

Aktivität endogener Retroviren in Tumorgeweben von Primaten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Nadine Keiner
aus Stadtoldendorf

Göttingen, den 25.05.2009

D7

Referent: Prof. Dr. H.-J. Fritz

Korreferent: Prof. Dr. W. Liebl

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.09

Meiner Familie gewidmet

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AAA	Polyadenylierungssignal
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AMG	Aminoguanidin-Hemisulfat
bp	Basenpaare
BCL	<i>B-cell lymphoma</i>
BSA	Rinder-Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	Komplementäre DNA
CI	Zellindex
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Env	<i>envelope</i>
ERV	Endogenes Retrovirus
et al.	und andere (lat. <i>et alii</i> bzw. <i>et aliae</i>)
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G	Guanin
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
h	Stunde

HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HML	<i>human endogenous MMTV-like</i>
HTDV	<i>human teratocarcinoma-derived virus</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani-Medium
LINE	Long interspersed element
LTNP	<i>long-term non-progressors</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
µl	Mikroliter
Mb	Megabasen
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
min	Minute
miRNA	Micro RNA
ml	Milliliter
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren
neg.	negativ
Nkt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
Oligo-dT	Oligodesoxythymidin
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Primer Binding Site (im Virusgenom)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	-log[H ⁺]
Pol	Polymerase
p.t.	nach Transkription (<i>post transcriptionem</i>)
R	Terminale Redundanz
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SINE	<i>Short interspersed element</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i>)
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TM	Transmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Aktive Einheit eines Enzyms (<i>unit</i>)
U3	Unique 3' end
U5	Unique 5' end
UV	Ultraviolett
VLP	<i>virus-like particle</i>
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Retroviren.....	1
1.1.1 Einteilung.....	2
1.1.2 Aufbau	3
1.1.3 Genomorganisation	5
1.2 Die Endogenen Retroviren.....	7
1.3 Humane Endogene Retroviren (HERV)	8
1.4 Die Endogenen Retroviren der Familie K (HERV-K).....	12
1.4.1 Die Bedeutung von HERV-K.....	13
1.4.2 Die Rolle von HERV-K in Melanomen	16
1.4.3 Die Rolle von HERV-K bei HIV-Infektionen	22
1.5 RNA-Interferenz	23
1.6 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Materialien, Organismen und Kulturbedingungen	29
2.1.1 Herstellung und Sterilisation von Lösungen.....	29
2.1.2 Chemikalien und Geräte	29
2.1.3 Verbrauchsmaterial	30
2.1.4 Kits, Reaktionskomponenten und Enzyme	30
2.1.5 Verwendete Oligonukleotide.....	31
2.1.6 Verwendete Bakterien, Plasmide und Cosmide.....	33
2.1.7 Computersoftware und Statistik.....	33
2.2 Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten	34
2.2.1 Amplifikation von DNA mit der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.2.2 Klonierung von PCR-Produkten in Blunt-Vektoren	35

2.2.3	Aufnahme von Plasmiden durch transformationskompetente <i>E.coli</i> -Bakterien.....	36
2.2.4	Plasmidpräparation.....	38
2.2.5	Horizontale Gelelektrophorese	39
2.2.6	Exzision und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel.	41
2.2.7	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	41
2.2.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	42
2.2.9	DNA-Sequenzierung.....	43
2.3	Kultivierung eukaryotischer Zellen	45
2.3.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	45
2.4	Arbeiten mit RNA und Transkriptionsanalyse.....	46
2.4.1	Isolation von RNA aus Zellkulturen.....	47
2.4.2	Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)	47
2.4.3	Quantifizierung von Transkripten mittels Echtzeit-PCR	49
2.4.4	5'-RACE-PCR.....	52
2.5	Der Einfluss von RNA-Interferenz auf Melanomzellen	56
2.5.1	Transfektion und Transduktion von Melanomzellen	56
2.5.2	Analyse der Genregulation durch quantitative Real-Time PCR.....	61
2.5.3	Bestimmung des Zellindex über Impedanzveränderungen.....	62
2.5.4	Durchflusszytometrie	64
3	Ergebnisse.....	68
3.1	HERV-K (HML-6) Expression in Melanomzellen und Melanozyten.....	68
3.1.1	Das Melanozytenisolat NHEM-M2 und die Melanomzelllinien SK-Mel-28 und A-375	68
3.1.2	Erstellung einer Datenbank für HERV-K (HML-6).....	69
3.1.3	Analyse der exprimierten HERVs durch eine 5'-RACE-PCR.....	70

3.1.4	Charakterisierung von melanom- bzw. melanozyten-spezifischen <i>HML-6</i> Transkripten	72
3.2	Analyse von <i>HERV-K-MEL</i> und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten	77
3.2.1	Endogene Expression von <i>HERV-K-MEL</i> in Zelllinien	77
3.2.2	Etablierung der RNA-Interferenz in Melanomzelllinien	79
3.2.3	Silencing von <i>HERV-K-MEL</i> in Melanomzellen	84
3.3	Die Rolle von <i>HERV-K</i> bei SIV-Infektion	110
3.3.1	Adaption der humanen Primer an das Makaken-Genom	110
3.3.2	Expressionsanalyse von <i>HERV-K (HML-2)</i> bei SIV-infizierten Makaken ..	111
3.3.3	Expressionsanalyse von <i>HERV-K (HML-2) in vitro</i>	113
3.3.4	Expressionsanalyse diverser <i>HERV-K</i> Mitglieder <i>in vitro</i>	114
4	Diskussion	118
4.1	Die Analyse der <i>HERV-K (HML-6)</i> Expression in Melanomzellen und Melanozyten mit einer 5'-RACE-PCR	118
4.1.1	Transkriptanalysen mit spezifischen <i>HML-6</i> Primern können Hinweise auf neue Melanommarker geben	119
4.2	Die Expression von <i>HERV-K-MEL</i> beeinflusst das Wachstum von Melanomzelllinien	120
4.2.1	Die Messung von RNA-Interferenz ist in Melanomzellen trotz optimierter und konstanter Bedingungen schlecht reproduzierbar	121
4.2.2	siRNAs gegen unterschiedliche Positionen des <i>HERV-K-MEL</i> haben eine vergleichbare Silencingeffizienz	122
4.2.3	Das Silencing von <i>HERV-K-MEL</i> führt zu einer verminderten Wachstumsdichte der Melanomzellen	123
4.2.4	Die Korrelation der <i>HERV-K-MEL</i> und <i>Bcl2</i> -Expression in der Melanomzelllinie SK-Mel-28	125

