ursprüngliche retrovirale Transkriptionsrichtung) sowie C4 und die C4/HERV-K(C4)-Intermediate Exon9/LTR2 und LTR1/Exon10 in C4 codierender Orientierung in der HepG2-Zelllinie vorliegen (Abb. 3.7). Durch die parallel mitgeführte Kontrolle von artifizieller Sense und Antisense env RNA konnte nachdrücklich gezeigt werden, daß es prinzipiell möglich ist, retrovirale Sense mRNA mittels RT-PCR zu detektieren.

Die in der vorliegenden Arbeit mittels RT-PCR erzielten Ergebnisse zur Struktur und zum Vorkommen von HERV-K(C4)-spezifischen Transkripten zeigen deutlich, daß diese 1. in allen getesteten Zelllinien und Geweben exprimiert werden 2. einen poly(A<sup>+</sup>)-Schwanz aufweisen, welches ein typisches Merkmal von gereifter mRNA ist, 3. Sequenzen von C4 Exon 9 und Exon 10 einschließen, jedoch keine über diese Exons hinaus 4. ausschließlich in der Antisense Orientierung in der HepG2-Zelllinie nachweisbar sind.

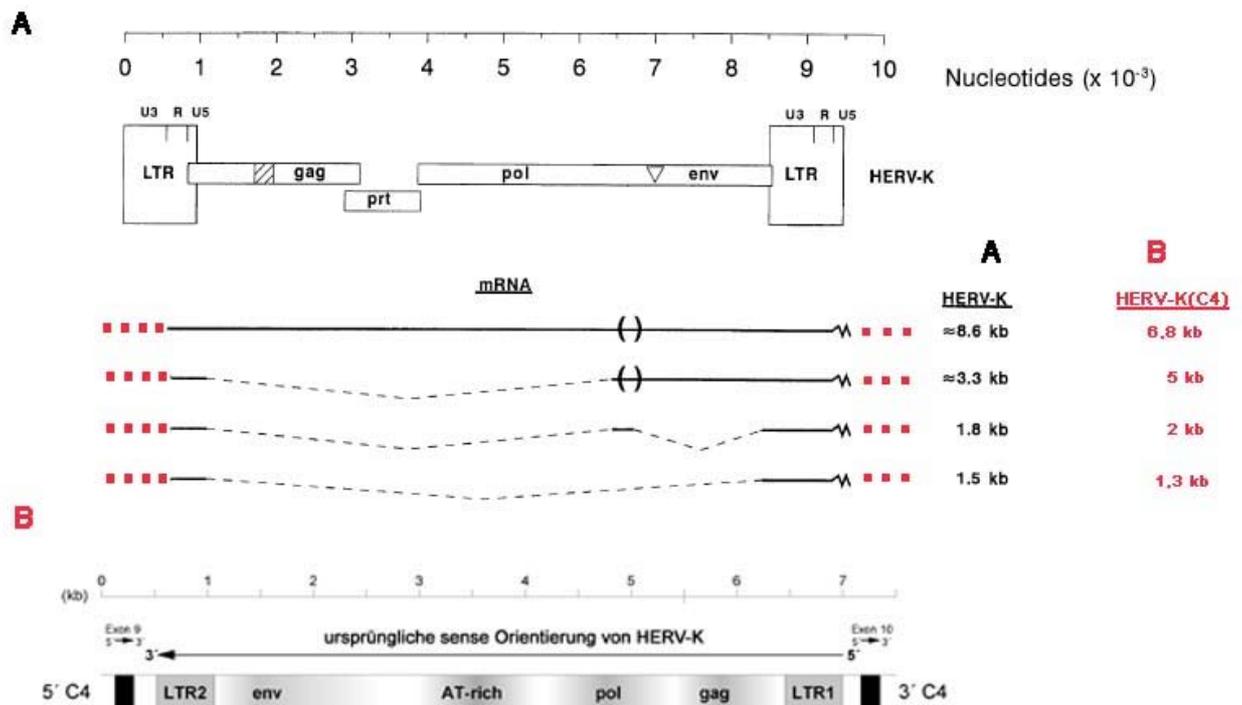
Die Familie der HERV-K-Viren ist im menschlichen Genom mit ungefähr 170 Kopien vertreten (Tristem, 2000), wovon ungefähr 50 Kopien komplette Proviren darstellen (Leib-Mösch et al., 1993; Paces et al., 2002). Darüber hinaus zeigt HERV-K(C4) die stärkste Homologie zu HERV-K10 und dem MMTV (Chu et al., 1995), welche mit mindestens 10 weiteren Sequenzfamilien Homologien aufweisen (Barbulescu et al., 1999). In einer neueren Studie konnten sieben HERVs mittels Bioinformatik im menschlichen Genom identifiziert werden, die sich von HERV-K(C4) ableiten lassen und zu diesem starke Sequenzhomologien aufzeigen, so daß sie als "Familienmitglieder" angesehen werden (Yu et al., 2003).

Interessanterweise liegen sechs von ihnen in umgekehrter Orientierung zur Sense Konfiguration der endogenen Retroviren vor d.h. ebenso wie HERV-K(C4) in Antisense Orientierung zu der codierenden Richtung. Die Chromosomen 1, 6 und 9 enthalten jeweils zwei HERV-K(C4)-abgeleitete Sequenzen. Eine Kopie konnte auf dem Y Chromosom identifiziert werden. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese transkriptionell aktiv sind. Die mittels RT-PCR amplifizierten Fragmente wurden daher im Anschluß durch eine Sequenzanalyse auf ihre Identität mit publizierten HERV-K(C4)-Sequenzen geprüft. Parallel dazu wurde eine unspezifische Bindung der Primer an homologe Sequenzen anderer im menschlichen Genom vorkommenden HERV-K Familien (z.B. HERV-K10, siehe 1.2.3) anhand einer RT-PCR mit der isolierten RNA einer EBV-transformierten B-Lymphozytenzelllinie ID-Nr. 47 untersucht, die homozygot für den MHC-Haplotyp HLA-A1, Cw7, B8, DR3, C4AQ0B1 ist und daher keine HERV-K(C4)-RNA exprimiert. Das Fehlen der Intron 9-Insertion wurde durch den Nachweis eines Amplifikates mit dem Primerpaar Ex9do/Ex10up bestätigt, wohingegen das Primerpaar Ex9do/LTR2up (Schneider et al., 2001b) kein Produkt hervorbrachte. Die Spezifität der mittels RT-PCR detektierten HERV-K(C4)-cDNA Fragmente (siehe 3.1.1) wurde sowohl aufgrund einer Sequenzidentität von über 99,8% mit den publizierten HERV-K(C4)-Sequenzen (Chu et al., 1995; Dangel et al., 1994) als auch durch die Kontroll-RT-PCR bestätigt (siehe Abb. 3.4).

Eine unspezifische Bindung der retroviralen Primerpaare an homologe Sequenzen verwandter HERVs konnte zwar für die humane B-Zelllinie ID-Nr. 47 ohne HERV-K(C4)-Insertion (siehe oben) durch die negative Kontroll-RT-PCR im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Da HERVs jedoch gewebespezifisch bzw. zelltypspezifisch exprimiert werden (Yi et al., 2004; Herbst et al., 1996; Lindeskog et al., 1993) und die Expression innerhalb verschiedener Individuen sogar variieren kann (Krieg et al., 1992), wurden mit Hilfe der im Anschluß durchgeführten RNase Protection Assays die RT-PCR- und Sequenzanalysen in Hinblick auf die Spezifität der nachgewiesenen Fragmente in den humanen Zelllinien HepG2-, MonoMac6-, Leberfibroblasten- und B-Zellen überprüft. Die radioaktiv markierten RNA-Sonden wurden so konstruiert, daß diese in der Sequenz offenen Leserastern aus den retroviralen HERV-K(C4) Genen gag, pol, env und dem C4/HERV-K(C4) Intermediat Exon 9/LTR2 in beiden Orientierungen komplementär waren (siehe 3.1.2.1 und Abb. 3.13). HERV-K(C4)-Antisense Transkripte konnten den Sonden entsprechend in spezifischer Länge in den vier getesteten Zelllinien HepG2-, MonoMac6-, Leberfibroblasten- und B-Zellen nachgewiesen werden, jedoch nicht in der retroviralen Sense Orientierung (siehe Abb. 3.14).

Die Intensität der Markierungssignale in den Zelllinien zeigten im Vergleich zueinander nur geringe Abweichungen, wobei in der HepG2-Zelllinie das stärkste und in den Leberfibroblasten das schwächste Signal detektiert werden konnte und somit im Einklang mit den Ergebnissen der RT-PCR steht. Aufgrund der Sensitivität der Autoradiografie war es möglich, die in nur wenigen Kopien vorliegenden HERV-K(C4) Transkripte in den Leberfibroblastenzellen nachzuweisen. Weiterhin wird durch die Ergebnisse der RNase Protection Assays zum Nachweis von HERV-K(C4)-Sense Transkripten belegt, daß die eingesetzten Mengen an einzelsträngiger, nicht hybridisierter radioaktiv markierter Sonden-RNA vollständig verdaut wurden und somit die Ergebnisse nicht verfälscht haben (siehe Abb. 3.14 b). Aufgrund der Verwendung von exakt komplementären Sonden in die Hybridisierungsreaktionen kann es sich bei den beobachteten Transkripten nur um HERV-K(C4)-spezifische mRNA handeln. Eine unspezifische Hybridisierung der Sonden mit homologen Sequenzen anderer HERVs im menschlichen Genom würde zu Fehlerbasenpaarungen führen, die durch die Endonucleaseaktivität der RNasen vollständig abgebaut worden wären. In diesem Zusammenhang konnten in den getesteten Zellen mehrere C4-Sense/HERV-K(C4)-Antisense Intermediate mit Sonden-unspezifischer Länge nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit den RT-PCR Untersuchungen und läßt auf eine posttranskriptionale Modifikation der HERV-K(C4)-Transkripte schließen, wobei vor allem das 5'- (LTR2) und 3'-Ende (LTR1) der Intermediate betroffen sind (und daher kein vollständiger Verdau der Hybride durch RNasen erfolgte) und demzufolge eine Fragmentierung der RNase Protection Assay Produkte Exon9/LTR2 sowie LTR1/Exon 10 resultiert. Die retroviralen Hybride gag, pol und env zeigten hingegen keine Nebenprodukte und sind vermutlich in diesem Bereich nicht von alternativen Spleißvorgängen betroffen. Aufgrund von Problemen bei der C4-Sondenherstellung konnte die C4-Expression nicht mittels RNase Protection Assays in den getesteten Zelllinien untersucht werden. Zum einen erwies es sich aus ungeklärten Gründen als schwierig, die gereinigte C4-cDNA (siehe Abb. 3.3) in den pGEM3Z Vektor zu klonieren, der besonders für die Synthese artifizieller RNA unter Verwendung einer T7 oder Sp6-RNA-Polymerase geeignet ist. Zum anderen konnte nach erfolgreicher Klonierung des C4-Inserts in den Vektor weder mit der T7- noch mit der Sp6- Polymerase ein RNA-Transkript mit spezifischer Länge von 504 bp im Polyacrylamid-Harnstoff-Gel nachgewiesen werden. Eine Ursache dafür könnte das Vorkommen von Abbruchsignalen innerhalb der klonierten C4-cDNA-Sequenz sein, wodurch die RNA-Polymerasen kein vollständiges RNA-Transkript synthetisieren konnten.

In den mittels RT-PCR und RNase Protection Assays durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis einer HERV-K(C4)-Transkription war es bislang nur möglich, einzelne Bereiche der HERV-K(C4)-Antisense RNA sowie das ungefähre 5'-und 3'- Ende zu analysieren. Eine Northern-Blot Analyse sollte daher klären, ob die nachgewiesenen Fragmente auf ein die komplette HERV-K(C4) Insertion von immerhin 6,4 kb umfassendes Transkript mit überlappenden zellulären Sequenzen der flankierenden C4-Exons 9 und 10 zurückzuführen ist oder sogar HERV-K(C4)-RNA Transkripte unterschiedlicher Größe nebeneinander existieren. Weiterhin sollte durch die Verwendung eines *Human 12-Lane Multiple Tissue Northern Blots* (siehe 3.1.3), der die poly(A<sup>+</sup>)-mRNA aus 12 verschiedenen Geweben und Zellen enthält, geklärt werden, ob HERV-K(C4) gewebespezifisch exprimiert wird. Die Northern-Blot Analyse zeigte, daß insgesamt 3 bis 4 bzw. 2 bis 3 mRNA Spezies unter Verwendung der radioaktiv markierten env- bzw. pol-Sonde mit einer Größe zwischen 1 bis 1,3 kb, 2 kb, 5 kb und 6,8 kb gewebespezifisch in unterschiedlicher Intensität detektiert werden konnten. Vor allem in der Lunge, Plazenta, Dünndarm, Leber, Skelettmuskel und Herz konnten prominente Signale nachgewiesen werden, die Transkripten mit einer Länge von 1 bis 1,3 kb und 2 kb entsprachen. Da das Provirus eine genomische Gesamtlänge von 6,4 kb aufweist, könnte es sich bei den in den peripheren Blutleukozyten, Lunge und Plazenta nachgewiesenen 6,8 kb Transkripten um die komplette HERV-K(C4)-Insertion einschließlich flankierender Bereiche des Exons 9 und 10 handeln. Die anderen drei subgenomischen mRNA Spezies, die in fast allen Geweben mit Ausnahme des Gehirns vorkamen, sind vermutlich durch einfaches oder differentielles Spleißen des größeren 6,8 kb Fragment am 3' oder 5' Ende sowie innerhalb der retroviralen Sequenzen entstanden und setzen sich vermutlich aus der U5-env-U3 Region bzw. gag/polRegion zusammen (Wang-Johanning et al., 2003; Löwer et al., 1993; Medstrand et al., 1993; Stauffer et al., 2004). In Abb. 4.1 ist ein Schema der möglichen multiplen Spleißvorgänge basierend auf den publizierten Ergebnissen von Löwer und Kollegen (1993) dargestellt, die im folgenden näher ausgeführt werden sollen. Es ist bekannt, daß aktive Proviren (z.B. HIV-1 und HTLV-1) ihre retrovirale mRNA differentiell spleißen. Es existieren multiple Spleißakzeptoren bzw. -donatoren zur Synthese jener mRNAs, von denen später die env-Proteine oder gag-pol-Fusionsproteine translatiert werden. Die Sequenzfolge zwischen der PB-Stelle und dem Beginn der gag-Gene bezeichnet man bei Retroviren als Leader-Region.



**Abb. 4.3:** Schematische Darstellung der Expression von (A) HERV-K in GH-Zellen im Vergleich zu (B) HERV-K(C4) (rot unterlegt) in verschiedenen humanen Zelllinien und Geweben (modifiziert nach Löwer et al., 1993). HERV-K(C4) wird aufgrund der Lage im C4-Gen im Gegensatz zu HERV-K in der Antisense Orientierung transkribiert. (Erklärung siehe Text und Abschnitt 1.2.3).

Hier befindet sich eine Spleißdonorstelle, die für die Produktion aller gespleißten mRNA-Moleküle verwendet wird (siehe Abb. 1.1). Während der Infektion findet man drei Größenklassen viraler mRNA: mehrfach gespleißte mRNA-Moleküle (codieren regulatorisch aktive Proteine (Rev, Nef und Tat), einfach gespleißte mRNA-Spezies (codieren für env und akzessorische Proteine Vif, Vpu, Vpr) und ungespleißte mRNA-Formen, (codieren für gag und gag/pol-Fusionsproteine), die dem ursprünglichen RNA-Genom entsprechen (Modrow und Falke, 1998). Für die HERV-K Familie konnte gezeigt werden, daß dieses Expressionsmuster beibehalten wurde und somit an die komplexen genregulatorischen Kontrollmechanismen aktiver Proviren erinnert, wie sie für Lenti- und Spumaviren bekannt sind. Stauffer (2004) postulierte daher, daß das HERV Provirus als ein retrovirales Gen angesehen werden kann, das sich aus einzelnen Translationseinheiten zusammensetzt. Löwer und Kollegen (1993) konnten für das HERV-K(10)+ Provirus (Ono et al., 1986), welches starke Homologien zu HERV-K(C4) aufweist, ebenfalls eine Expression von 4 viralen mRNA Spezies (1,5 kb, 1,8 kb, 3,3 kb, 8,6 kb) mittels Northern-Blot Analyse in GH und Tera2 Zellen (Humane Teratocarcinoma Zelllinien) identifizieren. Das seinerseits nachgewiesene 8,6 kb Transkript stellt die "full-length", d.h. die gesamte Provirus-Sequenz dar (siehe Abb. 4.3),

woraus die anderen RNA Spezies durch differentielles Spleißen hervorgehen. Medstrand und Kollegen (1993) gelang es mit Hilfe eines Multiplen Tissue Northern Blots (Clontech), die Expression von HML-mRNA Transkripten (*Human endogenous MMTV-like*) mit unterschiedlicher Länge von 12 bis 1.4 kb in der Lunge, im Skelettmuskel und in der Plazenta nachzuweisen. Dabei handelt es sich bei den 12 kb RNAs um retrovirale Transkripte, die zusätzliche zelluläre Sequenzen flankierender Gene enthalten. Das ebenfalls detektierte 8,6 kb große RNA-Transkript stellt das Provirus in der eigentlichen Gesamtlänge dar und entsteht durch noch nicht bekannte Spleißvorgänge, die auch bei der HERV-K(C4)-Prozessierung eine Rolle spielen könnten.

Weiterhin ist unklar, welche Sequenzabfolge das mittels der pol-Sonde nachgewiesene Transkript in der Lunge, im Skelettmuskel und Herz mit einer Länge von 1,3 bis 2 kb haben könnte (siehe Abb. 3.15 b). In den bisher publizierten Arbeiten konnten bisher noch keine HERV-K Transkripte mit einer Länge von ca. 1 bis 2 kb detektiert werden, die Sequenzen des pol-Gens einschlossen. Die meisten gespleißten HERV-K mRNAs dieser Größenordnung bestehen aus Sequenzen der U5-env-U3 Region (siehe Abb. 4.3) (Stauffer et al., 2004; Wang-Johanning et al., 2003; Medstrand et al., 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels Northern-Blot Analysen prominente Signale für Transkripte von ca. 1 bis 1,3 kb, die der Sequenz des env-Gens komplementär sind, in vier von 12 getesteten Geweben detektiert werden (Abb. 3.15 b). Im Gegensatz dazu konnten in fast allen Geweben Transkripte mit einer Länge von 2 und 5 kb nachgewiesen werden, wobei die Markierungsintensität sehr gering war. Dies gilt ebenfalls für das 6,8 kb Transkript, das äußerst schwach in den peripheren Blutleukozyten, Lunge und Plazenta detektiert werden konnte. Viele Retroviren bilden zu Beginn des Infektionszyklus überwiegend mehrfach gespleißte mRNA-Formen und im Verlauf einfache und ungespleißte m-RNA Formen, die für virale Strukturproteine und akzessorische Polypeptide codieren sowie als Virusgenom dienen. Da HERV-K(C4) nicht mehr translatiert wird, kann darüber spekuliert werden, ob die mehrfach gespleißten mRNA Spezies (1,3 kb Fragmente) gegenüber den anderen Formen in höherer Kopienzahl vorliegen. Letztendlich lassen sich alle Spleißprodukte von dem ursprünglichen retroviralen Transkript (6,8 kb) ableiten, welches daher wahrscheinlich in geringerer Kopienzahl vorliegt und somit schlechter detektierbar ist (Medstrand et al., 1993). Eine weitere Ursache könnte die Empfindlichkeit der Nachweismethode gewesen sein. Die Northern Blot Analyse ist kein sehr sensitives Verfahren, um low abundance Transkripte, d.h. mRNA Transkripte in geringer Kopienzahl, nachweisen zu können (Chen et al., 1997).