4.2.5	Die Nähe der siRNAs zum <i>env</i> -Anteil des HERV-K-MEL korreliert mit der Unterdrückung der <i>Bcl2</i> -Expression.....	126
4.2.6	Die Expressionsprofile in Melanozyten und Melanomzellen unterschieden sich nur geringfügig.....	128
4.2.7	Das <i>HERV-K-MEL</i> Silencing führt zu einer verminderten Expression von <i>Bcl2</i> und <i>Caspase 8</i>	129
4.2.8	Die potenzielle Rolle von <i>HERV-K-MEL</i> in der Differenzierung von Melanomzellen.....	130
4.2.9	Die Behandlung von SK-Mel-28 mit Aminoguanidin führt zu einer signifikant erhöhten Expression von <i>Bcl-XL</i> und <i>Caspase 9</i>	131
4.3	Der Einfluss der SIV-Infektion auf die <i>HERV-K</i> Expression	134
4.3.1	Bei SIV-infizierten Makaken ist die <i>HML-2</i> Expression nicht erhöht	136
4.3.2	Bei einer SIV-infizierten humanen T-Zelllinie ist <i>HML-2</i> Expression nicht erhöht, wohl aber die von <i>HML-3</i>	137
4.4	Abschließende Bewertung und Ausblick.....	139
5	Zusammenfassung	143
6	Literaturverzeichnis	145
7	Anhang.....	162
7.1	Datenbankerstellung für die HERV-K (HML-6) spezifische Amplifikation.....	162
7.1.1	Suchsequenz für HERV-K (HML-6) LTRs.....	162
7.1.2	Blastergebnisse der <i>UCSC</i> -Datenbank	163
7.1.3	Vergleich der LTR3-Sequenzen	165
7.1.4	Vergleich der Sequenzierungen mit der <i>NCBI</i> -Datenbank	172
7.2	Datenbankerstellung für makakenspezifische HML-2 Primer.....	181
	Abbildungs-, Gleichungs- und Tabellenverzeichnis	182
	Danksagung.....	186
	Lebenslauf	187

1 EINLEITUNG

1.1 Retroviren

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden Retroviren zum ersten Mal beschrieben. Im Jahr 1908 gelang es Ellermann und Bang erstmals, die Mäuseleukämie durch Ultrafiltrate zu übertragen. PEYTON ROUS entdeckte 1911, dass es zu einer Tumorerkrankung kommt, wenn ultrafiltrierte Extrakte aus Geflügelsarkomen auf zuvor gesunde Hühner transferiert werden. Das hierfür verantwortliche Retrovirus wurde nach seinem Entdecker Rous-Sarkom-Virus genannt. Ein weiterer Hinweis, dass Retroviren mit Tumorerkrankungen assoziiert sein können gelang schließlich 1936 J.J. BITTNER, der das MMTV (Maus-Mammatumor-Virus) als Erreger der malignen Milchdrüsenerkrankung der Maus identifizierte. Im Gegensatz zu den zuvor entdeckten Retroviren kann MMTV nicht nur als infektiöses, von der Zelle freigesetztes, exogenes Partikel übertragen werden (horizontale Übertragung), sondern auch als endogener Bestandteil des Genoms von Keimbahnzellen auf die Folgegeneration (vertikale Übertragung).

Nach der Entdeckung der reversen Transkriptase durch TEMIN, MITUZAMI und BALTIMORE im Jahr 1970 und dem bereits zuvor beobachteten Zusammenhang zwischen diesen Viren und Tumorerkrankungen wurde der Kunstbegriff „Onkornaviren“ geschaffen, der sowohl das onkogene Potential als auch das RNA-Genom dieser Viren in dieser Bezeichnung vereint. Dass die tumorerzeugende Fähigkeit in Form von „Onkogenen“ in der viralen Erbinformation verankert ist, wurde letztlich 1976 VON H.E. VARMUS, J.M. BISHOP, P.K. VOGT und D. STEHELIN beschrieben (MODROW *et al.*, 2003).

1980 beschrieb die Arbeitsgruppe rund um GALLO mit dem HTLV (humanes T-Zell-Leukämie-Virus) das erste Retrovirus, das bei erwachsenen Menschen Krebserkrankungen verursachen kann (GALLO, 1986). Zu den wohl bekanntesten humanen Retroviren zählt das HIV (humanes Immundefizienzvirus), welches von L. MONTAGNIER 1983 als Auslöser der erworbenen Immunschwäche AIDS identifiziert wurde (BARRE-SINOUSI *et al.*, 1983).

1.1.1 Einteilung

Retroviren sind die am höchsten organisierte Form der Retroelemente. Es wird angenommen, dass exogene Retroviren von endogenen Retroposonen abstammen, die eine eigene Reverse Transkriptase, aber keine DNA-Wiederholungssequenzen (LTR, *Long Terminal Repeat*) besitzen. Durch die Akquirierung eines zellulären *Envelope*-Gen könnte es so zur Entstehung der heutigen exogenen Retroviren gekommen sein.

Die Familie der *Retroviridae* ist in sieben Genera unterteilt: α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren sowie Lenti- und Spumaviren (Tabelle 1-1). Die Zuordnung erfolgte anhand der Besonderheiten während der Infektionen, verursachten Krankheiten sowie nach morphologischen und genetischen Unterschieden.

Retroviren können exogenen und endogenen sein. Die exogenen Retroviren besitzen in ihrem Genom alle Informationen, die für den Ablauf eines Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln benötigt werden. Außerdem kann das Genom bestimmter exogener Retroviren Onkogene und andere Kontrollelemente enthalten. Diese Viren sind in der Lage, sich von Organismus zu Organismus zu verbreiten (horizontale Verbreitung), wobei einige von ihnen defekt sind, da ihnen essentielle Information für den produktiven Infektionszyklus fehlen. Sie benötigen für die Produktion infektiöser Viren und ihre Weiterverbreitung die Hilfe eines anderen Retrovirus (Helfervirus), das die fehlenden Funktionen ergänzt.

Die endogenen Retroviren sind hingegen in allen Zellen eines Organismus integriert und werden vertikal über die Keimbahn übertragen. Unter bestimmten Umständen werden sie zur Produktion von exogenen, infektiösen Partikeln aktiviert. Jedoch weisen die meisten endogenen Retroviren so umfassende Deletionen auf, dass auch Helferviren nicht mehr zu einer Aktivierung beitragen können (MODROW *et al.*, 2003).