Aus den Ergebnissen der quantitativen RT-PCR (siehe 3.1.1.5 und nächster Abschnitt) geht z.B. hervor, daß HERV-K(C4)-Transkripte im Vergleich zu  $\beta$ -Aktin nur in geringer Anzahl in den getesteten Zellen vorliegen. In der Publikation von Löwer und Kollegen (1993) wird ebenfalls darauf hingewiesen, daß die Expression von HERV-K mit Hilfe der Northern Blot Analyse ausschließlich in Teratokarzinom-Zellen demonstriert werden konnte. Aus neuesten RT-PCR Studien geht jedoch hervor, daß die Familie der HERV-K Proviren im Gegensatz zu anderen HERV-Familien in zahlreichen, wenn nicht in allen humanen Zellen und Geweben (vor allem Muskel, Gehirn, Haut und Bauchspeicheldrüse) in unterschiedlicher Stärke exprimiert werden (Stauffer et al., 2004; Armbruester et al., 2002; Denner et al., 1995; Blomberg et al., 1995), was im Rahmen dieser Arbeit mittels RT-PCR, RNase Protection Assay und Northern-Blot Analysen ebenfalls für HERV-K(C4) bewiesen werden konnte. Es ist bekannt, daß viele Enhancer-Elemente (siehe Abb. 3.9), die generell die Promotoraktivität verstärken, nur in bestimmten Geweben, Zelltypen, Tierspezies oder während gewisser Stadien des Zellzyklus funktionieren (Urnovitz und Murphy, 1996). Das ist – neben spezifisch interagierenden Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszellen – eine Erklärung für den Gewebs- oder Zelltropismus der Retroviren. Das Glucocorticoid Response Element spricht z.B. gewebs- und/oder zelltypspezifisch auf Glucocorticoid-Hormone an und spielt eine große Rolle bei der Expression von MMTV und einigen Mitgliedern der HERV-Familien (Urnovitz und Murphy, 1996). Der Einfluß von Hormonen auf die Regulation der HERV-Expression konnte in diesem Zusammenhang für die HERV-K(10)-Familie nach Stimulation der humanen Brustkrebszelle T47D nachgewiesen werden (Ono et al., 1987). Weiterhin konnten Studien über die Regulation und Expression von HERVs im menschlichen Genom zeigen, daß die Transkription durch Methylierung herabreguliert werden kann (Florl et al., 1999; Gotzinger et al., 1996).

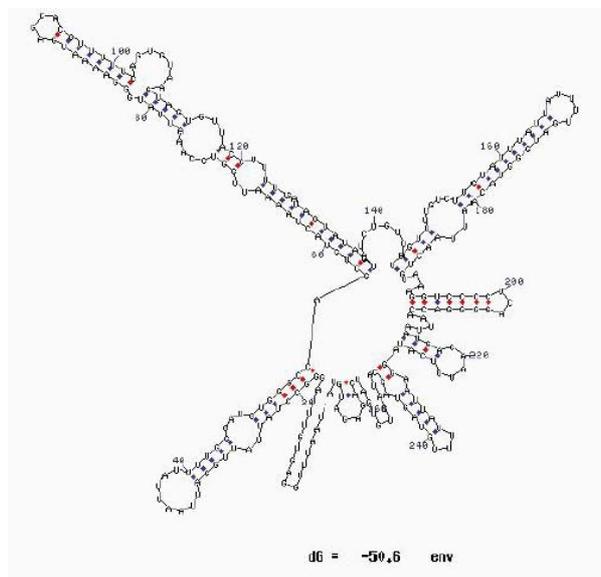
Da in die reverse Transkription 500 ng an poly(A<sup>+</sup>)-mRNA sowie die Hälfte des Gesamtvolumens an synthetisierter cDNA in die PCR zur Amplifikation der HERV-K(C4)-Transkripte eingesetzt werden musste (bei konstitutiv exprimierten Genen werden normalerweise 50-100 ng mRNA zum Nachweis in die RT-Reaktion eingesetzt) sowie in der Northern Blot Analyse teilweise nur schwache Signale erzielt wurden, handelt es sich bei den nachgewiesenen HERV-K(C4)-Transkripten vermutlich um low abundance mRNAs. Die Anzahl der Kopien von HERV-K(C4)-spezifischen Transkripten wurde daher quantitativ mittels Real-Time PCR in HepG2-, Leberfibroblasten-, MonoMac6-, HS27-, CD4<sup>+</sup>T- und B-Zellen bestimmt. Dies war von besonderer Bedeutung für die anschließend durchgeführten

Untersuchungen zur Antisense-Abwehrstrategie, da ein ausreichender Schutz gegen homologe, exogene Retroviren nur durch ausreichende Kopienanzahl an Antisense HERV-K(C4)-Transkripte im Zytoplasma sowie im Zellkern vermittelt werden kann.

Die quantitative RT-PCR wurde im Light Cycler unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBRGreenI und DNA-Standards durchgeführt. Die ermittelte Kopienanzahl an HERV-K(C4)-Antisense Transkripten in  $1 \times 10^6$  Zellen lag zwischen  $9 \times 10^3$  in T-Zellen und  $2.2 \times 10^5$  Zellen in HepG2-Zellen, wobei die Kopienanzahl der gag- und pol-Transkripte innerhalb einer Zelllinie korrelierten. Im Vergleich dazu lagen die Kopienzahlen für  $\beta$ -Aktin, welches als interne Expressionskontrolle diente, im Durchschnitt mit einer Anzahl von  $10^2$  Kopien höher. Das Verhältnis von  $\beta$ -Aktin zur HERV-K(C4)-mRNA steht im Einklang mit Daten aus publizierten Arbeiten, in denen  $\beta$ -Aktin mit einer Kopienzahl von 1000 bis 3000 Kopien pro Zelle und low abundance Transkripte mit 1 bis 30 Kopien pro Zelle bestimmt wurde (Femino et al., 1998; Nelson et al., 1999; Wang-Johanning et al., 2003; Ogasawara et al., 2001). Die Expressionsraten von HERV-K(C4) als auch von  $\beta$ -Aktin waren in den getesteten Zelllinien unterschiedlich hoch (siehe Abb. 3.10); vor allem in der Hepatomzelllinie HepG2 konnte die stärkste Expression des HERV-K(C4)-Provirus nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit den erzielten Ergebnissen aus den RT-PCR, RNase Protection Assay und Northern Blot Analysen, in denen ebenfalls eine zelltypspezifische Expression von HERV-K(C4) aufgrund unterschiedlicher Signalstärken gezeigt werden konnte. Da C4 hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird, war zu erwarten, daß vor allem in den Leberzellen und -geweben eine erhöhte Transkription stattfindet. Außerdem konnte in mehreren Untersuchungen zur HERV-Expression gezeigt werden, daß diese vor allem in Krebszelllinien und Geweben in überdurchschnittlich hohem Maße transkribiert werden (Depil et al., 2002; Stauffer et al., 2004; Löwer et al., 1993). Eine zelltypspezifische Expression von HERV-K(C4) könnte durch den Einfluss von Hormonen (Ono et al., 1987) und Zytokinen (Zachar et al., 2004) auf regulative Elemente sowie der Methylierung bestimmter Sequenzabschnitte (Florl et al., 1999; Gotzinger et al., 1996) gegeben sein und konnte bereits für viele HERV-Familien gezeigt werden (Yi et al., 2004; Stauffer et al., 2004).

In den Leberfibroblasten hingegen war eine Quantifizierung von HERV-K(C4)-Transkripten nicht möglich, obwohl die  $\beta$ -Aktin Expression mit einer Kopienzahl von  $1,3 \times 10^7$  vergleichbar mit der HepG2-Zelllinie ( $3,3 \times 10^7$ ) ist. Dies war zu erwarten, da sich die Amplifikation der retroviralen Transkripte mittels RT-PCR generell in dieser Zelllinie als schwierig erwies und ausschließlich durch die RNase Protection Assays detektiert werden konnte. Eine

verminderte Stoffwechselaktivität als Ursache für die geringe Transkription kann somit aufgrund der nachgewiesenen  $\beta$ -Aktin-Expression ausgeschlossen werden. Weiterhin gelang es nicht, das retrovirale env-Gen mittels Real-Time RT-PCR nachzuweisen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß die ermittelten Kopienzahlen der untersuchten mRNAs insgesamt sehr niedrig lagen, wobei das Verhältnis zwischen HERV-K(C4) und  $\beta$ -Aktin korrelierte. Dies kann mehrere Ursachen haben: Zum einen liegt die Effizienz, mit der mRNA durch die reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird, bei durchschnittlich 80%. Es ist anzunehmen, daß einige Transkripte aufgrund von Abbruchreaktionen während der Synthese nicht vollständig revers transkribiert werden. Zum anderen kann die Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen die Effizienz der reversen Transkription herabsetzen. Eine Analyse über die Bildung von Sekundärstrukturen (siehe 2.1.12; Zuker, 2003) innerhalb der HERV-K(C4)-RNA ergab, daß diese zahlreiche stabile Sekundärstrukturen bzw. Loops ausbildet: Für das env-RNA Transkript konnte eine  $T_m$  von 72.1 und eine Loop-Energie von  $dG = -50,64$  ermittelt werden (siehe Abb. 4.4).



**Abb. 4.4:** Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb der einzelsträngigen env-RNA

Ebenfalls war eine Quantifizierung der C4-Expression aufgrund eines Fehlers bei der Amplifikation des mitgeführten Referenzstandards bekannter Ausgangskonzentration nicht möglich. Anhand der Schmelzkurven (siehe Abb. 3.11) und gelelektrophoretischer Auftrennung der Produkte (nicht gezeigt) war zu erkennen, daß die aus den Zelllinien isolierten C4-Transkripte unter Verwendung spezifischer Primerpaare amplifiziert werden

konnten und somit eine C4-Expression belegen. Da die Expression des HERV-K(C4) Provirus im Verhältnis zu der des C4-Gens analysiert werden sollte, wurde der C4-Referenzstandard im Rahmen der Diplomarbeit von Beißmann (2004) neu konstruiert und die quantitativen Analysen unter Verwendung von RNA-Standards wiederholt. Hierzu wurden die gag-, pol- und env-pGEM3Z Konstrukte aus den RNase Protection Assays verwendet, mittels derer unter Verwendung der Sp6 Polymerase HERV-K(C4)-Antisense RNA synthetisiert werden konnten (siehe 2.2.5, 2.2.6.1.2). Bekannte Ausgangskonzentrationen an synthetisierten spezifischen RNA-Transkripten wurden parallel in den RT-Reaktionen mitgeführt und dienten im Anschluß als Standards zur Quantifizierung der HERV-K(C4)- als auch der  $\beta$ -Aktin- und C4-Transkripte in HepG2-, MonoMac6 und B-Zellen. Durch die Verwendung von RNA-Standards konnten somit Ungenauigkeiten bei der RT-Reaktion sowie während der Amplifikation in der PCR ausgeglichen werden, da diese unter den gleichen Bedingungen parallel mitgeführt werden. Die von Beißmann (2004) ermittelte Kopienzahlen an HERV-K(C4)-Transkripten lagen im Bereich zwischen  $2,2 \times 10^6$  in B-Zellen und  $5 \times 10^8$  in HepG2-Zellen. Im Vergleich dazu lag die Aktin Expression durchschnittlich um  $10^2$  Kopien bzw. um ein 150 bis 600faches höher.

Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit, wobei die ermittelten Kopienzahlen insgesamt um  $10^2$  Kopien in der Arbeit von Beißmann höher lagen. Die C4-Expression konnte von Beißmann (2004) mit  $2 \times 10^9$  Kopien in den MonoMac6-Zellen, mit  $1 \times 10^{11}$  in der HepG2-Zelllinie und  $7,5 \times 10^8$  in B-Zellen quantifiziert werden. Ein Vergleich mit der Expressionsrate des  $\beta$ -Aktin Gens zeigte, daß beide zellulären Gene in den untersuchten Zelllinien in vergleichbar hoher Kopienzahl vorliegen, ausgenommen der HepG2-Zelllinie, in der die C4-Expression um ein 100faches höher ist. Im Gegensatz dazu liegt die Expressionsrate von C4 sowie die von  $\beta$ -Aktin im Vergleich zu HERV-K(C4) in allen getesteten Zelllinien im Durchschnitt um  $10^2$  Kopien höher. Es ist anzunehmen, daß durch Stimulation der Zellen mit Zytokinen die Transkription von HERV-K(C4) erhöht werden könnte. Katsumata und Kollegen (1999) konnten für das HERV-R Virus zeigen, daß dieses unter dem Einfluß von TNF- $\alpha$ , IL-1- $\alpha$  und IL1- $\beta$  in vaskulären Epithelzellen hochreguliert und durch IFN- $\gamma$  herunterreguliert wird. IFN- $\gamma$  könnte auch einen wesentlichen Einfluß bei der Regulation der HERV-K(C4)-Transkription spielen, da bereits Schneider und Kollegen (2001) indirekt eine Erhöhung durch die Blockierung der Translation von HERV-K(C4)-Sense-Transkripten aufzeigen konnten. Es bleibt jedoch weiterhin unklar, welchen Regulationsmechanismen die HERV-K(C4)-Transkription zu Grunde liegen und durch

welchen Promotor diese induziert werden. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß die HERV-K(C4)-Transkripte im Zusammenhang mit der C4-Expression entstehen. Bisher gibt es keine Hinweise auf die Existenz eines Promotors 5' des LTR2, der unabhängig von der C4-Expression eine HERV-K(C4)-Transkription initiieren könnte, und wodurch ein C4/HERV-K(C4)-Intermediat entstehen würde.

## 4.2 Die Bedeutung der HERV-K(C4)-LTRs

Retroviren werden von langen, direkten Sequenzwiederholungen (long terminal repeats, LTRs) flankiert, die aufgrund des viralen Replikationsmechanismus nach Infektion der Wirtszelle entstehen (siehe Abb. 1.7). Neben den cis-agierenden, repetitiven Sequenzelementen, die für die Transposition und Integration des reversen Transkripts eine Rolle spielen, sind regulatorische Elemente für die Expression der retroviralen Gene in den LTRs lokalisiert. Die HERV-K(C4)-LTRs bestehen wie die anderen Retroviren aus den Elementen U3, R und U5 (siehe Abb. 1.1 B). Die Promotorsequenzen sind im U3-Element lokalisiert und ein Signal für die Polyadenylierung zwischen R und U5 (Modrow und Falke, 1998). Homologe Sequenzen zu regulatorischen Proteinen sind in beiden LTRs nachweisbar (siehe Abb. 4.5) (Chu et al., 1995; Dangel et al., 1994). Beide LTRs besitzen eine TATA-Box (TATAAA), den wichtigsten Bestandteil der meisten eukaryotischen Promotoren, der den Transkriptionsfaktor TFIID bindet und dadurch eine Transkription initiiert. Dazu kommen eine SV 40 Enhancer-Sequenz (GTGGAAAG), die bei dem Affenvirus SV40 (Weiher et al., 1983) und auch bei HIV vorkommt (Starcich et al., 1985) und die Genexpression verstärkt, sowie das sogenannte C/EBP-CS1-Element, das die Genexpression des humanen Herpesvirus 6 stimuliert (Thompson et al., 1994). Neben den Signalen für die Initiation der Transkription finden sich auch typische Terminationssignale, wie das Polyadenylierungssignal (AATAAA) und dazu in konserviertem Abstand das terminale Signal (TTTTG...TTTTG) (Birnstiel et al., 1985; Arkhipova et al., 1986). Das Poly-A-Signal in LTR2 ist jedoch durch eine T/A Mutation zerstört worden.

Die im Rahmen dieser Arbeit mittels PCR aus dem C4A91-Gen amplifizierte LTRs haben eine Länge von 548 bp (LTR1) bzw. 550 bp (LTR2) (siehe 3.2.1). Die Sequenzanalyse der beiden LTRs zeigte, daß alle oben beschriebenen regulatorischen Elemente in der Sequenz beider LTRs nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 4.5). Ein Sequenzvergleich der beiden LTRs untereinander ergab eine Sequenzidentität von 89,6%. Die beiden LTRs unterscheiden sich in insgesamt 57 Nukleotiden voneinander (Mack, 2000).



Die Integration des HERV-K(C4)-Retrovirus in das Intron 9 eines monomodularen ancestralen C4-Gens erfolgte vor mehr als 23 Mio. Jahren in umgekehrter Orientierung zum C4 codierenden Strang, und zwar nach der Separation der Altweltaffen von den Neuweltaffen (Schneider, 1995; Chu et al., 1995; Sverdlov, 2000). In der Sequenz der HERV-K(C4)-Proviren haben sich daher im Laufe der Evolution zahlreiche Punktmutationen und Minideletionen nicht nur in den retroviralen Genen, sondern auch in beiden LTRs angesammelt (siehe Abb. 4.5). Da in beiden HERV-K(C4)-LTRs regulative Sequenzelemente nachgewiesen werden konnten (Dangel et al., 1994; Chu et al., 1995), stellte sich die Frage, ob sie die Transkription eigener und wirtsspezifischer Gene initiieren können oder aufgrund der Mutationen inaktiv geworden sind. In diesem Zusammenhang konnte für viele auch einzeln im Genom vorkommende LTRs nachgewiesen werden, daß sie ihre Funktion als Promotoren behalten haben (Vinogradova et al., 2001; Buzdin 2003; Domansky et al., 2000). In Untersuchungen an menschlichen Zelllinien konnten Transkripte isoliert werden, die durch endogene retrovirale LTRs initiiert (Liu et al., 1991; Feuchter et al., 1992) oder polyadenyliert wurden (Goodchild et al., 1992; Feuchter-Murthy et al., 1993).

Die Untersuchungen zur Promotoraktivität der LTRs orientierten sich an den Ergebnissen von Dangel und Kollegen (1994), die mit Hilfe eines CAT-Assays (Gorman, 1985) ebenfalls die Promotoraktivitäten der HERV-K(C4)-LTRs untersucht haben. Dabei wurden beide LTRs in jeweils beiden Orientierungen in die MCS eines SV40-CAT-Expressionsvektors kloniert, der als Reportergen das Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen enthält. Die Aktivitäten dieser LTR-CAT-Konstrukte wurden nach Transfektion mittels Elektroporation verschiedener Zelllinien (aus einem Dickdarm-Karzinom (*HT29*); zervikalem Epithel (*HeLa*), prä-B-Zellen (*Nalm6*), einem Neuroblastoma (*IMR32*) und Schimpansen Fibroblasten (*WES*)) über die Menge an exprimierter Chloramphenicol-Transferase bestimmt. Aus den transfizierten Zellen wurden Proteinextrakte hergestellt, in denen man die Aktivität des CAT-Enzyms, die proportional zur Promotoraktivität ist, durch Überführung von  $C^{14}$ -markiertem Chloramphenicol in seine acetylierten Formen mißt (Donor: Acetyl-CoA). Unverändertes Chloramphenicol, mono und diacetylierte Formen, lassen sich durch Dünnschicht-Chromatographie voneinander trennen und durch Autoradiografie nachweisen. Dabei zeigte sich, daß lediglich der LTR2 in Antisense Orientierung (bezogen auf die Transkriptionsrichtung der HERV-K(C4)-Transkripte, siehe Abb. 3.1) in den Zelllinien WES, HT29, HeLa und Nalm6 funktionell aktiv war, wobei der Promotor in HeLa- und Nalm6-

Zellen im Vergleich zur negativen Kontrolle nur schwache Aktivität zeigte. Der LTR1 war hingegen in beiden Orientierungen stets inaktiv.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf den Einsatz von Radioaktivität verzichtet und statt dessen ein Reportergensystem etabliert, mit dem die Promotoraktivitäten der LTRs in beiden Orientierungen über die Aktivität des Reportergens Luciferase bestimmt werden konnten (siehe Abb. 3.19 und 3.20). Dabei erwies sich die lipidvermittelnde transiente Transfektion als eine effiziente Methode, die zu untersuchenden Plasmide in verschiedene Zelllinien einzuführen, was in meiner Diplomarbeit unter Verwendung eines  $\beta$ -Galaktosidase Reportergensystems und anschließender in-situ-Färbung gezeigt werden konnte. Als Zelllinien zur Analyse der generellen LTR-Promotoraktivitäten wurden die humane Hepatomzelllinie HepG2 und die Affen-Nierenzellen COS7 gewählt (siehe 2.1.9). Beide stammen von Säugetieren ab, aber von unterschiedlichen Gewebetypen, so daß sie sich in der Expression bestimmter Gene und somit in der Ausstattung an Proteinen wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Regulatorproteinen und Zytokinen unterscheiden. Diese wirken auf regulatorische Sequenzen im Promotor und legen somit prinzipiell fest, welche Zelle unter welchen Bedingungen ein Gen exprimiert.

Die humane HepG2-Zelllinie exprimiert die beiden C4-Isotypen konstitutiv. Zudem konnten mittels RT-PCR HERV-K(C4)-Transkripte nachgewiesen werden (Schneider et al., 2001a, vorliegende Arbeit), so daß sie die erste Wahl für die Untersuchungen waren. Wie oben schon erwähnt, ist bisher unklar, ob die HERV-Transkripte primär auf die Transkription der C4-Gene oder auch auf eine C4-unabhängige Promotoraktivität des LTR2 zurückzuführen sind. Da die gemessene Luciferase-Aktivität nach transients Transfektion der LTR-Reportergen-Konstrukte in geeignete Zelllinien im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen einzig auf die Aktivität des jeweiligen LTRs zurückzuführen ist (eukaryotische Zellen exprimieren keine Luciferase), wurde hierdurch eine Unterscheidung möglich. COS7-Zellen enthalten in ihrem Genom ebenfalls die retrovirale Insertion ERV-K(C4) (Dangel et al., 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ausschließlich eine Aktivität des LTR2 Promotors in beiden untersuchten Zelllinien nur in der Sense-Orientierung des ursprünglichen Retrovirus nachgewiesen werden, nicht jedoch in der von Dangel und Kollegen (1994) beschriebenen Antisense-Orientierung. Der LTR2-Sense Promotor zeigte eine signifikante Aktivität von 15675 RLU/sec. in den HepG2-Zellen und 16645 RLU/sec. in den COS7-Zellen, die mit der gemessenen Aktivität von 17599 RLU/sec. in der positiven Kontrolle vergleichbar ist, also mit einem starken SV40-Promotor. In den negativen Kontrollen konnten keine

Hintergrundsignale detektiert werden. Für den LTR1-Promotor konnte dagegen in beiden Zelllinien und in beiden Orientierungen keine Aktivität festgestellt werden (siehe Abb. 3.20). Die Aktivitäten lagen z.B. mit 539 bis 1116 RLU/sec. nur geringfügig höher als in der negativen Kontrolle mit 517 RLU/sec. in den HepG2-Zellen. Dies wiederum steht im Einklang mit dem Ergebnis von Dangel und Kollegen (1994). Die mittels PCR generierten LTR-Fragmente, die in den Reportergenvektor kloniert wurden, enthielten am 5'- sowie am 3'-Ende Teile des Intron 9 und der HERV-K-Insertion (siehe Abb. 3.17). Diese wurden im Vorfeld in beiden Orientierungen auf ihre Sequenz überprüft. Es konnten keine Startcodons in einem der drei Leserahmen detektiert werden, die nicht durch ein Stopcodon wieder aufgelöst wurden. Somit wurde ein vorzeitiger Translationsbeginn im falschen Leserahmen verhindert, der sonst trotz eines aktiven Promotors bei dem Reportergen-Assay keine Enzymexpression erlaubt hätte. Da bei funktionell aktiven Retroviren LTR1 als Promotor die Transkription der viralen Gene gag, pol und env initiiert, kann davon ausgegangen werden, daß HERV-K(C4) nicht mehr in codierender Richtung, also in Sense-Orientierung (siehe Abb. 4.1), transkribiert werden kann. Da die retroviralen Gene zudem aufgrund zahlreicher Mutationen nicht mehr exprimiert werden können, hat LTR1 wahrscheinlich seine Funktion als Promotor im Laufe der Evolution verloren. Zudem ist das Poly-A-Signal durch einen T/A-Austausch im LTR2 zerstört (siehe Abb. 4.5), wodurch zusätzlich die Entstehung stabiler HERV-K-Transkripte verhindert wird.

Die Daten in der vorliegenden Arbeit sprechen somit eher gegen eine vom LTR2 kontrollierte C4-unabhängige Antisense-Aktivität. Es ist jedoch unklar, worauf die beobachteten Unterschiede zu den Daten von Dangel und Kollegen (1994) zurückzuführen sind. Eine Möglichkeit liegt in der Tatsache, daß seinerzeit Zelllinien verwendet wurden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen, ausgenommen der HT29-Zelllinie. Es war jedoch nicht möglich, die Promotorkonstrukte mittels Lipidtransfektion sowie zwei Systemen der Elektroporation (Gene Pulser II System und Biolistic Partikel System) in ausreichender Menge in die HT29 Zelllinie zu transfizieren und somit die Daten zu vergleichen. Daher ist nicht auszuschließen, daß der LTR2 Promotor zelltypspezifische Aktivität aufweist. Dangel und Kollegen (1994) haben in ihrer Studie über die Promotoraktivität unterschiedlich starke Aktivitäten des LTR2-Antisense abhängig von der transfizierten Zelllinie nachweisen können (siehe oben). Eine mögliche Ursache dafür wurde jedoch nicht genannt. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit haben Domansky und Kollegen (2000) die Promotoraktivität von einzeln im Genom vorkommenden LTRs mittels eines Luciferase-Reportergensystem in der

menschlichen Teratokarzinom Zelllinie NT2/D1 bestimmt. Das Vorhandensein solcher singulärer LTRs im Genom, z.B. Chromosom 4 und 19, ist u.a. darauf zurückzuführen, daß ein ehemals komplettes Retrovirus durch Rekombination der flankierenden homologen LTRs (intrachromosomale Rekombination) zum Teil ausgeschnitten worden ist (Chu, 1995; Domansky et al., 2000), die LTRs aber aufgrund eines positiven Selektionsmechanismus im Genom erhalten geblieben sind. Mittels dieses Systems konnte für die HERV-K-LTRs der HML-2 Subfamilie (23280, 24321 und 29471 LLNL Cosmid Klon) eine schwache bidirektionale Aktivität der LTR-Promotoren bestimmt werden. Die relative Luciferase-Aktivität lag dabei zwischen 6-10% in Bezug auf die Aktivität des SV40-Promotors einer positiven Kontrolle. Die (HML-6)-5'LTRs einer HERV-K-T47D Subfamilie zeigten dagegen nur in Sense-Orientierung relativ zum Reporter gen eine Aktivität. Eine bidirektionale Aktivität konnte ebenso für mehrere endogene Retrovirus-ähnliche Elemente RTVL-H (Feuchter und Mager, 1990) und IAP-LTRs (Christy und Huang, 1988) mittels eines CAT-Assays in verschiedenen Zelllinien (z.B. COS-1, HepG2) nachgewiesen werden, wobei die Aktivitäten heterogen waren. Festzuhalten ist, daß in mehreren Studien für verschiedene HERV-K- und RTVL-LTRs eine bidirektionale Aktivität bestimmt werden konnte, abhängig von der getesteten Zelllinie.

Es kann daher spekuliert werden, ob der HERV-K(C4)-LTR2 Promotor ebenfalls zelltypspezifisch aktiv ist, sowohl in der nachgewiesenen Sense als auch in der von Dangel und Kollegen nachgewiesenen Antisense-Orientierung. In einer Studie über die Expression des endogenen Retrovirus HTDV/HERV-K konnte diesbezüglich die Bindung des zellulären Transkriptionsfaktors Ying Yang 1 (YY1) an das 5'-Ende der Enhancer-Sequenz des 5'-LTRs nachgewiesen werden (Knössel et al., 1999), d.h. YY1 ist eine Komponente des HERV-K-Enhancer-Komplexes. YY1 ist ein wichtiger Faktor der HERV-K-Enhancer bindenden Proteine in humanen Teratokarzinom- (GH und Tera 2), Hepatom- (HepG2) und zervikalen Karzinom-Zellen (HeLa). Erstaunlicherweise konnte das DNA-bindende Zinkfingermotiv des Transkriptionsfaktors YY1 bzw. die core-Consensus-Sequenz (CCATNTT) (Shrivastava und Calame, 1993) in allen daraufhin untersuchten HERV-K-LTRs gefunden werden (Knössel et al., 1999), so auch in der Sequenz der beiden HERV-K(C4)-LTRs an den Positionen 613-620 (LTR1) und 395-402 (LTR2), die im Rahmen meiner Diplomarbeit in der Sequenz analysiert wurden (siehe Abb. 4.5). Da YY1 zusammen mit anderen Faktoren die Aktivität, Repression und Initiation der Transkription vermittelt, könnte das Protein auch in Bezug auf die zelltypspezifische Promotoraktivität des LTR2 in der HepG2- sowohl als auch in der COS7-

Zelllinie eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang konnte in der Sequenz von 45 LTRs der HERV-K-Familie auf Chromosom 19 5' vom Enhancer-Element eine homologe Sequenz (TGTTAT) zu einem HRE-Element (*Hormone responsive element*) nachgewiesen werden, dessen Funktion unbekannt ist, jedoch eine Rolle bei der zelltypspezifischen Aktivität der LTRs spielen könnte (Lavrentieva et al., 1998; Vinogradova et al., 1997; Sverdlov, 2000). Vinogradova und Kollegen (2001) konnten mittels RT-PCR zeigen, daß die Aktivität der LTRs abhängig von der Zelle, deren Ausstattung (z.B. Zytokine) und äußeren Faktoren ist, d.h. LTRs können in verschiedenen Zellen verschiedene Aktivität zeigen. Die Studien bezüglich der Aktivität der LTRs zeigen einheitlich, daß 1. ein LTR, der als Promotor in einer bestimmten Zelle die Transkription induzieren, 2. in einer anderen Zelllinie als Transkriptionsterminationssignal dienen sowie 3. in reverser Orientierung Aktivität zeigen kann (Domansky et al., 2000; Vinogradova et al., 2001; Casau et al., 1999).

Zytokine können die Replikation und Genexpression von Retroviren durch Induktion zellulärer Transkriptionsfaktoren, z.B. NF $\kappa$ B, beeinflussen, die auf der Ebene von Promotor-Enhancer-Sequenzen wirken (Urnovitz und Murphy, 1996). Mittels RT-PCR konnte die Expression multipler Zytokingene in differenzierten HepG2-Zellen bestimmt werden (Stonans et al., 1999). Zytokine sind an der Regulation einer großen Anzahl leberzellspezifischer Funktionen beteiligt und könnten daher in bezug auf die Aktivität des LTR2 eine bedeutende Rolle spielen. HepG2-Zellen exprimieren die mRNAs für Interferon-gamma, Tumor Nekrosis Faktor alpha (TNF-alpha), Transforming Growth Factor beta (TGF-beta), Makrophage Colony-Stimulating factor (M-CSF), Oncostatin-M (OSM), Intercellular Adhesion Molecule (ICAM-1), Interleukin 4 (IL-4), IL-5, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 und IL-6 (Stonans et al., 1999). In den Untersuchungen von Schneider und Kollegen (2001a) zur Antisense-Abwehrstrategie (siehe 1.2.3) konnte diesbezüglich gezeigt werden, daß nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  eine signifikante Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität durch Heteroduplexbildung von exogen zugeführten Sense- und endogen induzierten HERV-K(C4)-Antisense-Transkripten detektiert werden konnte. Diesbezüglich konnte eine Induktion der endogenen Expression des Superantigen-SA $\gamma$  (env-Gen) des HERV-K18 Locus sowie der viralen Infektion von humanen Zellen durch das Epstein Barr-Virus durch IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden (Stauffer et al., 2001; Sutkowski et al., 2001).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die LTR-Promotoraktivität nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  in der HepG2 und COS7-Zelllinie und IL-6 in COS7-Zelllinie im Hinblick auf eine mögliche induzierte LTR2-Antisense Aktivität untersucht. Sowohl IFN- $\gamma$  als auch IL-6

spielen im Rahmen der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort eine bedeutende Rolle. Die Transfektionsstudien der vorliegenden Arbeit zeigten, daß nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  und IL-6 keine Aktivität sowohl des LTR1 in beiden Orientierungen als auch des LTR2 in der Antisense Orientierungen nachgewiesen werden konnte. Die Aktivitäten entsprachen denen in den unstimulierten Ansätzen (siehe 3.2.1.2). Interessanterweise nahm die Aktivität des LTR2-Sense Promotors nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  in beiden Zellen signifikant um 23% in der HepG2-Zelllinie und um 50% in der COS-7 Zelllinie ab. In der parallel mitgeführten Positivkontrolle konnte keine Abnahme der Luciferase-Aktivität detektiert werden, so daß diese einzig und alleine auf den Promotor und nicht auf eine durch das Zytokin verminderte Syntheseleistung der Zelle zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang konnte für das HIV-Virus mittels eines Luciferase-Reportergensystems gezeigt werden, daß IFN- $\gamma$  hemmend auf die HIV1-Replikation und somit auf dessen retroviralen Promotor wirkt (Zachar et al., 2004; Koyanagi et al., 1988). TNF- $\alpha$  scheint dagegen die HIV-Expression in menschlichen Monozyten zu aktivieren (Tadmori et al., 1991). Nach Stimulation mit IL-6 konnte keine Veränderung der LTR2-Sense Promotoraktivität in den HepG2-Zellen detektiert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsstudien zeigen deutlich, daß eine Erhöhung der HERV-K(C4)-Antisense Transkripte durch IFN- $\gamma$  nicht auf den LTR2-Antisense Promotor zurückgeführt werden kann, da dieser sowohl in den unstimulierten als auch in den stimulierten Zellen keine Aktivität zeigte. Somit können die mittels RT-PCR, RNase Protection Assays und Northern-Blot-Analysen detektierten HERV-K(C4)-Antisense Transkripte nicht durch den LTR2-Antisense-Promotor, also unabhängig von der des C4-Gens, induziert worden sein. Dies steht im Einklang mit der RNA-Struktur der nachgewiesenen Transkripte, die Sequenzen von C4/Exon10 und Exon9 einschlossen. Das Vorkommen solcher "readthrough" Transkripte (siehe oben) konnte in diesem Zusammenhang für mehrere HERV-Familien ebenfalls gezeigt werden. Das humane HERV-R-Provirus generiert z.B. ein Hybridtranskript, ausgehend von seinem 5'LTR (LTR1) zusammen mit einem downstream gelegenen Gen (*H-plk*), das ein Zinkfingerprotein codiert (Kato et al., 1987). Ebenso wurde ein Hybridtranskript zwischen HERV-H und dem zellulären Gen *PLA2L* nachgewiesen, welches zwei Phospholipase A<sub>2</sub> homologe Domänen enthält (Feuchter-Murthy et al., 1993). Der Zusammenhang zwischen der Expression des C4-Gens und des in diesem integrierten Provirus wird durch die RT-PCR Analysen bestätigt, mit denen in allen HERV-K(C4) exprimierenden Zellen auch eine C4-Expression nachgewiesen werden konnte.

Andererseits eröffnet die Tatsache, daß der LTR2 in der Sense Orientierung Promotoraktivität besitzt, die zu einem C4-Antisense-Transkript in Richtung auf das 5'-Ende des C4-Gens führen würde, weitere Spekulationen über die Beeinflussung der Genexpression durch LTRs im Sinne der Beobachtungen von Buzdin und Kollegen (2003), die die Verteilung und Orientierung von HERV-K LTRs in Introns menschlicher Gene untersucht haben. Bei einer genomweiten Suche mit einer HERV-LTR Consensus-Sequenz wurden 142 Insertionen im Genom gefunden, von denen 12 in Introns von exprimierten Genen lokalisiert waren. Von diesen waren 10 LTRs nur beim Menschen und nicht beim Schimpansen vorhanden, und neun von diesen waren in umgekehrter Orientierung zur codierenden Richtung des Wirtsgens angeordnet. Dies belegt eindeutig eine Begünstigung der Antisense-Orientierung derartiger LTRs bei intragenischer Lokalisation und bestätigt somit indirekt die unserem Projekt zugrunde liegende Arbeitshypothese, daß die komplette retrovirale Insertion als "protektiver" Selektionsmarker erhalten wurde. Für viele HERVs und singuläre LTRs konnte gezeigt werden, daß sie in der Nähe oder innerhalb eines Genortes lokalisiert sind (Sverdlov, 2000; Andersson et al., 1998). Über die funktionelle Bedeutung der LTRs wurde bisher nur spekuliert. Es wird angenommen, daß endogene HERV-K-LTRs nicht nur die Expression ihres eigenen downstream gelegenen Provirus regulieren, sondern auch die Expression benachbarter zellulärer Gene beeinflussen (Knössel et al., 1999; Buzdin et al., 2003). Domansky und Kollegen (2000) diskutierten, ob die singulären LTRs durch ihre bidirektionale Aktivität in der Lage sind, die Transkription sowohl down- als auch upstream gelegener Gene zu initiieren. Für ein endogenes retrovirales Element der HERV-E-Familie konnte mit Hilfe von transgenen Mäusen gezeigt werden, daß es für die gewebespezifische Expression der menschlichen Amylasegene verantwortlich ist (Samuelson et al., 1990; Ting et al., 1992; Leib-Mösch und Seifarth, 1996). RTVL-H-LTRs z.B. enthalten regulatorische Sequenzen in der U3-Region, welche eine Steigerung der Transkription des menschlichen beta-Globin Promotors bewirken können (Feuchter und Mager, 1990). Der 3'-LTR (LTR2) des Maus intracisternen A Partikels (IAPs) z.B. initiiert die Transkription des Homeo-Gens, Hox-2.4 (Kongsuwan et al., 1989).