Tabelle 1-1: Einteilung und charakteristische Vertreter der Retroviren (modifiziert nach MAHY, 2007 und MODROW *et al.*, 2003).

Genus	Viren	Wirt	Typ
α-Retroviren	Aviäres Leukämie-Virus (ALV)	Vögel	Exogen / Endogen
	Rous-Sarkom-Virus (RSV)	Vögel	Exogen
β-Retroviren	Maus-Mamma-Tumor-Virus (MMTV)	Mäuse	Exogen / Endogen
	Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV)	Affen	Exogen
	Humane endogene Retroviren Klasse K (HERV-K)	Menschen	Endogen
γ-Retroviren	Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Mo-MLV)	Mäuse	Exogen / Endogen
	Felines Leukämie-Virus (FeLV)	Katzen	Exogen / Endogen
	Porcine endogene Retroviren (PERV)	Schweine	Exogen / Endogen
	Baboon endogene Retroviren (BaEV)	Baboons	Endogen
	Humane endogene Retroviren Klasse W (HERV-W)	Menschen	Endogen
δ-Retroviren	Bovines Leukämie-Virus (BLV)	Rinder	Exogen
	Humanes T-Zell Leukämie-Virus (HTLV-1/-2)	Menschen	Exogen
	HRES-1	Menschen	Endogen
ϵ-Retroviren	Walleye Haut-Sarkom-Virus (WDSV)	Fisch	Exogen
Lentiviren	Humane Immundefizienzviren (HIV-1/-2)	Menschen	Exogen
	Simiane Immundefizienzviren (SIV)	Affen	Exogen
Spumaviren	Humane Spumaviren	Menschen	Exogen
	Simianes Foamy-Virus (SFV)	Nichthumane Primaten	Exogen

1.1.2 Aufbau

Der Aufbau der infektiösen Partikel der verschiedenen Retroviren ist im Allgemeinen sehr ähnlich. Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von 100 nm. Das Capsid ist von einer Hüllmembran (*envelope*) umgeben, die von der

Cytoplasmamembran abgeleitet ist (Abbildung 1-1). In dieser Membran findet sich das transmembrane Hüllprotein (TM), das über eine Region von etwa 20 hydrophoben Aminosäuren verankert ist. An den extraviralen Bereich des TM-Proteins ist nichtkovalent das externe Glykoprotein (SU, Surface Unit) gebunden. Beide Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein gebildet und liegen als trimere Komplexe in der Hüllmembran vor.

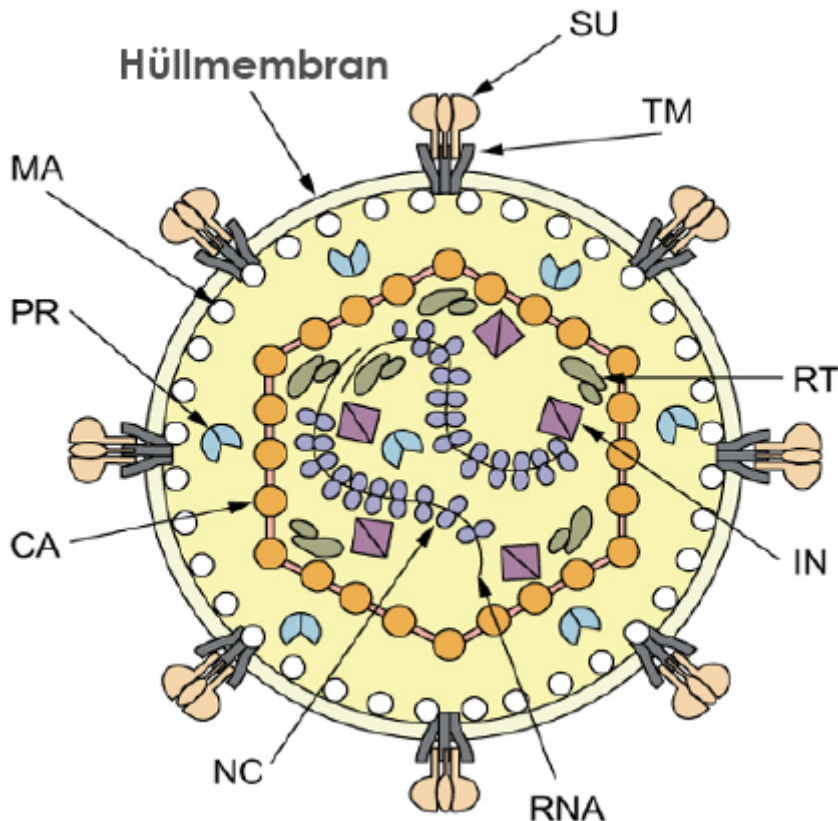


Abbildung 1-1: Aufbau eines Retroviruspartikels (modifiziert nach Vogt, 1997). Beschriftung siehe Text.

Die in dem intraviralen Teil der Membran angelagerten und netzartig miteinander verbundenen Matrixproteine (MA) sind über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Hüllmembran verbunden.

Das Virus-Kapsid, welches sich im Inneren des Viruspartikels befindet, kann eine sphärisch-ikosaedrische (α -, β -, γ - und δ -Retroviren sowie Spumaviren) oder konische (bei einigen β -Retroviren und Lentiviren) Form aufweisen und besteht aus Kapsidproteinen (CA). Im Kapsid sind zwei gleiche Moleküle einzelsträngiger RNA in Positivstrang-Orientierung als Virusgenom enthalten,

die nicht kovalent und auch nicht durch Basenpaarung miteinander verbunden sind, aber mit dem Nukleokapsidproteine (NC) komplexiert vorliegen. Die Kapsidproteine, Matrixproteine und Nukleokapsidproteine sind Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine). Im Viruspartikel finden sich zudem die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR).

1.1.3 Genomorganisation

Das Genom der Retroviren besteht aus einzelsträngiger RNA, die mit ihrer 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung alle Merkmale einer eukaryotischen mRNA aufweist (FURUICHI *et al.*, 1975; GILLESPIE *et al.*, 1973). Je nach Virustyp umfasst das Genom 7 bis 12 kb.