Buzdin und Kollegen (2003) postulierten ebenfalls, daß LTRs aufgrund ihrer umgekehrten Orientierung in bezug auf die Transkriptionsrichtung des zellulären Gens (wie z.B. HERV-K(C4)) in die Antisense-Regulierung zellulärer Gene involviert sind. Es gibt viele Hinweise über die bedeutende Rolle von Antisense-Transkripten bei der Regulation von Sense-Genen in Prokaryonten als auch in Eukaryonten einschließlich des Menschen (Wagner und Simons,

1994; Vanhée-Brossolet et al., 1998). Diese Antisense-Nukleinsäuren entstehen durch reverse Transkription des nicht-codierenden Stranges von sonst normal exprimierten Genen (Adelman et al., 1987). Als zentrales Ereignis für die Wirkung von Antisense-Nukleinsäuren kann die Hybridisierung mit dem Transkript des zu hemmenden Gens angesehen werden. Diese Hybridisierung kann sowohl im Kern als auch im Zytoplasma erfolgen und löst dadurch unterschiedliche Inhibierungsmechanismen aus.

Die Hybridisierung *im Kern* führt in den meisten Fällen zur Degradation des Heteroduplex-Moleküls (Robertson, 1990). Die Neutralisation der Ziel-mRNA liegt in der Hemmung von Spleißvorgängen oder der Blockierung des mRNA-Exports aus dem Kern (Kumar und Carmichael, 1997). Es konnten in diesem Zusammenhang bereits stabile Duplices nachgewiesen werden, die durch Hemmung des Transportes die Genexpression inhibieren (Kim und Wold, 1985). Ob eine Heteroduplex-Bildung tatsächlich zustande kommt, hängt von einer Reihe von Faktoren ab. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen oder RNA-bindenden Proteinen kann z.B. die Hybridisierung erschweren.

Im *Zytoplasma* kann die Translation an den Ribosomen durch die Ausbildung von RNA:RNA-Hybriden verhindert werden. Eine solche Unterdrückung der Genexpression durch Antisense-Transkripte wurde z.B. 1986 erstmals von Jäckle und Kollegen bei der Taufliede *Drosophila* beschrieben (Lewin, 1991). Eine Injektion von Antisense-Produkten des Krüppel-Gens führten beim Wildtyp zur Unterdrückung des Genproduktes und damit zum Mutanten-Phänotyp. Eine natürlich vorkommende Regulation über Antisense-Produkte ist mehrfach beschrieben worden. Das MicF-Regulatorgen (mRNA-interfering-complementary RNA) von *E. coli* arbeitet über die Produktion einer MicF-RNA, die komplementär zum 5'-Bereich der OmpF-mRNA ist. Dadurch wird die Gen-Expression von OmpF-mRNA verhindert. Schon Antisense-RNA-Fragmente, die weniger als 100bp der Ziel-mRNA ausmachen, hemmen deren Expression wirksam (Lewin, 1991). Weiterhin konnte für zwei sich überlappende Gene, das Gonadotropin-releasing-Hormon (GnRH) und das SH-Gen, gezeigt werden, daß diese zwar von ein und demselben DNA-Strang, jedoch unabhängig voneinander und zelltypspezifisch entweder durch Transkription des Minusstrangs oder des Plusstrangs exprimiert werden. So wird das Gonadotropin-Releasing Hormon in Zellen des ZNS und SH in Zellen des Herzens exprimiert (Adelman, 1987). Buzdin und Kollegen (2003) konnten mittels BLAST-Analysen zwei RNA-Transkripte identifizieren, die dem Intron 2 des *cbf2* Gens in der Sequenz und der Orientierung entsprachen und in der Nähe eines LTRs (weniger als 1 kb) lokalisiert sind. Beide Transkripte enthielten außerdem komplementäre

Regionen zum Exon 2 des *cbf2* Gens, wodurch diese als mögliche Antisense Regulatoren des *cbf2*-Gens, vermittelt durch RNA Interferenz (RNAi), angesehen werden können. Der LTR2 könnte diesbezüglich die C4-Expression ebenfalls über eine induzierte C4-Antisense-RNA regulieren. Es kann daher darüber spekuliert werden, ob der LTR2 in der Sense Orientierung ein C4-Antisense Transkript im Bereich Exon 1 bis Exon 9 induziert, worüber die C4-Expression zusätzlich zu den zellulären Regulationselementen, z.B. im Hinblick auf gewebespezifische Expression durch den Mechanismus der RNA-Interferenz reguliert werden könnte. Der Nachweis eines solchen C4-Antisense Transkripts konnte jedoch noch nicht erbracht werden. Diesbezüglich wurde im Rahmen der Untersuchungen zur Orientierung der HERV-K(C4)-Transkripte als Kontrolle ebenfalls die Orientierung der C4-Transkripte überprüft. Es konnten ausschließlich C4-Sense Transkripte detektiert werden. Die flankierenden Primerbindungsstellen befanden sich jedoch in Exon 4 und Exon 9, wodurch ein mögliches C4-RNA-Antisense Transkript, z.B. von Exon 5, 6, 7 und 8 bis Exon 9 bzw. LTR2, nicht hätte detektiert werden können. Da der LTR2-Sense über mehrere hundert Kilobasenpaare seine Aktivität auf ein bestimmtes Gen ausüben könnte (siehe oben), wäre eine mögliche Induktion einer C4-Antisense RNA oder sogar eines anderen im RCCX-Modul (siehe 1.2.1) theoretisch möglich. Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) hat in den letzten Jahren aufgrund des nachgewiesenen Einflusses auf die Regulation zellulärer Gene zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der Effekt basiert zunächst auf einem simplen Antisense-Mechanismus, der eine Reihe von komplizierten Vorgängen induziert und letztendlich die Degradation und somit die Inaktivierung endogener mRNA bewirkt (Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001; Bernstein et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, daß Doppelstrang-RNA (dsRNA) eine höhere Effektivität bei der Beeinträchtigung von Genen zeigt als jeder Einzelstrang für sich alleine (Fire et al., 1998). Das Ausschalten der Gene wird nach Bildung der dsRNA (RNA-Interferenz) durch Spaltung in small interfering RNAs (siRNA) ausgelöst (Zamore et al., 2000; Lehner et al., 2002). Neuere Studien zeigen zudem, daß diese siRNAs einen Einfluß auf die Amplifikation und der Transkription (Inhibierung) von Genen sowie der Chromatingestaltung haben (Hannon, 2002).

In bezug auf das HERV-K(C4)-Provirus konnte in Untersuchungen von Yu und Kollegen (2003) gezeigt werden, daß 44 Kopien an HERV-K(C4) 5' LTR/3' LTR im menschlichen Genom vorliegen und sich auf 17 Chromosomen verteilen, die eine Länge zwischen 535 und 580 bp aufweisen. Die Chromosomen 19, 9 und 6 enthalten z.B. acht, sechs und fünf Kopien dieser solitären HERV-K(C4)-LTRs. Auch hier wurde eine Rolle der HERV-K(C4)-LTRs bei

der Modulation der Genexpression nahegelegener Strukturgene diskutiert. Auf Chromosom 21 ist z.B. ein HERV-K(C4)-LTR lokalisiert, welches sich in der genomischen Region der Vitamin B6 (Pyridoxal) Kinase PDXK befindet. In drei unabhängigen cDNA Klonen, welche aus der Tetrakarzinomzelle NT2 und Rhabdomyosarcoma Muskelgewebe generiert wurden, konnten neue Transkripte detektiert werden, die 412 bp der HERV-K(LTR)-Sequenz einschließlich des poly(A<sup>+</sup>)-Signals am 3'-Ende enthalten. Diese Transkripte teilen sich nur ein Exon von 60 bp mit PDXK und könnten für ein Protein von 162 Aminosäuren codieren (Strausberg, 2000; Ninomiya et al., 2002).

Es ist festzuhalten, daß der LTR2 in der Sense-Orientierung eine Rolle bei der Genregulation des C4-Gens spielen könnte, jedoch keine unabhängige HERV-K(C4)-Transkription durch eine Aktivität in der Antisense-Orientierung initiieren kann. Die HERV-K(C4)-Transkription scheint somit durch einen 5' des Provirus gelegenen Promotors initiiert zu werden, was die mittels RT-PCR erzielten Ergebnisse über die Position der Transkripte belegen. Dies würde im Einklang mit der Tatsache stehen, daß IFN- $\gamma$  eine Erhöhung der HERV-K(C4)- (Schneider et al., 2001a) sowie auch der C4-Transkription (Vaishnav et al., 1998; Miura et al., 1987) induziert. Dem LTR2-Sense-Promotor hingegen könnte eine funktionelle Bedeutung durch die Induktion und Synthese eines C4-Antisense-Transkripts zukommen, welches durch die oben beschriebenen RNAi Interferenzmechanismen die zelltypspezifische C4-Expression modulieren könnte. Untersuchungen zur Transkription des C4-Gens zeigten, daß der C4-Promotor kein *IFN- $\gamma$ -response element* in der Sequenz enthält und die Erhöhung der Konzentration von C4 im Serum während der akuten Phase der Immunantwort über die Stabilisierung der C4-mRNA vermittelt wird (Mitchell et al., 1996). Der LTR2 in der Sense-Orientierung zeigte in diesem Zusammenhang eine Abnahme der Aktivität nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  und keine Veränderung der Aktivität durch IL-6. Interessanterweise hat IL-6 ebenfalls keinen Einfluß auf die C4-Expression (Miura et al., 1987). Da IFN- $\gamma$  den LTR2-Sense-Promotor hemmt (z.B. durch negative Rückkopplung), der wiederum die Expression des C4-Gens über ein C4-Antisense-Transkript regulieren könnte, würde dies die posttranskriptionell erhöhte Stabilität der C4-mRNA erklären. Diese Hemmung des LTR2-Sense-Promotors würde dann zu einer Erhöhung der C4-Expression führen. Falls die HERV-K(C4)-Antisense-Transkription im Zusammenhang mit der C4-Expression steht, würde demzufolge auch diese erhöht werden.

Dangel und Kollegen (1994) postulierten, daß das HERV-K(C4)-Provirus in der vorliegenden Form grundsätzlich inaktiv sei, daß es aber durch das Eindringen eines genetisch verwandten

Virus über dessen regulatorische Proteine zur Transkription von Antisense-Produkten angeregt werden könnte. Es ist daher nicht auszuschließen, daß auch der LTR2 in der Antisense-Orientierung eine zelltypspezifische oder durch äußere Faktoren induzierte Aktivität zeigt, wodurch ein von der C4-Expression unabhängiges HERV-K(C4)-Antisense Transkript generiert werden könnte, was durch die Untersuchungen von Dangel und Kollegen belegt werden konnte. Dahingehend konnte der Nachweis erbracht werden, daß nach Deletion eines 71 bp langen Fragments der U5-Region singulärer LTRs die Aktivität der Promotoren höher war als bei der ursprünglichen Gesamtlänge, und das unabhängig von der Orientierung (Domansky et al, 2000). Möglicherweise ist die Ursache dafür ein negatives Silencer-ähnliches regulatorisches Element, das die Aktivität der LTR-Promotoren unterdrücken kann (Ogbourne et al., 1998). Vergleichbare inhibitorische Effekte von Strukturelementen in der U5-Region wurden für das humane Foamy-Virus (Yang et al., 1997) und das T-Zell Leukämie-Virus Typ I (Seiki et al., 1990; Okumura et al., 1996) beschrieben. Das Eindringen von infektiösen Partikeln in die Zelle könnte möglicherweise über einen Regulationsmechanismus die Promotoraktivität des LTR2-Antisense erhöhen, was eine verstärkte unabhängige Expression des HERV-K-Antisense-Transkripts zur Folge hätte.

### **4.3. Die funktionelle Bedeutung von HERV-K(C4)**

Die funktionelle Bedeutung der HERV-K(C4)-Insertion war bisher unbekannt. Es wurde jedoch diskutiert, ob sie aufgrund ihrer umgekehrten Lage im C4-Gen einen Schutz gegen homologe exogene Retroviren vermitteln könnte. Als Mechanismus kommt z.B. die Transkription einer HERV-Antisense-RNA in Betracht, die durch Heteroduplex-Bindung mit exogener *de-novo* exprimierter, retroviraler RNA eine Blockierung der Translation retroviraler Genprodukte bewirken könnte. Diese zuerst von Dangel et al. (1994) vorgebrachte Hypothese wurde anhand eines in-vitro Transfektions- und Expressionsmodells von Schneider und Kollegen (2001a) und im Rahmen dieser Arbeit im Prinzip bewiesen. Im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich wesentliche Vorarbeiten zu diesen Transfektionsstudien geleistet sowie Teilergebnisse erarbeitet, die ich im Rahmen dieser Arbeit weitergeführt und durch weitere Transfektionskontrollen überprüft habe.

In der vorliegenden Arbeit konnte der eindeutige Nachweis von HERV-K(C4)-Antisense Transkripten in verschiedenen humanen Zelllinien und Geweben erbracht werden. Es wird angenommen, daß dieses Antisense-Transkript auch mit primären von nicht im zellulären

Genom exprimierten Genen interagieren kann, die jedoch über homologe Sequenzen verfügen müssen. Es gibt auf zellulärer Ebene Hinweise für eine Interaktion von Sense- und Antisense-RNA, die von unterschiedlichen Loci stammen und zur Blockierung und Regulation der Expression von Genen dient. In Myelin-defizienten Mäusen konnte eine Abnahme des "myelin basic protein" (MBP) auf die Existenz eines Antisense-Transkripts zurückgeführt werden, welches durch ein zweites MBP-Gen exprimiert wird. Letzteres ist durch Tandem-Duplikation der Exons 3 bis 7 und Inversion entstanden. So wird eine Antisense-mRNA gebildet, die mit der regulären MBP-mRNA über Heteroduplexbildung interagieren kann (Tosic et al., 1990) und wahrscheinlich den Mechanismus der RNA-Interferenz induziert (siehe oben). In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, daß auch eine Reihe von Viren wie HIV, HSV oder EBV Antisense-Transkripte exprimieren, um ihre Transaktivierung oder Replikation auf transkriptioneller oder post-transkriptioneller Ebene über die Bildung von dsRNA zu regulieren (Michael et al., 1994; Stevens et al., 1987; Prang et al., 1995). Die Blockierung der Translationsmaschinerie erfolgt dabei durch die Hybridisierung von Sense und Antisense Transkripten am 5'-Ende des Sense-Transkripts im Zellkern. In Untersuchungen an HIV-Patienten konnten im peripheren Blut mittels einer Variante der RT-PCR (template orientation-specific reverse transkriptase PCR assay) Antisense-Transkripte nachgewiesen werden, die vom 3'LTR (LTR2) aktiver Retroviren induziert werden und somit anscheinend über eine Antisense-Regulation ihren viralen Lebenszyklus steuern.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in HepG2-Zellen eine dosis-abhängige Inhibierung einer Sense-mRNA über die Blockierung der Translation eines HERV-K- $\beta$ -Gal-Fusionsproteins nach IFN- $\gamma$ -Stimulation nachgewiesen werden. Die Konstrukte enthielten Fragmente der retroviralen Gene gag/pol (590 bp) und pol (368 bp) in Sense-Orientierung 5' vom lacZ-Gen (siehe Abb. 2.2). Nach Transfektion dieser Konstrukte in HepG2-Zellen, die eine Infektion der Wirtszelle mit einem Virus simulieren sollten, konnte nach Zugabe von steigenden Dosen an IFN- $\gamma$  (10 U/ml, 100 U/ml, 200 U/ml) eine Abnahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression von insgesamt 44,7% für das pol-Konstrukt und 37,2% für das gag-Konstrukt über den Substratumsatz nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.4). Somit konnte gezeigt werden, daß die Inhibierung dosisabhängig durch die Modulation der IFN- $\gamma$  abhängigen C4-Expression beeinflusst werden konnte, so dass offensichtlich ein direkter Bezug zwischen der Stärke der C4-Expression und der Antisense-Inhibierung besteht. Im Vergleich dazu konnten Schneider und Kollegen (2001a) zuvor eine dosis-abhängige Abnahme der Expression des  $\beta$ -Gal

Fusionsproteins von 41,8% in stabil transfizierten LCA und 52,8% in LCB-Zellen nach Transfektion des pol- $\beta$ -fus-Sense-Konstrukts sowie von 36,7% in LC4A und 42,8% in LC4B-Zellen für das gag- $\beta$ -fus-Sense-Konstrukt nach der höchsten Dosis (200 U/ml) an IFN- $\gamma$  nachweisen. Die Ergebnisse stehen im Einklang zueinander, wobei in beiden Studien die Abnahme der  $\beta$ -Gal-fus-Aktivität nach Transfektion mit dem pol- $\beta$ -fus-Sense-Konstrukt um ca. 5-10% höher war. Im Rahmen der von Schneider und Kollegen durchgeführten Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die transiente Expression retroviraler  $\beta$ -Gal-Fusionsproteine in Maus-Fibroblasten nur dann inhibiert werden konnte, wenn diese Zellen stabil mit einem HERV-K(C4)-tragenden humanen C4-Cosmid transfiziert waren. In den LM(TK<sup>-</sup>)-Zellen konnte diesbezüglich keine Abnahme der Expression des Fusionsproteins sowohl in den stimulierten als auch in den unstimulierten Ansätzen detektiert werden, wodurch ein direkter Einfluß von IFN- $\gamma$  auf den CMV-Promotor der Konstrukte ausgeschlossen werden kann. Eine vergleichbare negative Kontrolle konnte in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden, da HepG2-Zellen konstitutiv C4 exprimieren. Durch Stimulation der parallel mitgeführten positiven Kontrolle (pGL3-Control-Vektor) konnte jedoch gezeigt werden, daß IFN- $\gamma$  1. die Zellaktivität beeinflusst und es daher zu einer Abnahme der zellulären Genexpression in den Zellen kommt sowie 2. keine hemmende Wirkung auf die Promotoraktivität hat. Der insertlose Vektor pCMV- $\beta$ -Fus Vektor konnte nicht in der Positivkontrolle getestet werden, da ihm das AUG-Startcodon für die Translation des Reportergens fehlte.

Die Abnahme der  $\beta$ -Gal-Aktivität war statistisch signifikant mit  $p=0,0041$  (gag) bzw.  $0,0047$  (pol) (siehe 3.2.2.1), jedoch ergaben sich relativ hohe Standardabweichungen zwischen den unabhängigen Versuchsansätzen (7-19%) (siehe Tab. 3.4). Auffällig war auch, daß die Standardabweichungen proportional mit der Menge an eingesetztem IFN- $\gamma$  (10 U/ml, 100 U/ml, 200U/ml) zunahmen. Im Vergleich dazu waren die Standardabweichungen in den Versuchsreihen von Schneider und Kollegen relativ gering und lagen zwischen 0,5-6,1%, die Abnahme der  $\beta$ -Gal-fus-Aktivität hatte eine Signifikanz von  $p=0,0008$  und  $0,034$ . Eine Normalisierung der  $\beta$ -Galaktosidasewerte auf den Gesamtproteingehalt als Referenzstandard konnte diese Abweichungen jedoch nicht mindern. Es bleibt festzuhalten, daß die transiente Transfektion eine effiziente Methode ist, Plasmide in die Zelle einzubringen, jedoch experimentell bedingten Schwankungen unterliegt. Die Optimierung verschiedener Parameter verringert diese allerdings. Zudem können sich geringe Unterschiede in der C4-Expression sowie auch in der Transfektionseffizienz und Expression des transfizierten Plasmids durch

den Einfluß von IFN- $\gamma$  im stärkerem Maße auf die Ergebnisse und damit auf die Höhe der gemessenen Werte auswirken. Die Tendenz zur Abnahme war jedoch in allen Versuchsreihen nachweisbar (siehe Tab. 3.2).

Die dosisabhängige Abnahme der Expression des Fusionsproteins ist durch eine Heteroduplex-Bildung zwischen den komplementären Sequenzen der aus dem menschlichen Genom exprimierten HERV-K-(C4)-Antisense-mRNA und den gag- bzw. pol-Anteilen der mRNA des  $\beta$ -Gal-Fusionsgens zu begründen, wodurch das Reportergen des Fusionsplasmids nicht mehr translatiert werden kann (siehe Abb. 1.8). HepG2-Zellen waren daher besonders geeignet für diese Transfektionsstudie, da sie konstitutiv C4A und C4B (Morris et al., 1982; Miura et al., 1986) exprimieren und HERV-K(C4)-Antisense Transkripte wahrscheinlich im Zusammenhang mit C4 transkribiert und/oder reguliert werden.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die quantifizierten HERV-K-Antisense-Transkripte ausreichen, um eine derartige Antisense-Inhibierung und somit einen Schutz für die Wirtszelle vor eindringenden Viren zu vermitteln, da nicht bekannt ist, wie spezifisch die Interaktion zwischen beiden RNAs ist. Die Ergebnisse der Quantifizierung der im Rahmen dieser Arbeit und von Reißmann (2004) ermittelten Daten zeigen, daß durchschnittlich nur ca. 1 bis 100 Kopien pro Zelle vorliegen und es sich daher um low abundance Transkripte handelt. Aufgrund der Tatsache, daß IFN- $\gamma$  die C4-Expression über die Stabilität der mRNA hochreguliert (Kulics et al., 1991; Mitchell et al., 1996) als auch die HERV-K(C4)-Transkription erhöht wird (Schneider et al., 2001a), kann vermutlich eine ausreichende Heteroduplex-Bildung von Sense- und Antisense-mRNA gewährleistet werden. Dieser Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit in den HepG2-Zellen und von Schneider und Kollegen in den Mauszellen über die Blockierung der Translation quantitativ bestimmt werden. Es ist jedoch zu bedenken, daß die Transkription der retroviralen Gene der Konstrukte durch einen starke CMV-Promotor getrieben wird. Im Falle einer exogenen Infektion werden zunächst zwei retrovirale RNA-Genome in das Zytoplasma der infizierten Zelle durch Verschmelzung der viralen Hüllmembran mit der Zytoplasmamembran abgegeben (siehe Abb. 1.2 und 4.1). Das RNA-Genom des Virus wird dann durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige RNA umgeschrieben und in den Zellkern transportiert. Während dieser frühen Phase der Infektion würden prinzipiell einige wenige Antisense Transkripte ausreichen – theoretisch nur zwei – um die zur Vermehrung notwendige Integration in das Wirtsgenom zu verhindern, wie es in Abb. 4.6 (1) schematisch dargestellt ist.



Nach Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom wird das Provirus durch die RNA-Polymerase II der Zelle transkribiert. Für eine effiziente Blockierung der Translation (siehe Abb. 4.6 (2)) der retroviralen Sense-RNA an den Ribosomen im Zytoplasma müssten hingegen weitaus mehr Antisense-Transkripte vorliegen. Eine Erhöhung der HERV-K(C4)-Antisense Transkripte könnte *in vivo* u.a durch Interferon- $\gamma$  induziert werden, was in der vorliegenden Arbeit *in-vitro* gezeigt werden konnte (siehe Abb. 4.6). Es ist außerdem bekannt, daß Interferone die virale Replikation hemmen, bestimmte Abwehrreaktionen aktivieren und ihnen somit eine antivirale Wirkung zugeschrieben wird (Biron, 1994; Sen, 1992). Nach Infektion von Zellen mit Viren wird die Produktion von Interferonen induziert und vor allem von T-Helferzellen sowie natürlichen Killerzellen produziert. In mehreren Studien wird dieser Mechanismus beschrieben, der auf einer Induktion der IFN- $\gamma$  Synthese durch virale dsRNA basiert (Kumar et al., 1998; 1997). Bei einigen Viren liegt das RNA-Genom als doppelsträngige RNA im Capsid vor (siehe Abb. 4.6 a). Außerdem ist bekannt, daß virale dsRNA im Verlauf des Infektionszyklus (vor allem in der späten Phase der Infektion) entsteht, wodurch das Virus die Transkription der retroviralen Gene reguliert (Abb. 4.6 b). Die IFN- $\gamma$  vermittelte Hemmung der viralen Replikation erfolgt über einen Zellrezeptor, der an eine Tyrosinkinase der Janusfamilie gekoppelt ist, die wiederum die als STAT bezeichneten signalübermittelnden Aktivatoren der Transkription phosphoryliert. Aufgrund der Bindung des phosphorylierten STAT an die Promotoren verschiedener Gene wird die Synthese von Wirtsproteinen induziert, die zur Hemmung der viralen Vermehrung beiträgt (siehe Abb. 4.6 c; Sen, 1992). Die Expression von IFN- $\gamma$  könnte nach einer Virusinfektion auf mehreren Ebenen induziert sowie das IFN- $\gamma$ -Protein auf mehreren Eben im Rahmen des nachgewiesenen Antisense-Mechanismus hemmend wirken (siehe Abb. 4.6). Dies zeigt, in welchem engen Zusammenhang die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zueinander stehen und welchen Einfluß IFN- $\gamma$  auf die Modulation dieses möglichen C4-Antisense- als auch HERV-K(C4)-Antisense-Mechanismus haben könnte. Die Ergebnisse bestätigten diese Vermutung, da mit steigenden Dosen an IFN- $\gamma$  der Substratumsatz bzw. die Aktivität des  $\beta$ -Gal-Fusionsproteins proportional bis auf 62,8% (gag) und 55,3% nach Zugabe von 200 U/ml abnahm (siehe Tab. 3.4.1). Es ist jedoch nicht bekannt, in welchem zellulären Kompartiment die spezifische Interaktion zwischen dem endogenen Antisense-Transkript und viraler bzw. Plasmid-mRNA stattfindet. Wahrscheinlich ist jedoch, daß nach Infektion mit einem Virus speziell die IFN- $\gamma$ -Expression hochreguliert wird und dadurch der Schutzmechanismus der Wirtszelle, der u.a. über Antisense-Transkripte erfolgen könnte,

ausgelöst wird. Im Rahmen der Diplomarbeit von Beißmann (2004) war vorgesehen, nach Quantifizierung der HERV-K(C4)-Transkripte in unstimulierten humanen Zelllinien den Einfluß von IFN- $\gamma$  auf deren Kopienanzahl zu bestimmen. Leider war es Beißmann aus zeitlichen Gründen nicht möglich, diese Transfektionsstudie durchzuführen, da die Kultivierung der Zellen sowie die Isolation der RNA und Quantifizierung zeitaufwendige Methoden sind und die Diplomarbeit zeitlich begrenzt war.

Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Transfektionsversuche konnte gezeigt werden, daß durch den Einfluß von IFN- $\gamma$  die Translation der retroviralen Gene der Plasmide wahrscheinlich durch endogene Antisense-mRNA blockiert werden konnte. Dies könnte durch eine erhöhte C4-Expression, aber auch durch die C4-unabhängige Promotoraktivität des LTR2-Antisense-Promotors zu erklären sein. Ein möglicher Einfluß von IFN- $\gamma$  auf die Promotoraktivität des LTR2-Antisense Promotors konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht in der HepG2-Zelllinie beobachtet werden.

Durch die Bildung von Heteroduplices mit von exogenen Viren eingebrachter (Sense) RNA hätte die Wirtszelle eine Strategie entwickelt, sich vor infektiösen Viren zu schützen. Die Voraussetzung dafür ist aber, daß HERV-K(C4)-Antisense-Transkripte in ausreichender Anzahl vorliegen, um die Translation der retroviralen Gene erfolgreich blockieren zu können. IFN- $\gamma$  spielt dabei eine entscheidende Rolle durch Erhöhung der C4-Expression bzw. HERV-K(C4)-Transkription, die von dem LTR2-Sense-Promotor bzw. durch ein C4-Antisense Transkript moduliert werden könnte.

Ein Nachweis der Heteroduplexbildung zwischen Antisense- und Sense-mRNA gelang bisher nicht, es wird angenommen, daß diese Moleküle relativ instabil und kurzlebig sind (Nellen und Liechtenstein, 1993).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden unter in-vitro-Bedingungen an einer Hepatomzelllinie und mit konstruierten retroviralen Expressionsvektoren durchgeführt, d.h. mit einem artifiziellen System. Die Frage ist daher, inwieweit man die Ergebnisse über die Funktion von HERV-K(C4) auf das Zellgeschehen unter in-vivo-Bedingungen übertragen kann. Die Voraussetzung für eine Hybridisierung der beiden RNA-Einzelstränge zu einem doppelsträngigen Heteroduplex ist zunächst einmal, daß die RNA-Sequenz des infizierenden Virus homologe Bereiche zu der endogenen Antisense-RNA aufweisen muß. Die rekombinanten retroviralen Fusionsplasmide wurden bereits so konstruiert, daß sie die offenen Leseraster von gag oder pol aus der HERV-K(C4)-Insertion und somit die identische Sequenz in reverser (Sense) Orientierung zum HERV-K-Antisense-Transkript enthielten. Chu

und Kollegen (1995) verglichen alle drei Leseraster der retroviralen Gene der HERV-K(C4) Insertion mit den homologen Genen anderer Viren. Dabei zeigte sich, daß die Sequenz von HERV-K(C4) eine signifikante Identität von >65% über mehrere hundert Basenpaare und 99% entlang kurzen bis über 30 bp langen Sequenzbereichen zu bekannten humanen als auch tierischen Viren aufwies. Dies traf vor allem für die konservierte Region des pol-Gens von HIV, MMTV und dem Jaagsiekte Sheep Retrovirus zu (Chu et al., 1995).

Da das bisher verwendete transiente Transfektions-Modell nur zum prinzipiellen Nachweis einer Interaktion der HERV-K(C4)-Transkripte mit den homologen Sequenzen des Plasmid-Konstruktes gedacht war, sollte im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich ein retrovirales Infektionsmodell an humanen und murinen Zelllinien etabliert werden. Dieses sollte der komplexen Abläufe einer retroviralen Infektion mit Integration in das Genom der Wirtszelle und nachfolgender Expression proviraler Sequenzen sowie deren mögliche Beeinflussung durch endogene HERV-K(C4)-Antisense Transkripte dienen. Hierzu wurden eine Reihe von Experimenten durchgeführt (siehe 2.10 und 3.3). Zunächst wurden infektiöse Partikel mit Hilfe eines retroviralen Fusionsplasmids und einer Verpackungszelllinie hergestellt. Anschließend wurden die murinen Linien LM(TK<sup>-</sup>) und NIH3T3 mit den gewonnenen viralen Stammlösungen infiziert, um die retrovirale *de novo* Expression in Abwesenheit von HERV-K(C4) zu testen. Anschließend sollten die mit den humanen C4A bzw. C4B-Genen stabil transfizierten murinen Linien LC4A und LC4B (Schneider et al., 2001a) auf eine mögliche Antisense-Inhibierung der viralen Fusionsproteine gag-, pol-, und env-βFus<sup>+</sup> getestet werden. Sowohl die mit den retroviralen Wildtyp-Plasmiden transfizierten Verpackungszellen EcoPack2-293 als auch die parallel getesteten GP-293-Zellen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop und im FACS durch die Expression des Fluoreszenzproteins EGFP detektiert und eine Transfektionseffizienz von 60-80% bestimmt werden (siehe Abb. 3.22). Nach Aufreinigung der Viruspartikel und retroviraler Transduktion der Maus-Fibroblasten Linie LM(TK<sup>-</sup>) und NIH3T3 wurde die Expression des Fusionsreportergens ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS sowie parallel der Virustiter über die durch die Virionen auf die Mauszellen übertragene Neo<sup>r</sup> Resistenz in unabhängigen Versuchsansätzen bestimmt.

Es zeigte sich jedoch in diesen mehrmonatigen Versuchen, daß kein erfolgreicher Nachweis einer endogenen Antisense-Modulation im ecotrophen Maussystem beobachtet werden konnte, da eine generelle retrovirale Infektion der Mauszelllinie nicht möglich war. Zwar gelang die Transfektion der retroviralen Konstrukte in die Verpackungszelllinie, jedoch konnte

keine Expression des Reportergens in den mit der Virusstammlösung infizierten Maus-Linien LM(TK<sup>-</sup>) und NIH3T3 nachgewiesen werden. Die Versuchsbedingungen wurden daher mehrfach in Hinblick auf die Kultivierung der Zelllinien, Virusaufreinigung und Infektionen optimiert (Cashion et al., 1999; Muldoon et al., 1997; Pear et al., 1993). Die Reinheit der Mauszelllinien wurde durch eine Spezies-spezifische PCR getestet (siehe Abb. 3.23), und es konnten keine Kontaminationen nachgewiesen werden. Das Vorliegen von Viruspartikeln aus dem Überstand wurde durch RNA-Extraktion und anschließender RT-PCR untersucht und nachgewiesen. Diese Methode erlaubt allerdings nur einen generellen Nachweis von Viruspartikeln, kann aber nicht belegen, ob es sich dabei um infektiöse Viruspartikel handelt. Eine Kontamination von Zellresten bzw. RNA-Transkripten der Verpackungszelllinien im Überstand kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden und somit den Nachweis verfälschen. Ein Defekt der Virusproduktion oder der Expression des envelope Proteins gap70 (siehe Tabelle 2.3), welches für die Infektion der Mauszelllinien entscheidend und somit auf die Verpackungszelllinie zurückzuführen ist, könnte die mögliche Ursache gewesen sein. Es wurde daher mit der Firma Clontech Kontakt aufgenommen, um mögliche Qualitätsprobleme aufzudecken. Leider führte die Tatsache, daß Clontech zu keiner Stellungnahme bereit war, zu einer nicht mehr aufholbaren Verzögerung dieses Teiles des Projektes. Da wir andererseits nicht das komplette retrovirale Infektionssystem mit allen bereits hergestellten Vektorkonstrukten verwerfen und neu aufbauen wollten, konnte schließlich doch erreicht werden, daß uns durch Clontech ein Alternativprodukt, das BD Retro-X-Universal Packaging System, zur Verfügung gestellt wurde. Da auch dieses System zu keiner erfolgreichen Infektion der Zielzellen führten, konnte diese Versuchsreihe nicht zu Ende geführt werden. Festzuhalten ist, daß der kaukasoide MHC-Haplotyp HLA-A1, -Cw7, -B8, -DR3, C4AQ0, C4B1, der das lange C4A-Gen durch Deletion verloren hat und nur noch ein einzelnes kurzes C4B-Gen ohne retrovirale Insertion trägt, mit einer Reihe von HLA-assoziierten Erkrankungen unbekannter Herkunft auftritt wie z.B. IDDM (*Insulin-dependent diabetes mellitus*) und SLE (Systemischer Lupus Erythematoses) (Tiwari und Terasaki, 1985). Für manche dieser HLA-assoziierten Erkrankungen wird eine virale Pathogenese diskutiert, es gibt aber bisher keine Beweise. Es ist spekulativ, ob das Fehlen der "protektiven" HERV-Insertion einen möglichen Risikofaktor für diesen Haplotyp darstellt. Zusammengenommen sprechen aber die Argumente dafür, daß HERV-K(C4) eine protektive Rolle bei der Abwehr retroviraler Infektionen spielen könnte.

#### 4.4 Ausblick

Um die Theorie der Antisense-Abwehr letztendlich beweisen zu können, sollte in Zukunft die Etablierung des in der vorliegenden Arbeit begonnenen retroviralen Infektionsmodells an murinen und humanen Zelllinien erfolgen. Letztlich soll das Vektorsystem durch ein inaktiviertes Retrovirus ersetzt werden, um detaillierte Kenntnisse über den Mechanismus der Antisense-Abwehr *in-vivo* in Hinblick auf Veränderungen zellulärer Regulationsmechanismen zu erhalten. In diesem Zusammenhang könnte überprüft werden, ob die Aktivität des LTR2-Promotors in Antisense-Orientierung durch eine Infektion der Wirtszelle mit exogenen Retroviren gesteigert und dadurch die Transkription der einer Antisense-mRNA durch den inaktiven LTR2-Antisense Promotor hochreguliert wird. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, die gebildeten Heteroduplices durch eine geeignete Methode, z.B. mittels RT-PCR oder über die von ihnen induzierte Erhöhung von Type 1 Interferonen (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) im Vergleich zu einer negativen Kontrolle, mittels eines Elispot-Tests nachzuweisen. Des Weiteren sollen die Untersuchungen von Beißmann (2004) zur quantitativen Analyse der HERV-K(C4)-Antisense Transkripte mittels der etablierten RNA-Standards im Hinblick auf den Einfluß von IFN- $\gamma$  auf deren Expression in verschiedenen humanen Zelllinien weitergeführt werden. Weitere RT-PCR Untersuchungen zur Struktur des HERV-K(C4)-Intermediats als auch eines möglichen C4-Antisense Transkripts, induziert durch den LTR2-Promotor, würden weitere Erkenntnisse über einen möglichen komplexen Kontroll- und Regulationsmechanismus des C4-Gens erbringen.