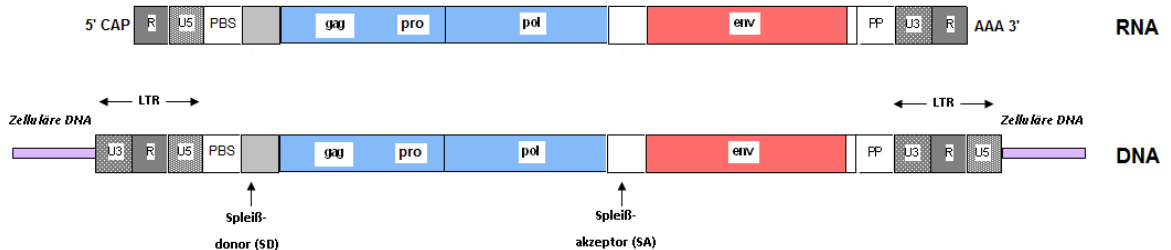


Abbildung 1-2: Genomorganisation der RNA von Retroviren und einer integrierten Provirus-DNA. PBS: Primer-Binde-Region; Ψ : Sequenzfolge, über die das RNA-Genom mit den Nukleokapsidproteinen während der Morphogenese wechselwirkt; R: wiederholte (redundante) Regionen; U3 und U5: einzigartige (unique) Regionen am 3'- bzw. 5'-Ende; PP: Polypurinstelle; LTR (long terminal repeat): Anordnung jener Sequenzelemente, die im Verlauf der reversen Transkription gebildet werden (modifiziert nach MODROW, 2003).

Die nachfolgende Beschreibung der einzelnen Regionen bezieht sich auf integrierte Provirus-DNA (Abbildung 1-2).

Die kodierenden Regionen des Provirus werden nach Integration am 5'- und am 3'-Ende von zwei nicht kodierenden, regulatorischen Kontrollsequenzen, den so genannten LTR-Sequenzen flankiert. Diese analog aufgebauten Regionen, die sich in ihrer Größe innerhalb der Familie der Retroviren stark unterscheiden, bestehen aus drei Elementen. Die U3-Region, die aus dem 3'-Ende der viralen RNA hervorgegangen ist, beinhaltet einen Großteil der Kontrollelemente für Transkription und Replikation wie Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, Promotor- und Enhancersequenzen. Die Integrität der

Enhancersequenzen spielt hierbei eine entscheidende Rolle, da von ihr das Ausmaß der Virusreplikation in der Wirtszelle und damit der Einfluss des Virus auf den Wirtsorganismus abhängt. Kleine Veränderungen in der Basenfolge dieser Region können zu Veränderungen der Pathogenität eines Virus führen. Die R-Region leitet sich aus dem 5'- und dem 3'-Ende der RNA ab. Sie enthält ein Polyadenylierungssignal (GUNTAKA, 1993) und spielt eine wichtige Rolle in der reversen Transkription der RNA. Bei Lentiviren enthält sie ein *transactivation response element* (TAR) (COFFIN, 1990), das nach Bindung von Tat zu einer transkriptionellen Aktivierung des in der proviralen U3-Region des 5'LTR gelegenen Promotors führt (DAELEMANS *et al.*, 2000). Außerdem wurde für die R-Region des HIV-1 gezeigt, dass sie die Verpackungseffizienz erhöht (DAS *et al.*, 1997). Die U5-Region, deren Ursprung im 5'-Ende der RNA liegt, bildet schließlich das letzte Element eines LTRs. Auch sie kann durch verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Replikationsaktivität eines Provirus nehmen (RABBI *et al.*, 1997; KIERMER *et al.*, 1998).

Auf den LTR-Bereich folgt die Primerbinderegion (PBS), die über Basenpaarung mit dem 3'-Ende einer zellulären tRNA komplexiert ist. Im Zuge der reversen Transkription lagert sich die tRNA an die PBS der retroviralen RNA an und stellt ein freies OH-Ende für die Bildung eines DNA-Stranges bereit.

Der Genomabschnitt zwischen PBS und dem Beginn des *gag*-Gens wird als Leader-Sequenz bezeichnet. Diese beinhaltet eine Spleißdonor-Stelle (SD) zur Produktion von gespleißter *env*-mRNA.

Direkt im Anschluss folgt stromabwärts das eigentliche retrovirale Genom, das Leserahmen (*Open Reading Frames*, ORFs) für vier Gene umfasst. Von 5' nach 3' sind diese Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env*.

Der *gag*-Leserahmen enthält die Information für das gruppenspezifische Antigen und kodiert für das Gag-Pol-Vorläuferprotein. Aus ihm entstehen nach Transkription und Translation durch proteolytische Spaltung das Matrix-, das Kapsid- und das Nukleokapsidprotein.

Außerdem kodiert der *pol*-Abschnitt für zwei Enzyme. Zum Einen für die Reverse Transkriptase, die sowohl für das Umschreiben von retroviraler RNA zu DNA als auch durch ihre RNaseH-Aktivität für den Abbau des dabei

entstehenden RNA/DNA-Hybridmoleküls verantwortlich ist. Zum Anderen geht aus dem *pol*-Gen die Integrase hervor, die durch ihre Endonuklease- und DNA-Ligaseaktivität die Integration des retroviralen Genoms in die DNA der Wirtszelle ermöglicht.

Zwischen der *gag*- und der *pol*-Region liegt der Leserahmen für die Protease. Je nach Retrovirus wird dieses Protein als Teil des *gag*- oder *pol*-Leserahmens oder in einem separaten ORF exprimiert. Es ist für die proteolytischen Spaltungen während eines retroviralen Lebenszyklus verantwortlich und katalysiert die Prozessierung der Gag-Vorläuferproteine.

Der stromabwärts gesehen letzte Leserahmen kodiert für *env*, welcher die Information für die Hüllproteine des Virus enthält. Auch dieser ORF kodiert zunächst für ein Vorläuferprotein, das schließlich in Transmembran- und Oberflächenproteine gespalten wird (OROSZLAN UND LUFTIG, 1990).

Im Anschluss an die kodierenden Gene befindet sich der Polypurinbereich (PP), gefolgt von einem zweiten LTR-Bereich. Der Polypurinbereich ist ebenfalls ein Kontrollelement bei der Initiation der reversen Transkription.