## **5. ZUSAMMENFASSUNG**

Die vierte Komplementkomponente C4 spielt als Bestandteil der C3- und C5-Konvertase des klassischen Weges bei der unspezifischen und auch bei der spezifischen Immunantwort im Schutz vor infektiösen Pathogenen eine zentrale Rolle. C4 ist hochpolymorph und wird von zwei duplizierten Genen, C4A und C4B, in der MHC Klasse III Region auf Chromosom 6 codiert. Der Längenpolymorphismus des C4-Gens beruht auf der An- oder Abwesenheit einer 6.4 kb langen Insertion im Intron 9. Untersuchungen der Intron 9-Sequenz haben gezeigt, daß dort ein vollständiges endogenes Transposon retroviralen Ursprungs lokalisiert sein kann, und zwar bei Menschen als auch bei zahlreichen Altwelt-Affenarten. Es handelt sich dabei um einen eigenständigen, bisher noch nicht beschriebenen Virus-Typ, der alle Sequenzmerkmale der Familie der humanen endogenen Retroviren (HERV) trägt und zu den HERV-K Viren gehört. Der Provirus wurde als HERV-K(C4) bezeichnet. Die Orientierung dieses retroviralen Elements ist entgegengesetzt zu der Transkriptionsrichtung des C4-Gens. Der Provirus wird von zwei langen terminalen Sequenzwiederholungen, den long terminal repeats (LTRs), flankiert, die zahlreiche Signale – Enhancer-, Promotor- und Polyadenylierungssignale – für die Expression retroviraler Gene enthalten. Die retroviralen Gene gag, pol und env sind jedoch durch eine Reihe von Mutationen, darunter zahlreichen Stopcodons in allen drei Leserahmen, inaktiv geworden, so daß HERV-K(C4) die Fähigkeit zur Bildung infektiöser Viruspartikel verloren hat. Dennoch konnten mittels RT-PCR in HepG2-Zellen HERV-K-Antisense-Transkripte nachgewiesen werden. Die funktionelle Bedeutung der HERV-K(C4)-Insertion ist unbekannt, es wird jedoch diskutiert, ob sie aufgrund ihrer umgekehrten Lage im C4-Gen einen Schutz gegen homologe exogene Retroviren vermitteln könnte.

Mittels RT-PCR, RNase Protection Assays und Northern-Blot Analysen konnte der Nachweis von HERV-K(C4)-Antisense-Transkripten in verschiedenen humanen Zelllinien und Geweben erbracht werden, wobei diese nicht in der Sense-Orientierung transkribiert werden. Durch die Verwendung von Oligo(dT)-Primern in der reversen Transkription kann es sich bei den nachgewiesenen Transkripten nur um prozessierte, gereifte mRNA handeln. Die retroviralen Transkripte schlossen am 5'- und 3'-Ende Sequenzen des C4-Exon 9 und Exon 10 ein, enthielten jedoch darüber hinaus keine weiteren genomischen Sequenzen, so daß diese wahrscheinlich "readthrough" Transkripte darstellen, die durch einen 5' des LTR2 gelegenen Promotor initiiert oder im Zusammenhang mit der C4-Expression transkribiert und reguliert werden. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, daß die nachgewiesenen retroviralen

Antisense-Transkripte aus einer C4-prä-mRNA oder Spleißprodukten des Intron 9 generiert wurden. Weiterhin konnten insgesamt 4 HERV-K(C4)-mRNA Spezies mit einer Länge von 1,3, 2 kb, 5 kb und 6,8 kb detektiert werden, die wahrscheinlich einfachen und mehrfach gespleißten Transkripten entsprechen, die durch differentielle Spleißvorgänge der Vollängen-RNA, das die gesamte Provirus Sequenz umfaßt, hervorgegangen sind. Eine gewebespezifische, unterschiedlich starke Expression konnte zudem für HERV-K(C4) detektiert werden. Die quantitative Analyse in verschiedenen humanen Zelllinien ergab, daß HERV-K(C4) durchschnittlich mit einer Kopienanzahl zwischen ca.1 bis 100 Transkripten in einer Zelle vorkommt, so daß es sich um low abundance mRNAs handelt.

Um zu klären, ob die HERV-K(C4)-Transkription unabhängig von der des C4-Gens erfolgt und reguliert werden kann, wurde ein Reporter-gen-System etabliert, mit dessen Hilfe die Promotoraktivitäten der beiden LTRs in je beiden Orientierungen in unstimulierten als auch in mit IFN- $\gamma$  und IL-6 stimulierten HepG2 sowie COS7 bestimmt wurde. Es konnte ausschließlich eine Aktivität des LTR2-Promotors in beiden untersuchten Zelllinien in der Sense-Orientierung des Retrovirus nachgewiesen werden, die nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  signifikant abnahm. LTR1 war dagegen in allen getesteten Zellen und in beiden Orientierungen funktionell inaktiv. Es kann daher über eine durch den LTR2-Sense Promotor initiierte Synthese einer C4-Antisense mRNA spekuliert werden, die als RNAi wiederum die C4-Expression regulieren könnte

Parallel dazu wurde mittels eines humanen Modell-Systems die Theorie der Antisense-Abwehr in HepG2-Zellen überprüft. Die Theorie basiert auf dem Nachweis von HERV-K(C4)-Antisense-Transkripten, die über eine Heteroduplexbildung mit der Sense-mRNA von verwandten, infektiösen Retroviren eine mögliche Blockierung deren Translation erwirken könnten. Daher wurden Fusionsplasmide, die Fragmente der retroviralen gag -und pol-Gene 5' vom LacZ-Gen in Sense-Orientierung enthielten, in HepG2-Zellen transfiziert. Es konnte eine signifikante Abnahme der Expression des gag- bzw. pol- $\beta$ -Gal-Fusionsproteins nach steigenden Dosen an IFN- $\gamma$  in HepG2-Zellen nachgewiesen werden. IFN- $\gamma$  erhöht die C4-Expression und wahrscheinlich auch die Anzahl der HERV-K(C4)-Antisense-Transkripte. Es kann darüber spekuliert werden, ob durch einen unbekanntem Regulationsmechanismus die Aktivität des LTR2-Antisense-Promotors nach Infektion eines Retrovirus ebenfalls hochreguliert werden könnte, eventuell u.a. durch den Einfluß von IFN- $\gamma$ , das in der akuten Phase einer Infektion verschiedene Abwehrmechanismen induziert. IFN- $\gamma$  scheint ein entscheidender Faktor für die Inhibierung der retroviralen Expression durch Antisense-

Transkripte zu sein. Der Wirt hätte somit zwei Möglichkeiten, die Transkription des HERV-K-Provirus zu erhöhen: (1) entweder über die C4-Expression, die durch den LTR2-Sense Promotor reguliert werden könnte oder (2) unabhängig durch die Aktivität des LTR2-Antisense Promotors, um so möglicherweise einen Schutz der Zelle vor exogenen Retroviren zu bewirken.









**7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A.dest	Aqua bidestillata
AMV	<i>avian myoblastosis virus</i>
BLV	<i>bovines leukemia virus</i>
BSA	<i>bovines serum albumin</i>
cDNA	<i>copie DNA</i> = DNA-Kopie
CMV	<i>human cytomegalovirus</i>
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphate
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang DNA
dsRNA	Doppelstrang RNA
E.coli	Escherichia coli
EBV	Epstein Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ERV	<i>endogenous retrovirus</i> = endogenes Retrovirus
FCS	<i>fetal calf serum</i> = fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HERV	<i>human endogenous retrovirus</i> = Humanes endogenes Retrovirus

---

HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> = Humanes Immundefizienzvirus
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HML	<i>human endogenous MMTV-like</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> = Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
HTLV	<i>human T-cell leukemia virus</i> = Humanes T-Zell Leukämie Virus
IDDM	<i>insulin-dependent diabetes mellitus</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IR	<i>inverted repeat</i>
JSRV	<i>Jaagsiekte sheep retrovirus</i>
kb	Kilobasenpaare = 1000 bp
kD	Kilodalton
LTR	<i>long terminal repeats</i> = lange terminale Wiederholungen
MCS	<i>multiple cloning site</i> = multiple Klonierungsstelle
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> = Haupthistokompatibilitätskomplex
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
MoMuLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> = Boten-Ribonukleinsäure
OM	<i>outer membrane protein</i>
ORFs	<i>open reading frames</i> = offenes Leseraster
PB	<i>primer binding site</i> = Primerbindungsstelle
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> = mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

---

PP	Polypurin Sequenz
RLU/sec	<i>relative light units per second</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
RNAi	<i>interfering RNA</i>
RSV	Rous sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
RTVL	<i>retrovirus-like elements</i> = Retrovirus-ähnliche Elemente
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SLE	<i>systemic lupus erythematosus</i> = Systemischer lupus erythematoses
SP	<i>single peptid</i>
SSC	Standard Salz Citrat
SU	<i>surface protein</i>
TM	<i>transmembrane protein</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
tRNA	<i>transfer RNA</i>
TSR	<i>target site repeat</i>
TSR	<i>template suppression reagents</i>
Ü.N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett

## 8. LITERATUR

- Sutkowski N**, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT (2001) Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* 15:579-589
- Casau AE**, Vaughan JE, Lozano G, Levine AJ (1999) Germ cell expression of an isolated human endogenous retroviral long terminal repeat of the HERV-K/HTDV family in transgenic mice. *J Virol* 73:9976-9983
- Mack M** (2000) Untersuchungen zur Expression und Promotoraktivität der endogenen retroviralen Insertion HERV-K(C4) im C4-Gen des Menschen. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
- Zuker M** (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31:3406-3415
- Armbruester V**, Sauter M, Krautkraemer E, Meese E, Kleinman A, Best B, Roemer K, Mueller-Lantzsch N (2002) A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res* 8:1800-1807
- Stauffer Y**, Gregory T, Sperisen P, Lebedev Y, Jongeneel (2004) Digital expression profiles of human endogenous retroviral families in normal and cancerous tissues. *Cancer Immunity* 4:2
- Krieg AM**, Gourley MF, Klinman DM, Perl A, Steinberg AD (1992) Heterogeneous expression and coordinate regulation of endogenous retroviral sequences in human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:1991-1998
- Herbst H**, Sauter M, Mueller-Lantzsch N (1996) Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. *Am J Pathol* 149:1727-1735
- Adelman JP**, Bond CT, Douglass J, Herbert E (1987) Two mammalian genes transcribed from opposite strands of the same DNA locus. *Science* 235:1514-1517
- Allen RC**, Graves G, Budowle B (1989) Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Biotechniques* 7:736-744
- Alper CA**, Raum D, Awdeh ZL, Peterson HB, Taylor PD, Starzi TE (1980) Studies of hepatic synthesis in vivo of plasma proteins, including orosomucoid, transferrin,  $\alpha_1$ -antitrypsin, C8 and factor B. *Clin. Immunopathol* 16:84-89
- Alper CA**, Raum D, Karp SK, Awdeh ZL, Yunis EJ (1983) Serum complement "supergenes" of the major histocompatibility complex in man (complotypes). *Vox Sang* 45:62-67
- Anderson MJ**, Milner CM, Cotton RG, Campbell RD (1992) The coding sequence of the hemolytically inactive C4A6 allotype of human complement C4 reveals that a single arginine to tryptophane substitution at  $\beta$ -chain residue 458 is the likely cause of the defect. *J Immunol* 148:2795-2802
- Andersson G**, Svensson AC, Setterblad N, Rask L (1998) Retroelements in the human MHC class II region. *Trends Genet* 14:109-114
- Andreason GL**, Evans GA (1988) Introduction and expressing of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques* 6:650-660
- Anthony R**, el-Omar E, Lappin DF, MacSween RN, Whaley K (1989) Regulation of hepatic synthesis of C3 and C4 during the acute-phase response in the rat. *Eur J Immunol* 19:1405-1412
- Anthony R**, Morrison L, MacSween RN, Whaley K (1985) Biosynthesis of complement components by cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 232:93-98
- Arkhipova IR**, Mazo AM, Chekasova VA, Gorelova TV, Schuppe NG, Iliyev YV (1986) The steps of reverse transcription of Drosophila mobile dispersed genetic elements and U3-R-U5 structure of their LTRs. *Cell* 44:555-563
- Atkinson JP**, Schneider PM (2004) Genetic Susceptibility and Class III Complement Genes. In: *Systemic Lupus Erythematosus*, 4th Edition (Lahita RG, Ed.), Academic Press
- Awdeh ZL**, Alper CA (1980) Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement. *Proc Natl Sci USA* 77:3576-3580
- Bachmair A**, Finley D, Varshavsky A (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234:179-186
- Barbulescu M**, Turner G, Seaman MI, Deinard AS, Kidd KK, Lenz J (1999) Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr. Biol.* 9:861-868

- Baxendale S**, MacDonald ME, Mott R, Francis F, Lin C, Kirby SF, James M, Zehetner G, Hummerich H, Valdes J, Collins FS, Deaven LJ, Gusella JF, Lehrbach H, Bates GP (1993) A cosmid contig and high resolution restriction map of the 2 megabase region containing the Huntington's disease gene. *Nature Genet* 4:181-186
- Beißmann T** (2004) Untersuchungen zum quantitativen Nachweis der Expression der endogenen retroviralen Insertion HERV-K(C4) mittels real-time PCR. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
- Belshaw R**, Pereira V, Katzourakis A, Talbot G, Paces J, Burt A, Tristem M (2004) Long-term reinfection of the human genome by endogenous retrovirus
- Benit L**, Dessen P, Heidmann T (2001) Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. *J Virol* 75: 11709-11719
- Best S**, Le Tissier P, Towers G, Stoye JP (1996) Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature* 382; 826-829
- Birnstiel ML**, Busslinger M, Strub K (1985) Transcription Termination and 3' processing: The end is in site! *Cell* 41:349-359
- Biron CA**, (1994) Cytokines in the Generation of Immune Responses to, and Resolution of, Virus Infection. *Curr. Opin. Immunol.* 6:530-538
- Bittner JJ** (1936) Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 84:162-162
- Blaise S**, Ruggieri A, Dewannieux M, Cosset FL, Heidmann T (2004) Identification of an Envelope Protein from the FRD Family of Human Endogenous Retroviruses (HERV-FRD) Conferring Infectivity and Functional Conservation among Simians. *J Virol.* 78:1050-1054
- Blomberg J**, Medstrand P, Yin H, Andersson ML, Lindeskog M, Borg A, Olsson H (1995) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121. Suppl. 1.3
- Blond JL**, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL (2000) An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the D mammalian retrovirus receptor. *J Virol* 74:3321-3329
- Boller K**, König H, Sauter M, Müller-Lantsch N, Löwer R, Kurth R (1993) Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* 196:394-353
- Bonifer C** (1999) Long-distance chromatin mechanisms controlling tissue-specific gene locus activation. *Gene* 238, 277-289
- Bristow J**, Tee MK, Gitelman SE, Mellon SH, Miller WL (1993) Tenascin-X: A novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J Cell Biol* 122:265-278
- Britten RJ** (1997) Mobile elements inserted in the distant past have taken on important functions. *Gene* 205:177-182
- Brosius J** (1999) RNAs from all categories generate retrosequences that may exapted as novel genes or regulatory elements. *Gene* 238:115-134
- Buzdin AA**, Lebedev YB, Sverdlov ED (2003) Human genome-specific HERV-K intron LTR genes have a random orientation relative to the direction of transcription and, possibly, participated in antisense gene expression regulation. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*
- Campbell RD**, Gagnon J, Porter RR (1981) Amino acid sequence around the thiol and reactive groups of human complement component C4. *Biochem J* 199:359-370
- Carroll MC**, Belt T, Palsdottir A, Porter RR (1984a) Structure and organization of the C4 genes. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 306:379-388
- Carroll MC**, Campbell RD, Bentley DR, Porter RR (1984b) A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature* 307:237-241
- Carroll MC**, Campbell RD, Porter RR (1985a) Mapping of the steroid-21-hydroxylase gene adjacent to the complement component C4 gene in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:521-525
- Carroll MC**, Fathallah DM, Bergamaschini L, Alicot E, Isenman DE (1990) Substitution of a single amino acid (aspartic acid for histidine) converts the functional activity of human complement C4B to C4A. *Proc Natl Sci USA* 87:6868-6872
- Carroll MC**, Palsdottir A, Belt KT, Porter RR (1985b) Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region. *EMBO J* 4:2547-2552
- Chan AC**, Atkinson JP (1985) Oligosaccharide structure of the human C4. *J Immunol* 134:1790-1798

- Chan AC**, Mitchell KR, Munns TW, Karp DR, Atkinson JP (1983) Identification and partial characterization of the secreted form of the fourth component of human complement: Evidence that it is different from the major plasma form. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:268-272
- Chen ZP**, Malapetsa A, Mohr G, et al. (1997) Quantitation of ERCC-2 gene expression in human tumor cell lines by reverse transcription polymerase chain reaction in comparison to northern blot analysis. *Anal Biochem (United States)* 244: 50-54
- Chien A**, Edgar DB, Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127:1550-1557
- Christy RJ**, Huang RC (1988) Functional analysis of the long terminal repeats of intracisternal A-particle genes: sequences with the U3 region determine both the efficiency and direction of promoter activity. *Mol Cell Biol* 8:1093-1102
- Chromczynski P**, Sacchi N (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraktion. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Chu G**, HayahawaH, Berg P (1982) Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucl Acids Res* 15:1311-1326
- Chu X** (1995) Molekulargenetische Untersuchungen zur Genstruktur und zum Polymorphismus der humanen Komplementkomponente C4. Dissertation, Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
- Chu X**, Rittner C, Schneider PM (1995) Length polymorphism of the human complement component C4 gene is due to an ancient retroviral integration. *Exp Clin Immunogenet* 12:74-81
- Church DM**, Stotler CJ, Rutter JL, Murell JR, Trofatter JA, Buckler AJ (1994) Isolation of genes from complex sources of mammalian genomic DNA using exon amplification. *Nature Genetics* 6:98-105
- Coffin JM** (1992) Structure and classification of retroviruses. In *The retroviridae* (ed. J.A. Levy) 19-49, Plenum Press, New York
- Cohen M**, Larsson E (1990) Human endogenous retroviruses. *Bioessays* 9:191-196
- Cohen M**, Powers M, O'Connell C, Kato N (1985) The nucleotide sequence of the env gene from the human provirus ERV3 and isolation and characterization of an ERV3-specific cDNA. *Virology* 147:449-458
- Colonna M**, Bersnahan S, Strominger JL, Spies T (1992) Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen in antigen processing. *Proc Natl Sci USA* 89:3932-3936
- Conrad B**, Weissmahr RN, Boni J et al. (1997) A human endogenous retroviral superantigen as a candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 9:303
- Cotten M**, Baker A, Saltik M, Wagner E, Buschle M (1994) Lipopolysaccharide is a frequent contaminant of plasmid DNA preparations and can be toxic to primary human cells in the presence of adenovirus. *Gene Ther* 1:239-246
- Dalton AJ** (1972) Further analysis of detailed structure of types B and C particles. *J Natl Cancer Inst* 48:1098-9
- Dangel AW**, Baker BJ, Mendoza AR, Yu CY (1995) Complement component C4 gene intron 9 as a phylogenetic marker for primates: long terminal repeats of the endogenous retrovirus ERV-K(C4) are a molecular clock for evolution. *Immunogenet* 42:41-52
- Dangel AW**, Mendoza AR, Baker BJ, Daniel CM, Carroll MC, Wu LC, Yu CY (1994) The dichotomous size variation of human complement C4 genes is mediated by a novel family of endogenous retroviruses, which also establishes species-specific patterns among Old World primates. *Immunogenet* 40:425-436
- Darnell J**, Lodish H, Baltimore D (1990) *Molecular Cell Biology*. Scientific american Books pp.972
- Denner J**, Phelps RC, Löwer J, Löwer R, Kurth R (1995) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121. Suppl. 1.5.
- Depil S**, Roche C, Dussart P, Prin L (2002) Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients. *Leukemia* 16(2):254-9
- Di Cristofano A**, Strazzullo M, Longo L, La Mantia G (1995) Characterization and genomic mapping of the ZNF80 locus: expression of this zinc-finger gene is driven by a solitary LTR of ERV9 endogenous retroviral family. *Nucleic Acids Res.* 23:2823-2830.
- Dodds AW**, Law SKA, Porter RR (1986) The purification and properties of some less common allotypes of the fourth component of human complement. *Immunogenet* 24:279-285
- Domansky AN**, Kopantzev EP, Snezhkov EV, Lebedev YB, Leib-Mosch C, Sverdlov ED (2000)