1.2 Die Endogenen Retroviren

Neben dem exogenen Replikationsweg (horizontale Übertragung) durch Bildung neuer infektiöser Partikel können Retroviren auch endogen (vertikal) weitergegeben werden. Bei der endogenen Übertragung werden die Proviren als Bestandteil von Keimbahnzellen auf die Folgegeneration übertragen. So existieren neben den exogenen auch so genannte endogene Viren, die in Keimbahnzellen und somit auch in allen somatischen Zellen inseriert sind.

Die Endogenen Retroviren (ERVs) sind bei verschiedenen Tieren wie auch im Menschen zu finden. Es wird geschätzt, dass es theoretisch zu einer *de novo* Insertion von Retroelementen pro hundert Geburten kommt (DEININGER UND BATZER, 2002). GEORGIU und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass es in humanen Oozyten zu Retrotranspositionen von mit HERV-K10 verwandten transponierbaren Elementen kommt, und deren transkriptionelle Expression nachweisen. Anhand der Ergebnisse der Arbeit wurde die These aufgestellt, dass es sich hierbei um einen essentiellen Vorgang bei der Oozyten-

Entwicklung handelt (GEORGIU *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass auch darüber hinaus eine Transpositionsaktivität endogener Retroviren in Säugetieren zu finden ist, da verschiedene Retroviren bekannt sind, von denen sowohl exogene als auch endogene Stämme auftreten (BOEKE UND STOYE, 1997; Tabelle 1-1).

Neben einer potentiellen *de novo* Insertion sind endogene Retroviren in der Lage, sich durch Transkription, reverse Transkription und erneute Integration intrazellulär zu vermehren. Dieser Prozess führt zu einer Akkumulation retroviraler Erbinformation im Genom der Wirtszelle.

Abhängig vom Zeitpunkt der Integration lassen sich die ERVs in „alte“ und „moderne“ Retroviren unterscheiden. Da sie in allen Mitgliedern einer Klasse nachweisbar sind, muss die Integration der „alten“ ERVs vor der Differenzierung der einzelnen Ordnungen stattgefunden haben. Diese Retroviren sind durch Mutationen, Rekombination und Deletionen in ihrem Genom im Laufe der Evolution nicht mehr replikationskompetent und liegen teilweise nur fragmentiert vor. „Moderne“ Retroviren finden sich nur in bestimmten Familien oder Gattungen und sind heutigen exogenen Viren sehr ähnlich, was für eine spätere Integration spricht. Die Nachweisbarkeit von Genprodukten dieser ERVs ist ein Beleg für ihre Replikationsfähigkeit und ein weitestgehend intaktes Genom (TODARO *et al.*, 1974). Inwieweit diese Eigenschaft eine potentielle Gefahr für den Träger endogener Retroviren ist, ist nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Es gibt jedoch zahlreiche Untersuchungen, die auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Krankheiten wie diversen Krebsarten oder Autoimmun-Krankheiten und dem Vorhandensein bestimmter endogener Retroviren hinweisen (Tabelle 1-2).

1.3 Humane Endogene Retroviren (HERV)

In Zusammenhang der systematischen Sequenzierung des humanen Genoms durch das Human Genom Sequencing Consortium im Jahr 2001 stellte sich heraus, dass dieses zu etwa 8% aus Sequenzen besteht, die sich endogenen Retroviren bzw. LTR-Elementen zuordnen lassen (LANDER *et al.*, 2001; Abbildung 1-3).

Der Ursprung heutiger humaner endogener Retroviren sind retrovirale Proviren, die vor etwa 40 Millionen Jahren in das menschliche Genom integriert sind (LÖWER *et al.*, 1996). Es wird vermutet, dass aufgrund fehlenden Selektionsdrucks im Hinblick auf infektiöse Viruspartikel und der Akkumulation von Mutationen im Laufe der Evolution ein Großteil dieser Viren nicht transkribiert wird und diese nicht mehr replikationskompetent sind. So besitzen nur wenige endogene Retroviren ein vollständiges Genom, welches mit dem exogener Retroviren zu vergleichen ist (BANNERT UND KURTH, 2004). Häufig treten so genannte *solitary LTRs* auf, welche aufgrund von homologer Rekombination der flankierenden LTRs die internen Sequenzen verloren haben (LANDER *et al.*, 2001).

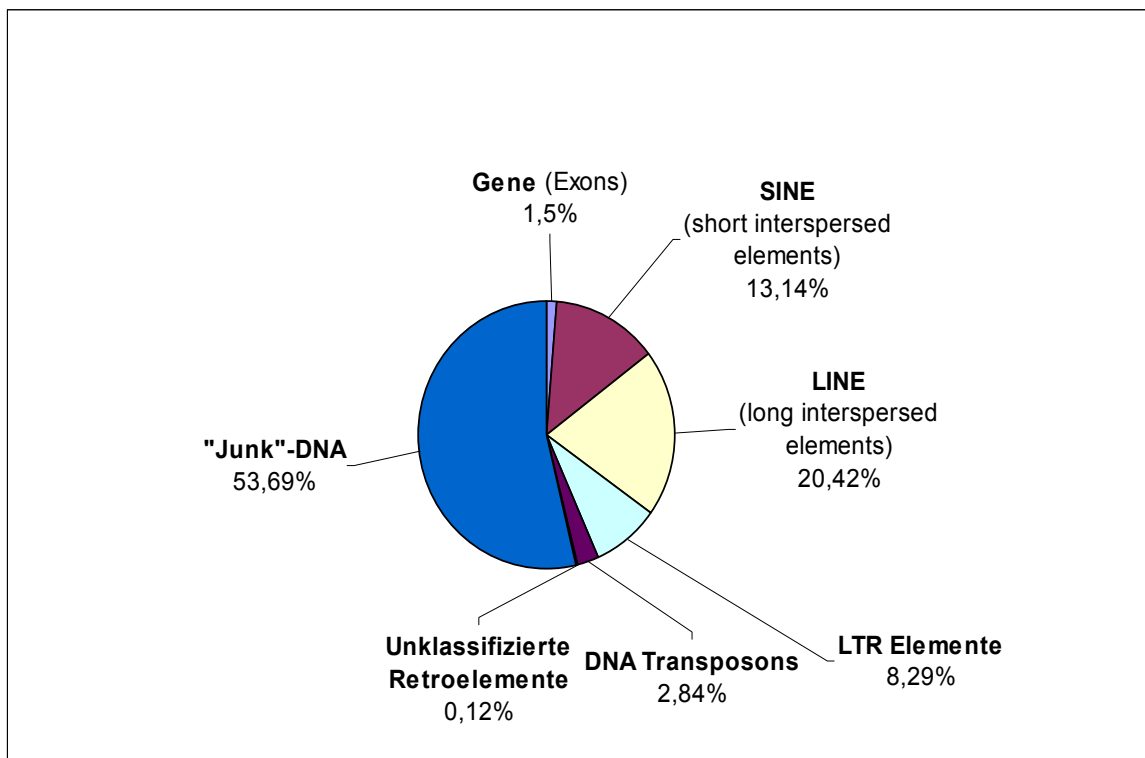


Abbildung 1-3: Zusammensetzung des humanen Genoms (nach LANDER *et al.*, 2001).