- Solitary HERV-K LTRs possess bi-directional promoter activity and contain a negative regulatory element in the U5 region. *FEBS Letters* 472:191-195
- Döring HP**, Starlinger P (1984) Barbara McClintock's controlling elements: Now at the DNA level. *Cell* 39:253-259
- Dunham I**, Sargent CA, Dawkins RL, Campbell RD (1989) Direct observation of the gene organization of the complement C4 and 21-hydroxylase loci by pulse-field gel electrophoresis. *J Exp Med* 169:1803-1816
- Felgner PL**, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielson M (1987) Lipofectin: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7413-7417
- Femino AM**, Fay FS, Fogarty K, Singer RH (1998) Visualization of single RNA transcripts *in situ*. *Science* 280:585-590
- Femino AM**, Fay FS, Fogarty K, Singer RH (1998) Visualization of single RNA transcripts *in situ*. *Science* 280, 585-590
- Feuchter A**, Freeman D, Mager DL (1992) Strategy for detecting cellular transcriptions promoted by human endogenous long terminal repeats: Identification of a novel gene (CDC4L) with homology to yeast CDC4. *Genomics* 13:1237-1246
- Feuchter A**, Mager D (1990) Functional heterogeneity of a large family of human LTR-like promoters and enhancers. *Nucleic Acids Res* 18:1261-1270
- Feuchter-Murthy AE**, Freeman JD, Mager DL (1993) Splicing of a human endogenous retrovirus to a novel phospholipase A2 related gene. *Nucleic Acids Res* 21:135-143
- Fey G**, Odnik K, Chapuis RM (1980) *Eur J Immunol* 10:75-82
- Fiedler AHL**, Walport MJ, Batchelor JR, Rynes RI, Black CM, Dodi IA, Hughes GRV (1983) Family study of major histocompatibility complex in patients with systemic lupus erythematosus: Importance of the null alleles of the C4A and C4B in determining disease susceptibility. *Brit Med J* 286:425-428
- Florl AR**, Lower R, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA (1999) DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 80: 1312-21
- Franklin GC**, Chretien SC, Hanson IM, Rochefort H, May FEB and Westley BR (1988) Expression of human sequences related to those of mammary tumor virus. *J. Virol.* 62: 1203-1210
- Gigli I**, Zabern I, Porter RR (1977) The isolation and structure of the C4, the fourth component of human complement. *Biochem J* 165:439-446
- Giles CM**, Uring-Lambert B, Boksich W, Braun M, Goetz J, Neumann R, Mauff G, Hauptmann G (1987) The study of a French family with two duplicated C4A haplotypes. *Hum Genet* 77:359-365
- Giles CM**, Uring-Lambert B, Goetz J, Hauptmann G, Fiedler AHL, Ollier W, Rittner C, Robson T (1988) Antigenic determinants expressed by human C4 allotypes; a study of 325 families provides evidence for the structural antigenic model. *Immunogenetics* 27:422-448
- Gilman M** (1993) In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) *Current protocols in molecular biology*, vol 1. Greene and Wiley-Interscience, New York, pp 4.7.1-4.7.6
- Gitelman SE**, Bristow J, Miller WL (1992) Mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/Gene X locus. *Mol Cell Biol* 12:2124-2134
- Goldberger G**, Colten HR (1980) Precursor complement protein (pro-C4) is converted *in vitro* to native C4 by plasmin. *Nature* 286:514-516
- Goodchild NL**, Wilkinson DA, Mager DL (1992) A human endogenous long terminal repeat provides a polyadenylation signal to a novel, alternatively spliced transcript in normal placenta. *Gene* 121:287-294
- Gorman C** (1985) High efficiency gene transfer into mammalian cells. In D. M. Glover (ed.): *DNA Cloning: A Practical Approach*, pp. 143-190, IRL Press, Oxford, 1985
- Gotzinger N**, Sauter M, Roemer K, Mueller-Lantsch N (1996) Regulation of human endogenous retrovirus-K Gag expression in teratocarcinoma cell lines and human tumours. *J Gen Virol* 77: 2983-2990
- Graham FL**, Eb AJ van der (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467
- Gray DA** (1991) Insertional mutagenesis: neoplasia arising from retroviral integration. *Cancer Invest. USA* 9:295-304
- Haensler J**, Szoka FC Jr (1993) Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem* 4:372-379

- Harada F**, Tsukada N, Kato N (1987) Isolation of three kinds of human endogenous retrovirus-like sequences using tRNA(Pro) as a probe. *Nucleic Acids Res* 15:9153-9162
- Harrison RA**, Thomas ML, Tack BF (1981) Sequence determination of the thiolester site of the fourth component of the human complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7388-7392
- Höhler T**, Meyer CU, Notghi A, Stradmann-Bellinghausen B, Schneider PM, Starke R, Zepp F, Sängler R, Clemens R, Meyer zum Büschenfelde KH, Rittner C (1998) The Influence of Major Histocompatibility Complex Class II Genes and T-Cell V $\beta$  Repertoire on Response to Immunization with HbsAg. *Human Immunology* 59:212-218
- Holmskov U**, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC (1994) Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today* 15:67-74
- Hortin G**, Sims H, Strauss AW (1986) Identification of the site of sulfatation of the fourth component of the human complement. *J Biol Chem* 261:1786-1793
- Innis MA**, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD (1988) DNA sequencing with thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Proc Natl Acad. Sci USA* 85:9436-9440
- International Human Genome Sequencing Consortium** (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
- Isenman DE**, Young JR (1984) The molecular basis of the difference in immune hemolysis activity of the Chido and Rodgers isotypes of the human complement component C4. *J Immunol* 132:3019-3027
- Issekutz TB** (1995) In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, and C5a utilizes LFA-1, and VLA-4. The relative importance of each integrin. *J Immunol* 154:6533-6540
- Ivics Z**, Izsvák Z (1997) Family of Plasmid vectors for the expression of  $\beta$ -galactosidase fusion proteins in eukaryotic cell. *BioTechniques* 22:254-258
- Karp DR** (1983a) Post-translational modification of the fourth component of complement: Sulfatation of the  $\alpha$ -chain. *J Biol Chem* 258:12745-12748
- Karp DR** (1983b) Post-translational modification of the fourth component of complement: Effect of tunicamycin and amino acid analogs on the formation of the internal thiol ester and disulfide bonds. *J Biol Chem* 258:14490-14495
- Kato N**, Shimotono K, VanLeeuwen D, Cohen M (1990) Human proviral mRNAs down regulated in choriocarcinoma encode a zinc finger protein related to krüppel. *Mol Cell Biol* 10:4401-4405
- Kato NS**, Pfeiffer-Ohlsson, Kato M, Larsson E, Rydnert J, Ohlsson R, Cohen M (1987) Tissue-specific expression of human provirus ERV3 mRNA in human placenta: two of the three ERV3 mRNAs contain cellular sequences. *J. Virol.* 61: 2182-2191
- Katsumata K**, Ikeda H, Sato M, Ishizu A, Kawarada Y, Kato H, Wakisaka A, Koike T, Yoshiki T (1999) Cytokine regulation of env gene expression of human endogenous retrovirus-R in human vascular endothelial cells. *Clin Immunol.* 93(1):75-80
- Kennedy N**, Knedlitschek G, Groner B, Hynes NE, Herrlich P, Michalides R, van Ooyen AJJ (1982) Long terminal repeats of endogenous mouse mammary tumor virus contain a long open reading frame which extends into adjacent sequences. *Nature* 295: 622-624
- Kielar D**, Dietmaier W., Langmann T, et al. (2001) Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem (United States)* 47: 2089-2097
- Kim SK**, Wold BJ (1985) Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expression high levels of anti-sense RNA. *Cell* 42:129-138
- Knössel M**, Löwer R, Löwer J (1999) Expression of the human endogenous retrovirus HDTV/HERV-K is enhanced by cellular transcription factor YY1. *J Virol* 73:1254-1261
- Kongsuwan K**, Allen J, Adams JM (1989) Expression of Hox-2.4 homeobox gene directed by proviral insertion in a myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res* 17:1881-1892
- Koyanagi Y**, O'Brien WA, Zhao JQ, Golde DW, Gasson JC, Chen ISY (1988) Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. *Science* 241:1673-1675
- Kulics J**, Colten HR, Perlmutter D (1990) Counterregulatory effects of interferon-gamma and endotoxin on the expression of the human C4 genes. *J Clin Invest* 85:943-949
- Kumar M**, Carmichael GG (1996) Evolution and biological significance of human retroelements. *Virus Genes* 11:133-145

- Kurata H**, Cheng HM, Kozutsumi Y, Yokota Y, Kwasaki T (1993) Role of the collagen-like domain of the human serum mannan-binding protein in the activation of the complement and the secretion of the lectin. *Biochem Biophys Res Commun* 191:1204-1210
- La Mantia G**, Maglione D, Pengue G (1991) Identification and characterization of novel endogenous retroviral sequences preferentially expressed in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Res* 19:1513-1520
- Lander ES**, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, Mc Kernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M. et al. 2001: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001
- Larhammar D**, Servenius B, Rask L, Peterson PA (1985) Characterization of an HLA DRB pseudogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1475-1479
- Larsson E**, Kato N, Cohen M (1989) Human endogenous proviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 148:115-132
- Lavrentieva I**, Khil P, Vinogradova T, Akhmedov A, Lapuk A, Shakova O, Lebedev Yu, Monastyrskaya G, Sverdlov ED (1998) Sequence characteristics, subfamilies and nearest-neighbour dendrogram for the long terminal repeats of the human endogenous retroviruses HERV-K precisely positioned on the human chromosome 19 metric map: Physical neighbourhood does not correlate with identity level. *Human Genet* 102:107-116
- Law SK**, Dodds AW, Porter RR (1984) A comparison of the properties of two classes, C4A and C4B, of human complement component C4. *EMBO J* 3:1819-1823
- Lechler R**, Warrens A (2000) HLA in health and diseases. Academic, London
- Leib-Mösch C**, Halmeier M, Werner T, Geigl EM, Brack-Werner R, Francke U, Erfle V, Hehlmann R (1993) Genomic distribution and transcription of solitary HERV-K LTRs. *Genomics* 18:261-269
- Leib-Mösch C**, Seifarth W (1996) Evolution and biological significance of the human endogenous retroelements. *Virus Genes* 11:133-145
- Lindeskog M**, Medstrand P, Blomberg J (1993) Sequence variation of human endogenous retrovirus ERV-9-related elements in an env region corresponding to an immunosuppressive peptide: transcription in normal and neoplastic cells. *J. Virol.* 67: 1122-1126
- Liszewicz J**, Sun D, Weichold FF, Thierry AR, Lusso P, Tang J, Gallo RC, Agrawal S (1994) Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate complementary to Gag mRNA blocks replication of human immunodeficiency virus type 1 in human peripheral blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7942-7946
- Liu AY**, Abraham BA (1991) Subtractive cloning of a hybrid human endogenous retroviruses and calbindin gene in the prostate cell line PC3. *Cancer Res* 51:4107-4110
- Loos M**, Colomb M (1993) C1, the first component of complement: Structure-function-relationship of C1q and collections (MBP, SP-D, conglutinin), C1-Esterase (C1r and C1s), and C1-inhibitor in health and disease. *Behring Inst Mitt* 93:1-5
- Löwer R**, Boller K, Hasenmaier B, Korbmayer C, Müller-Lantzsch N, Löwer J, Kurth R (1993) Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4480-4484
- Löwer R**, Löwer J, Frank H, Harzmann R, Kurth R (1984) Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J Gen Virol* 65:887-898
- Löwer R**, Löwer J, Kurth R (1996) The viruses in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5177-5184
- Lu JH**, Thiel S, Wiedemann H, Timpl R, Reid KB (1990) Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzym C1r2 C1s2 complex of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *J Immunol* 144:2287-2294

- Ma YJ**, Dissen GA, Rage F, Ojeda SR (1996) RNase Protection Assay. *Methods* 10(3):273-278
- Maeda N** (1985) Nucleotid sequence of the haptoglobin and haptoglobinrelated gene pair. *J Biol Chem* 260:6698-6709
- Mager DL**, Freeman JD (1987) Human endogenous retroviruslike genome with type C pol sequences and gag sequences related to human T-cell lymphotropic viruses. *J Virol* 61:4060-4066
- Maniatis T**, Fritsch EF, Sambrook J (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory).
- Matsushita M**, Endo Y, Fujita T (2000) Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* 164:2281-2284
- Matsushita M**, Fujita T (1992) Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 176:1497-1502
- Mauff G**, Brenden M, Braun-Stilwell M, Doxiadis G, Hauptmann G, Rittner C, Schneider PM, Stradmann-Bellinghausen B, Uring-Lambert B (1990) C4 reference typing report. *Complement Inflamm* 7:193-212
- Mauff G**, Luther B, Schneider PM (1998) Reference typing report of complement component C4. *Exp Clin Immunogenet* 15:249-60
- Mayer J**, Ehlhardt S, Seifert M, Sauter M, Müller Lantzs N,
- Mayer J**, Meese E, Mueller-Lantzs N (1997) Multiple human endogenous retrovirus (HERV-K) loci with gag open reading frames in the human genome. *Cytogenet Cell Genet* 78:1-5
- McClintock B** (1951) Chromosome organization and gene expression. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 16:13-47
- McCombie WR**, Martin-Gallardo A, Gocayne JD, FitzGerald M, Dubnick M, Kelley JM, Castila L, Liu LI, Wallase S, Trapp S, Tagel D, Whalay WL, Cheng S, Gusella J, Frischauff AM, Postaka A, Lehrach H, Collins FS, Kerlavage AR, Fields C, Venter JC (1992) J.C Expressed Genes, Alu repeats and polymorphism in cosmids sequenced from chromosome 4p16.3. *Nature genetics*. 1:385-353
- Medstrand P** und Blomberg J (1993) Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: Differential transcription in normal human tissues. *J Virol* 67:6778-6787
- Melcher T**, Maas S, Herb A, Sprengel R, Seeburg PH, Higuchi M (1996) *Nature* (London) 379, 460-464
- Melton DA**, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR (1984) Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage Sp6 promoter. *Nucleic Acids Res* 12: 7035-7056
- Mi S**, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, La Vallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC Jr, Mc Cay JM (2000) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403:715-717
- Michael NL**, Vahey MT, d'Arcy L, Ehrenberg PK, Mosca JD, Rappaport J, Redfield RR (1994) Negativ-strand RNA transcripts are produced in human immunodeficiency virus type 1-infected cells and patients by a novel promoter downregulated by Tat. *J Virol* 68:979-987
- Mitchel TJ**, Naughton M, Norsworthy P, Davies KA, Walport MJ, Morley BJ (1996) IFN- $\gamma$  up-regulates expression of the complement components C3 and C4 by stabilization of mRNA. *J. Immunol* 156:4429-4434
- Mitchell RS**, Beitzel BF, Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD (2004) Retroviral DNA Integration: ASLV, HIV, and MLV Show Distinct Target Site Preferences. *PLoS Biol* 2:e234
- Miura M**, Yuan J (2000) Transient transfection assay of cell death genes. *Methods Enzymol* 322:480-492
- Miura N**, Prentice HL, Schneider PM, Perlmutter DH (1987) Synthesis and regulation of the human complement C4 genes in stable transfected mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 262:7298-7305
- Miyoshi I**, Yoshimoto S, Fujishitan M, Taguchi H, Kubonishi I, Niiya K, Minezawa M (1982) Natural adult T-cell leukemia virus infection in Japanese monkeys. *Lance* ii, 658
- Modrow S**, Falke D (1997) *Molekulare Virology. Spektrum Lehrbuch*, Springer Verlag
- Moore R**, Dixon M, Smith R, Peters G, Dickson C (1987) Complete nucleotide sequence of a milk-transmitted mouse mammary tumor virus: two frameshift suppression events are required for translation of gag and pol. *J Virol* 61:480-490
- Morel Y**, Bristow J, Gitelman SE, Miller W (1989) Transcript encoded on the opposite strand of the human steroid 21-hydroxylase/complement