Die humanen endogenen Retroviren werden in drei Klassen eingeteilt. Als Einteilungskriterium dient eine Sequenzhomologie zu exogenen Retroviren im *pol*-Gen. Der Klasse I werden all diejenigen HERVs zugeordnet, die eine Homologie mit γ -Retroviren aufweisen, wohingegen HERVs der Klasse II Basenfolgen mit α -, β - und δ -Retroviren gemeinsam haben. Die Klasse III mit

HERV-L als bisher einzigem Mitglied weist Homologien zu den *Spumaretroviridae* auf (WILKINSON *et al.*, 1994).

Die weitere Unterteilung und Benennung humaner endogener Retroviren beruht auf der Primerbindungsstelle (PBS), welche die reverse Transkription initiiert. Dabei erfolgt die Benennung anhand des Ein-Buchstaben-Codes der Aminosäure der jeweiligen tRNA. Diese Klassifizierung ist jedoch nur bedingt geeignet, da auch einige nur entfernt verwandte Viren die gleiche tRNA verwenden. Oft besitzt man auch unvollständige Informationen über diese Region aufgrund von Mutationen oder Deletionen, so dass die Klassifizierung schwierig ist (BANNERT UND KURTH, 2004). Trotz der großen Anzahl an deletierten, mutierten und somit inaktiven Proviren ist die Expression von mRNA und Proteinen von verschiedenen HERV-Sequenzen in humanen Gewebe nachgewiesen worden. So wurde die Expression von HERV-K (FRANKLIN *et al.*, 1988; SIMPSON *et al.*, 1996), HERV-H (JOHANSEN *et al.*, 1989), HERV-R (ERV-3) (LARSSON *et al.*, 1994; ANDERSSON *et al.*, 1998) und HERV-W (BLOND *et al.*, 1999; STAUFFER *et al.*, 2004) in der Plazenta gezeigt. Bei HERV-W lässt sich eine Beteiligung an der zellulären Differenzierung des Synzytiotrophoblasten, die als Teil der Endzotten der Plazenta eine wichtige Rolle im maternofetalen Stoffaustausch einnehmen, über Syncytin, ein Produkt des *env*-Gens, nachweisen (MI *et al.*, 2000). Sollte sich die Präsenz des Env-W Proteins als existentiell für die Synzytiotrophoblastenentstehung herausstellen, so würde dies bedeuten, dass die Infektion von HERV-W eine zentrale Rolle bei der Evolution der höheren Primaten spielt.

Aber auch in Verbindung mit diversen Krankheiten konnte eine erhöhte Expression einzelner endogener Retroviren nachgewiesen werden (Tabelle 1-2; VOISSET *et al.*, 2008). So gibt es Hinweise dafür, dass humane endogene Retroviren in der Entstehung von Multipler Sklerose, Lupus erythematoses, Diabetes mellitus Typ I und anderen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen könnten (PERRON UND SEIGNEURIN, 1999). Der Einfluss endogener retroviraler Elemente auf die Entstehung maligner Erkrankungen wird intensiv untersucht. So wurde von WANG-JOHANNING und Kollegen in einer Arbeit ein Zusammenhang zwischen HERV-E und Prostatakarzinomen sowie HERV-K und Brustkrebs hergestellt (WANG-JOHANNING *et al.*, 2003a und b). Im Rahmen

der Arbeiten wiesen sie eine erhöhte Expression des *env*-Gens in Tumorgeweben, nicht jedoch in gesunden Zellen, nach.

Tabelle 1-2: Assoziation und Auftreten verschiedener HERV-Familien in Geweben und bei Krankheiten. Modifiziert nach NELSON *et al.*, 2004 und VOISSET *et al.*, 2008.

HERV-Familie	Klasse	Primer-Bindungsstelle	Beteiligt an/ gefunden bei
HERV-H	I	tRNA ^{His}	Lungenkarzinom, Teratokarzinom, Multiple Sklerose (MS)
HERV-E	I	tRNA ^{Glu}	Exprimiert in Plazentagewebe, Brust- und Kolon-Karzinomen, Eierstockkrebs, Psoriasis, normaler Haut, interstitielle Lungenerkrankungen
ERV-9	I	tRNA ^{Arg}	In undifferenzierten NT2/D1-Zellen, Teratokarzinom
HERV-R	I	tRNA ^{Arg}	Placentabildung, geringe Expression in Thymus, Brust, Lunge und Pankreas, Eierstockkrebs
HRES-1	I		Antikörper gegen synthetisches HRES-1 gefunden bei Patienten mit MS, SLE (Systemic Lupus Erythematosus), Sjögren Syndrom, außerdem Expression im Gehirn und in der Leber
HERV-W	I	tRNA ^{Trp}	Multiple Sklerose, Schizophrenie, außerdem Expression in Placenta und Testis (<i>env</i> des ERVWE1-Lokus kodiert für Syncytin)
HERV-K	II	tRNA ^{Lys}	Vornehmlich in reproduktiven Geweben, humane Teratokarzinome, testikuläre Tumore, Brustkrebs, Melanome, Eierstockkrebs, Keimzelltumore
HERV-L	III	tRNA ^{Leu}	Rheumatische Arthritis, Placenta, Brustkrebs

Auch eine Schutzfunktion endogener retroviraler Proteine wird diskutiert. Es ist denkbar, dass durch die Expression endogener retroviraler Proteine ein Schutz des Organismus vor einer Infektion mit naheverwandten exogenen Retroviren

hervorgerufen werden kann (LÖWER *et al.*, 1996). Bei der Maus konnte gezeigt werden, dass eine endogene Expression des Sag-Proteins (akzessorisches Protein mit Superantigen-Funktion) von MMTV eine Infektion mit exogenem MMTV gleichen Subtyps verhindert (GOLOVKINA *et al.*, 1992). Auch PONFERRADA und Kollegen zeigten in einer Arbeit, dass aktive HERVs einen Einfluss auf die Infektion mit exogenen Retroviren haben können. Gegenstand seiner Arbeit war das Env-Glykoprotein einer HERV-W-Sequenz, dessen Einbau in die Zellmembran zu einer deutlich geringeren Infektionsrate durch das Milz-Nekrosevirus (SNV) führte (PONFERRADA *et al.*, 2003)..

1.4 Die Endogenen Retroviren der Familie K (HERV-K)

Charakteristisch für die HERV-K Familie ist eine Primerbindestelle, die mit einer tRNA für die Aminosäure Lysin komplexiert vorliegt, weshalb dem Akronym HERV das Suffix K (Einbuchstaben-Kode für Lysin) angefügt wurde. Die HERV-K Familie kommt mit 500-600 Kopien im haploiden Genom des Menschen und aller Altweltaffen vor. Zusätzlich findet man noch ca. 10.000 solitäre LTRs im menschlichen Genom verteilt.

Phylogenetische Analysen der Sequenz der reversen Transkriptase dieser HERVs führten zur Identifizierung von zehn HERV-K Familien im humanen Genom. Diese wurden aufgrund ihrer Homologie zum betaretroviralen Maus-Mamma-Tumor Virus (MMTV) als human MMTV-like (kurz: HML) bezeichnet und nummeriert (HML-1 bis -10) (ANDERSSON *et al.*, 1999; MEDSTRAND *et al.*, 1993).

Die erste HERV-K Sequenz wurde 1986 von ONO mit einer Sonde gegen eine konservierte Region des *pol*-Gens im Southern Blot entdeckt. Dieses Provirus, HERV-K10, war auch das erste, welches vollständig sequenziert wurde (ONO *et al.*, 1986). Es weist für alle viralen Gene weitestgehend offene Leserahmen auf. Anhand von Untersuchungen verschiedener Primatenarten wurde der zeitliche Rahmen für die erste Integration retroviraler Elemente der HERV-K-Familie festgelegt (MARIANI-COSTANTINI *et al.*, 1989; STEINHUBER *et al.*, 1995). Demnach ereignete sich die Integration nach der Aufteilung in Alt- und Neuweltaffen und vor der Trennung der Altweltaffen in *Hominoidea* und *Cercopithecoidea*. Die in der Literatur zu diesem Thema genannten Daten schwanken zwischen 25 und

45 Millionen Jahren. Dass Viren dieser Gruppe auch noch vor ca. fünf Millionen Jahren nach der evolutionären Trennung der Menschen von den Affen aktiv waren, zeigen einige wenige Loci, die auf den Menschen beschränkt sind (BARBULESCU *et al.*, 1999; MEDSTRAND UND MAGER, 1998; TURNER *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu anderen HERV-Familien, die durch Deletionen und Mutationen stark geschädigt sind, sind viele Mitglieder der HERV-K Familie weitestgehend intakt, was auf ihr evolutionär „junges“ Alter zurückzuführen ist. Sie stellen die biologisch aktivste Familie innerhalb der humanen endogenen Retroviren dar. So wurden weitere, scheinbar intakte, HERV-K Proviren beschrieben, darunter auch das „jüngste“ HERV-K Provirus, HERV-K 113. Der Zeitpunkt der ersten Integration dieses endogenen Retrovirus wird auf weniger als 20.000 Jahre geschätzt. Das Provirus liegt auf Chromosom 19p13.11 und ist noch nicht komplett in der humanen Population fixiert. Genotypisierung mit genetisch unterschiedlichen Individuen zeigt eine allele Häufigkeit von 19% (TURNER *et al.*, 2001). Das Provirus kommt bei kaukasischer Bevölkerung eher selten vor, während es bei afrikanischer Abstammung häufiger zu finden ist. Es besitzt vollständige Leserahmen für alle beschriebenen viralen Gene und alle bekannten funktionellen Domänen sind intakt (MOYES *et al.*, 2005). Daher ist es denkbar, dass ein replikationskompetentes HERV-Provirus innerhalb der humanen Population existiert.

1.4.1 Die Bedeutung von HERV-K

Die humanen endogenen Retroviren der HERV-K Familie kommen in ihrem Aufbau replikationskompetenten exogenen Retroviren sehr nahe (LÖWER *et al.*, 1996). Die damit verbundene Expression auf mRNA- und Proteinebene konnte bereits nachgewiesen werden. So wurden retrovirale Ribonukleinsäuren in menschlichem Lungen-, Muskel-, Plazenta- und Nierengewebe gefunden (MEDSTRAND *et al.*, 1993). Die Produktion HERV-K spezifischer Vollängen- und gespleißter mRNA konnte in Teratokarzinomzellen und in Melanomen nachgewiesen werden (LÖWER *et al.*, 1993; MUSTER *et al.*, 2003). Zusätzlich zur Vollängen-mRNA und der einfach gespleißten *env*-mRNA, werden noch zwei doppelt gespleißte Transkripte gebildet, die für zwei akzessorische Proteine, Rec und Np9, kodieren (LÖWER *et al.*, 1995; ARMBRÜSTER *et al.*, 2002).

Desweiteren wird ein einfach gespleißtes 1,5 kb großes Transkript mit bis heute unbekannter Bedeutung exprimiert (Abbildung 1-4). Die Expression und das korrekte Spleißen der unterschiedlichen mRNAs ist von Bedeutung, da nur so Proteine gebildet werden, welche mit einer eventuellen Funktion an zellulären Prozessen beteiligt sein können.