- component C4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6582
- Morris KM**, Aden DP, Knowles BB, Colten HR (1982) Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line. *J Clin Invest* 70: 906-913
- Mountz JD**, Talal N (1993) Retroviruses, apoptosis and autogenes. *Immunol Today (England)* 14:532-536
- Murray JAH**, Crockett N (1992) Antisense techniques: an overview. In *Antisense RNA and DNA*, S. 1-49. J.A.H Murray (Ed.). New York: Wiley-Liss, Inc.
- Nellen W**, Lichtenstein C (1993) What makes an RNA antisense-itive? *Trends Biochem Sci* 18:419-423
- Nelson PN** (1995) Retroviruses in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 55: 441-442
- Nelson PN**, Carnegie PR, Martin J, Davari Eftehadi H, Hooley P, Roden D, Rowland-Jones S, Warren P, Astley J, Murray PG (2003) Demystified...Human endogenous retroviruses. *J Clin Pathol* 56:11-18
- Nelson PS**, Hawkins V, Schummer M, Bumgarner R, Ideker NWL, Ferguson C, Hood L (1999) Negative selection: A method for obtaining low-abundance cDNAs using high-density cDNA clone arrays. *Genet Anal* 15:209-215
- Nelson PS**, Hawkins V, Schummer M, Bumgarner R, Ng WL, Ideker T, Ferguson C, Hood L (1999) Negative selection: A method of obtaining low-abundance cDNAs using high-density cDNA clone arrays. *Genet. Anal.* 15, 209-215.
- Neumann E**, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1:841-845
- O'Connell C**, O'Brien S, Nash WG (1984) ERV3, a fully-length human endogenous provirus: chromosomal localization and evolutionary relationships. *Virology* 138:225-235
- Ogasawara H**, Naito T, Kaneko H, Hishikawa T, Sekigawa I, Hashimoto H, Kaneko Y, Yamamoto N, Maruyama N, Yamamoto N (2001) Quantitative analyses of messenger RNA of human endogenous retrovirus in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 28(3):461-464
- Ogbourne S**, Antalis TM (1998) Transcriptional control and role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* 331:1-14
- Okumura K**, Sakaguchi G, Takagi S, Naito K, Mimori T, Igarashi H (1996) Sp1 family proteins recognize the U5 repressive element of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type I through binding to the CACCC core motif. *J Biol Chem* 271:12944-12950
- O'Neill GJ**, Yang SW, Dupont B (1978a) Two HLA-linked loci controlling the fourth component of human complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:5165-5169
- O'Neill GJ**, Yang SW, Tegoli J, Berger J, Dupont B (1978b) Chido and Rodgers blood groups are distinct antigenic components of human complement C4. *Nature* 273:668-670
- Ono M**, Kawakami M, Ushikubo H (1987) Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J. Virol.* 61: 2059-2062
- Ono M**, Toh T, Miyata T, Awaya T (1985) Nucleotide sequences of the syrian hamster intracisternal A-partical gene: close evolutionary relationship of type A partical gene to types B and D oncovirus genes. *J Virol* 55:387-394
- Ono M**, Yasunagy T, Miyata T, Ushikubu H (1986) Nucleotide sequence of the human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* 60:589-598
- Pačes J**, Pavliček A, Pačes V (2002) HERVd: database of human endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Res.* 30: 205-206
- Parker KL**, Shreffler DC, Capra JD (1980) Partial amino acid sequences of the murine fourth component of complement (C4): demonstration of homology with human C4 and identification of the amino-terminal subunit in pro-C4. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4275-4278+
- Paz-Artal E**, Corell A, Varela P, Morales P, Allende L, Alvarez M, Arnaiz-Villena A (1993) New DNA sequences for the genetics variants, C4A3 and C4B1. *Mol Immunol* 30:515-516
- Peeters A**, Lambert PF, Deacon NJ (1996) A fourth Sp1 site in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat is essential for negative-sense transcription. *J Virol* 70:6665-6672
- Prang N**, Wolf H, Schwarzmam F (1995) Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by posttranscriptional negativ regulation of BZLF1. *J Virol* 69:2644-2648
- Prentice HL**, Schneider PM, Strominger JL (1986) C4B gene polymorphism detected in a human cosmid clone. *Immunogenetics* 23:274-276

- Ramadori G**, Tedesco F, Bitter-Suermann D, Meyer zum Buschenfelde KH (1985) Biosynthesis of the third (C3), eighth (C8), and ninth (C9) complement components by guinea pig hepatocyte primary cultures. *Immunobiol* 170:203-210
- Reid KB**, Porter RR (1981) The proteolytic activation systems of complement. *Annu Rev Biochem* 50:433-464
- Remy JS**, Sirlin C, Vierling P, Behr JP (1994) Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjug Chem* 5:647-654
- Reveille JD**, Arnett FC, Wilson RW, Bias WB, McLean RH (1985) Null alleles of the fourth component of the human complement and HLA haplotypes in familial systemic lupus erythematosus. *Immunogenet* 21:299-311
- Rittner C**, Hauptmann G, Grosse-Wilde H, Grosshans E, Tongio MM, Mayer S (1975) Linkage between HLA (major histocompatibility complex) and genes controlling the synthesis of the fourth component of complement. In Kissmeyer-Nielsen F (ed): *Histocompatibility Testing 1975*, pp. 945-954, Munksgard, Copenhagen
- Rittner C**, Kühnl P, Black CM, Pereira S, Welsh KL (1984a) Scleroderma: possible association with the C4 system - a progress report. In: *Histocompatibility testing 1984*, Albert ED (Hrsg), Springer Verlag Berlin, S 394-397
- Rittner C**, Meier EMM, Stradmann B, Giles CM, Köchling R, Mollenhauer E, Kreth HW, (1984b) Partial C4 deficiency in subacute sclerosing panencephalitis. *Immunogenet* 20:407-415
- Roos MH**, Atkinson JP, Shreffler DC (1978) Molecular characterization of the Ss and Slp (C4) proteins of the mouse H-2 complex: subunit composition, chain size polymorphism and an intracellular (PRO-Ss) precursor. *J Immunol* 121: 1106-1115
- Rous P** (1911) A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13:397-411
- Saiki RK**, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
- Saiki RK**, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic Amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354
- Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Samuelson LC**, Wiebauer S, Snow CM, Meisler MH (1990) Retroviral and pseudogen insertion sites reveal lineage of human salivary and pancreatic amylase genes from a single gene during primate evolution. *Mol Cell Biol* 10:2513-2520
- Sanger F**, Nicklen S, Coulsen AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Sargent CA**, Anderson MJ, Hsieh SL, Kendall E, Gomez-Escobar N, Cambell RD (1994) Characterization of the novel gene G11 lying adjacent to the complement C4A gene in the human major histocompatibility complex. *Hum Molecular Genet* 3:481-488
- Sargent CA**, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD (1989) Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Sci USA* 86:1968-1972
- Sauter M**, Schommer S, Kremmer E, Remberger K, Dolken G, Lemm I, Buck M, Best B, Neumann-Haeflin D, Mueller-Lantzsch N (1995) Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J Virol* 69:414-21
- Schifferli JA**, Paccaud JP (1989) Two isotypes of human C4, C4A and C4B have different structure and function. *Complement Inflamm* 6:19-26
- Schneider PM** (1987) *Molekulargenetische Untersuchungen zur Struktur der Gene der vierten Komponente des humanen Komplementsystems*. Dissertation, FB Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Schneider PM** (1990) C4 DNA RFLP reference typing report. *Complement Inflamm* 7:218-224
- Schneider PM** (1995) *Molekulare Genetik und Immunbiologie der vierten Komponente des humanen Komplementsystems*. Habilitation, Medizinischer Fachbereich der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Schneider PM**, Carroll MC, Alper CA, Rittner C, Whitehead AS, Yunis EJ, Colten HR (1986) Polymorphism of the human complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes: Restriction fragment length polymorphism revealing structural deletions, homoduplications and size variants. *J Clin Invest* 78:650-657
- Schneider PM**, Hartung K, Seuchter A, Albert E, Baur MP, Coldewey R, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Rittner C, Schendel D, Deicher HRG

- (1992) Association of MHC class I, II, and III genes with systemic lupus erythematosus: results of a german collaborative study. In: HLA 1991. Vol.2. Tsuji K, Aizawa M, Sazazuki T, editors. Oxford University Press, Oxford, UK 525-528
- Schneider PM**, Mauff G (2003) Complement C4 Protein and DNA Typing Methods. Human Press
- Schneider PM**, Stradmann-Bellinghausen B, Witzel-Schlömp K, Moulds JM, Bontrop R, Rittner C (1998) Comparative DNA sequences analysis and PCR screening for the HERV-C4 endogenous retroviral insertion in primate C4 genes. *Molec Immunol* 35:404
- Schneider PM**, Witzel-Schlömp K, Rittner C, Zhang L (2001b) The endogenous retroviral insertion in the human complement C4 gene modulates the expression of homologous genes by antisense inhibition.
- Schneider PM**, Witzel-Schlömp K, Steinhauer C, Stradmann-Bellinghausen B, Rittner C (2001b) Rapid Detection of the ERV-K(C4) Retroviral Insertion Reveals Further Structural Polymorphism of the Complement C4 Genes in Old World Primates. *Exp Clin Immunogenet* 18:130-134
- Schreiber RD**, Müller-Eberhard HJ (1974) Fourth component of the human complement: Description of a three polypeptide chain structure. *J Exp Med* 140:1324-1335
- Schroder AR**, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F (2002) HIV-I integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110:521-529
- Seidel C**, Donner H, Petershofen E et al. (1999) An endogenous retroviral long terminal repeat at the HLA-DQB1 gene locus confers susceptibility to rheumatoid arthritis. *Human Immunol* 60:63-68
- Seifarth W**, Baust C, Murr A, Skladny H, Krieg-Schneider F, Blusch J, Werner T, Hehlmann R, Leib-Mösch C (1998) Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles. *J Virol* 72:8384-8391
- Seiki M**, Hikikoshi A, Yoshida M (1990) The U5 sequence is a cis-acting repressive element for genomic RNA expression of human T cell leukemia virus type I. *Virology* 176:81-86
- Sen, GC**, Lengyel P (1992) The Interferon System. A Bird's Eye View of its Biochemistry. *J. Biol. Chem.* 267:5017-5020
- Separovic E**, Nadin-Davis SA (1994) Secondary structure within PCR target sequences may facilitate heteroduplex production. *PCR Methods Applic.* 3:248-251
- Shapiro JA**, Cordell B (1982) Eukaryotic mobile and repeated genetic elements. *Biol Cell* 43:31-54
- Shrivastava A**, Calame K (1994) An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Ying-Yang-1. *Nucleic Acids Res* 22:5151-5155
- Singer MF**, Berg P (1991) Genes and Genomics. Blackwell Verlag
- Smit AF** (1999) Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9:657-663
- Spies T**, Bresnahan M, Strominger JL (1989) Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8955-8958
- Starcich B**, Ratner L, Josephs SF, Okamoto T, Gallo RC, Wong-Staal F (1985) Characterization of long terminal repeat sequences of HTLV-III. *Science* 227:538-540
- Stevens JG**, Wagner EK, Devi-Rao GB, Cook ML, Feldman LT (1987) RNA complementary to a herpesvirus gene mRNA is prominent in a latently infected neurons. *Science* 235:1056-1059
- Stonans I**, Stonane E, Russwurm S, Deigner HP, Bohm KJ, Wiederhold M, Jager L, Reinhart K (1999) HepG2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes. *Cytokine* 11:151-156
- Suankratay C**, Mold C, Zhang Y, Potempa LA, Lint TF, Gewurz H (1998) Complement regulation in innate immunity and the acute phase response: inhibition of mannan-binding lectin-initiated complement cytolysis by C-reactive protein (CRP). *Clin Exp Immunol* 113:353-359
- Sverdlov ED** (2000) Retroviruses and primate evolution. *Bioassays* 22:161-171
- Tadmori W**, Mondal D, Tadmori I, Prakash OM (1991) Transactivation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeats by cell surface tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 65:6425-6429
- Tassabehji M**, Strachan T, Anderson M, Campbell RD, Collier S, Lako M (1994) Identification of a novel family of the human endogenous retroviruses and characterization of one family member, HERV-K(C4), located in the complement C4 gene cluster. *Nucleic Acids Res* 22:5211-5217
- Tchenio T**, Heidmann T (1992) High-frequency intracellular transposition of a defective

mammalian provirus detected by an in situ coimmunometric assay. *J Virol* 66:1571-1578

**Teisberg P**, Akesson I, Olaison B, Gedde-Dahl T Jr, Thorsby E. (1976) Genetic polymorphism of C4 in man and localisation of a structural C4 locus to the HLA gene complex of chromosome 6. *Nature* 264:253-254

**Thiel S** (1992) Mannan-binding protein, a complement activating animal lectin. *Immunopharmacology* 24:91-99

**Thompson JR**, Agulnick AD, Ricciardi RP (1994) A novel cis element essential for stimulated transcription of the p41 promoter of human herpesvirus 6. *J Virol* 68:4478-4485

**Ting CN**, Rosenberg MP, Snow CM, Samuelson LC, Meisler MH (1992) Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev* 6:1457-1465

**Tiwari JL**, Terasaki PI (1985) HLA and disease associations. Springer Verlag, New York

**Tonjes RR**, Löwer R, Boller K, Denner J, Hasenmaier B, Kirsch H, König H, Korbmayer C, Limbach C, Lugert R, Phelps RC, Scherer J, Thelen K, Löwer J, Kurth R (1996) HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13:261-267

**Tosi M**, Lévi-Strauss M, Georgatsou E, Amor M, Meo T (1985) Duplications of complement and noncomplement genes of the H-2S region: Evolutionary aspects of the C4 isotypes and molecular analysis of their expression variants. *Immunol Rev* 87:151-183

**Tosic M**, Roach A, de Rivaz JC, Dolivo M, Matthieu JM (1990) Post-transcriptional events are responsible for low expression of myelin basic protein in myelin deficient mice: role of natural antisense RNA. *EMBO J* 9:401-406

**Tristem M** (2000) Identification and characterisation of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. *J Virol* 74: 3715-3730

**Ulgianti D**, Subrata LS, Abraham LJ (2000) The role of Sp Family Members, Basic Kruppel-Like Factor, and E Box Factors in the Basal and IFN- $\gamma$  Regulated Expression of the Human Complement C4 Promoter. *J Immunol* 164:300-307

**Urnovitz HB**, Murphy WH (1996) Human endogenous retroviruses: nature, occurrence, and

clinical implications in human disease. *Clin Microbiol Rev* 9:72-99

**Vaishnav AK**, Mitchell TJ, Rose SJ, Walport MJ, Morley BJ (1998) Regulation of Transcription of the TATA-less Human Complement Component C4 Gene. *J Immunol* 160:4353-4360

**van den Elsen JMH**, Martin A, Wong V, Clemenza L, Rose DR, Isenman DE (2002) X-ray Crystal Structure of the C4d Fragment of Human Complement C4. *J. Mol. Biol.* 322: 1103-1115

**Vanhée-Brossolet C**, Vaquero C (1998) Do natural antisense transcripts make sense in eucaryotes? *Gene* 211:1-9

**Varmus H**, Brown PP. Retroviruses. IN D.E. Bergand MM Howe (eds). (1989) Mobile DNA. pp. 53-108. American Society of Microbiology, Washington

**Vasta GR**, Quesenberry M, Ahmed H, O'Leary N (1999) C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev Comp Immunol* 23:401-420

**Venables P**, Brooks S (1992) Retroviruses: potential aetiological agents in autoimmune rheumatic disease. *Br J Rheumatol* 31:841-846

**Venter JC**, Adams MD, Myers EW et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351

**Villesen P**, Aagaard L, Wiuf C, Pederson TS (2004) Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology* 1:32

**Vinogradova T**, Volik S, Lebedev Yu, Shevchenko Yu, Lavrentyeva I, Khil P, Grzeschik KH, Ashworth LK, Sverdlov ED (1997) Positioning of 72 potentially full size LTRs of human endogenous retroviruses HERV-K on the human chromosome 19 map. Occurrences of the LTRs in human gene site. *Gene* 199:255-264

**Vinogradova TV**, Leppik Lp, Nikolaev LG, Akopov SB, Kleinman AM, Senyuta NB, Sverdlov ED (2001) Solitary Human Endogenous Retroviruses-K LTRs Retain Transcriptional Activity in Vivo, the Mode of Which Is Different in Different Cell Types. *Virology* 290, 83-90

**Wagner EG**, Simons RW (1994) Antisense RNA control in bacteria, phages and plasmid. *Ann Rev Microbiol* 48:713-742

**Wang-Johanning F**, Frost AR, Jian B, Epp L, Lu DW, Johanning GL (2003) Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene* 22: 1528-1535

- Weiber H**, König M, Gruss P (1983) Multiple point mutations affecting the simian virus 40 enhancer. *Science* 219:626-631
- White PC**, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, Stromiger JL (1985) Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1089-1093
- White PC**, New MI, Dupont B. (1987) Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 316:1519-1524
- Wilkinson DA**, Mager DL, Leong JC (1994) Endogenous Human Retroviruses. In J. A. Levy (ed.): *The Retroviridae* (vol 3), pp. 465-535. Plenum Press, New York
- Witzel K**, Chu X, Rittner C (1995) Polymerase chain reaction analysis of the XbaI polymorphism of the human complement C4 genes provides evidence for strong haplotype conservation. *Hum Immunol* 43:165-73
- Witzel K**, Chu X, Rittner C, Schneider PM (1995) PCR analysis of the Xba I polymorphism of the human C4 genes provides evidence for strong haplotype conservation. *Hum Immunol*
- Yang P**, Zemba M, Aboud M, Flugel RM, Lochelt M (1997) Deletion analysis of both the long terminal repeat and the internal promoters of the human foamy virus. *Virus Genes* 15:17-23
- Yang Z**, Yu CY (2000) Organisations and Gene Duplications of the Human and Mouse MHC Complement Gene Cluster. *Exp Clin Immunogenet* 17:1-17
- Yi JM**, Kim HM, Kim HS (2004) Expression of human endogenous retrovirus HERV-W family in various human tissues and cancer cells. *J Gen Virol* 85:1203-1210
- York DF**, Vigne R, Verwoerd DW (1992) Nucleotide sequence of the jaagsiekte retrovirus, an exogenous and endogenous type D and B retrovirus of sheep and goats. *J Virol* 66:4930-4939
- Yu CY** (1991) The complete exon-intron structure of a human complement component C4A gene: DNA sequences, polymorphism, linkage to the 21-hydroxylase gene. *J Immunol* 147:1057-1066
- Yu CY**, Campbell RD, Porter RR (1988) A structural model for the location of the Rodgers and the Chido antigenic determinants and their correlation with the human complement component C4A/C4B isotypes. *Immunogenetics* 27:399-405
- Yu CY**, Chung EK, Yang Y, Blanchong CA, Jacobsen N, Saxena K., Yang Z, Miller W, Varga L, Fust G (2003) Dancing with complement C4 and the RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules of the major histocompatibility complex. *Prog. Nucleic Acid Res Mol Biol* 75:217-292
- Zachar V**, Fink T, Koppelhus U, Ebbesen P (2004) Role of Placental Cytokines in Transcriptional Modulation of HIV Type 1 in the Isolated Villous Trophoblast. *AIDS Research and Human Retrovirus* 18(2):839-847
- Zamore PD**, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000) RNAi: double stranded RNA directs ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25-33
- Elbashir SM**, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20:6877-6888
- Bernstein E**, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366
- Fire A**, SiQun X, Montgomery M, Kostas S, Driver SE, Mello C. *Nature* 391:806-811
- Lehner B**, Williams G, Cambell RD, Sanderson CM (2002) Antisense transcripts in the human genome. *Trends Genet* 18:63-65
- Mitchell TJ**, Naughton M, Norsworthy P (1996) IFN- $\gamma$  up-regulates expression of the complement components C3 and C4 by stabilization of mRNA. *J Immunol* 156:4429
- Zoltán Ivics**, Zsuzsanna I (1997) Family of Plasmid Vectors for the Expression of  $\beta$ -galactosidase Fusion Proteins in Eukaryotic Cells. *BioTechniques* 22:254-258