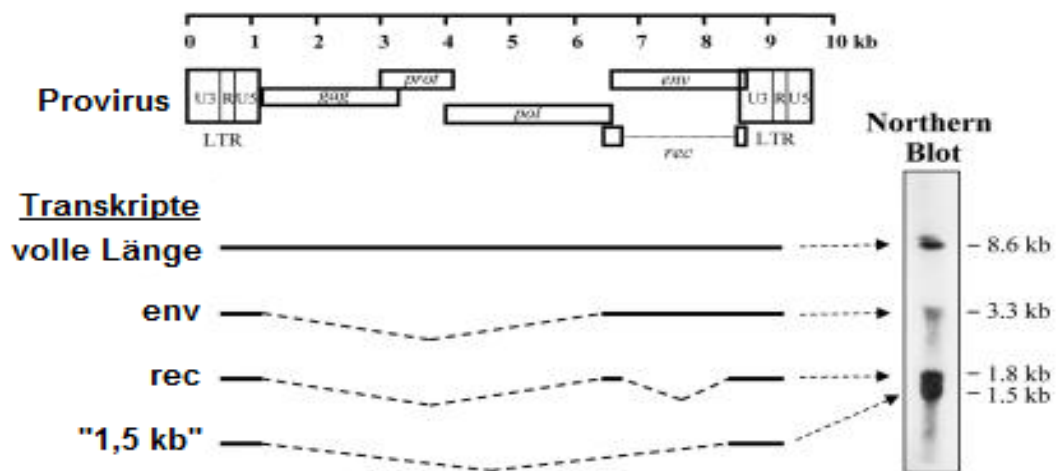


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des proviralen Aufbaus und der entstehenden Transkripte von HERV-K (aus BANNERT *et al.*, 2004).

SAUTER und Kollegen konnten Antikörper gegen HERV-Gag-Proteine bei Patienten mit Keimbahntumoren nachweisen und so eine gerichtete humorale Immunantwort belegen. Darüber hinaus kam es bei diesen Patienten zu einer deutlich erhöhten Proteinexpression in den Tumorzellen (SAUTER *et al.*, 1995; HERBST *et al.*, 1996). In beiden Arbeiten zeigte sich ein gegenüber gesunden Individuen stark erhöhter Titer der anti-Gag- und der anti-Env-Antikörper. Allerdings kann daraus nicht auf einen ätiologischen Zusammenhang geschlossen werden.

HERV-K kodiert zudem als einzige Familie innerhalb der endogenen Retroviren für virusähnliche Partikel (VLPs) (BOLLER *et al.*, 1993; LÖWER *et al.*, 1993). Diese Partikel wurden in Teratokarzinom-Zelllinien nachgewiesen (BOLLER *et al.*, 1983; LÖWER *et al.*, 1984) und in Anlehnung daran *Human Teratocarcinoma Derived Virus* (HTDV) Partikel genannt. Ähnliche Partikel wurden in Melanomzellen entdeckt (MUSTER *et al.*, 2003).

Die Aktivität reverser Transkriptase wurde sowohl in Teratokarzinom-Zelllinien, als auch in Melanomzellen nachgewiesen (TÖNJES *et al.*, 1996, MUSTER *et al.*, 2003). Die Produktion der anderen viralen Genprodukte und deren enzymatische Aktivität konnte ebenfalls gezeigt werden. So bilden GH-Zellen ein myristiliertes Gag-Vorläuferprotein, das durch autoproteolytische Aktivität der HERV-K Protease prozessiert wird (BOLLER *et al.*, 1993; MÜLLER-LANTZSCH *et al.*, 1993; SCHOMMER *et al.* 1996; KITAMURA *et al.*, 1996), woraus Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidprotein entstehen. In Melanomzellen konnten sowohl prozessierte Gag-Proteine, eine funktionelle Protease, als auch das Env-Vorläuferprotein und prozessiertes TM- und SU-Protein nachgewiesen werden (MUSTER *et al.*, 2003).

Wie zuvor beschrieben, spielt schon bei der Einteilung der HERV-K Familie die Homologie zu MMTV-Sequenzen eine wichtige Rolle. Daher lag eine Untersuchung eines potenziellen Zusammenhangs zwischen HERV-K und der Entstehung von Brustkrebs im Menschen nah. Es wurde sowohl im gesunden als auch in tumorösen Brustgewebe nach Hinweisen auf eine erhöhte Expression von HERV-K gesucht (WANG-JOHANNING *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum gesunden Gewebe wurden in fast allen Brustkrebszelllinien und Tumorgeweben *env*-Transkripte gefunden.

Dass auch andere gynäkologische Tumoren mit HERV-K und dessen Genexpression in Verbindung gebracht werden können, zeigte eine weitere Arbeit (WANG-JOHANNING *et al.*, 2007). Neben endogenen Sequenzen wurde in Ovarialtumorzellen eine erhöhte Expression von Env-Proteinen nachgewiesen, die eindeutig von einem HERV-K Mitglied stammten. Die Tatsache, dass eine humorale und zelluläre Immunreaktion gegen HERV-Proteine in Krebspatienten festgestellt wurde, eröffnet die Möglichkeit, diese Antigene eventuell für eine Immuntherapie oder Diagnose zu nutzen. Auch die Expression der mRNA könnte als Tumormarker eingesetzt werden und wurde daher in dieser Arbeit untersucht.

Auch wenn in einigen Studien im Tiermodell bereits gezeigt werden konnte, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression endogener Retroviren und Immun- und Tumorerkrankungen besteht, gelang dies im Menschen noch nicht eindeutig. Es gibt jedoch kontrovers diskutierte Hinweise, dass HERVs in der

Ätiologie von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus (CONRAD *et al.*, 1997), multiple Sklerose (SUGIMOTO *et al.*, 2001) oder bei systemisch auftretendem Lupus erythematosus (OGASAWARA *et al.*, 2001) eine Rolle spielen könnten.

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

1.4.2 Die Rolle von HERV-K in Melanomen

SCHIAVETTI und Kollegen untersuchten 2002 mononukleäre Blutzellen von Melanompatienten, die im Rahmen einer Studie mit antigenischen Peptiden gegen MAGE-3 vakziniert wurden. Bei MAGE handelt es sich um eine Familie von Genen, die in einer Vielzahl von Tumoren erhöht, in normalen Geweben jedoch nicht exprimiert vorliegen (CHOMEZ *et al.*, 2001). Es hatte sich in der Vakzinierungsstudie gezeigt, dass die Präsentation eines MAGE-3-Peptids durch HLA-A1 zu einer signifikanten Tumorregression in 7 von 25 Melanompatienten führt (BALDO *et al.*, 1992). Bei einem Patienten konnte sogar beobachtet werden, dass es zu einer kompletten Regression von fünf Lungenmetastasen nach Vakzinierung kam und der Patient anschließend über vier Monate keine neuen Metastasen aufwies. Aus den Melanomzellen dieses Patienten wurde polyadenylierte RNA isoliert. Nach cDNA-Synthese und Klonierung wurde ein cDNA-Screening durchgeführt. Es ergab sich, dass einer der cDNA-Klone an seinen 5'- und 3'-Enden eine hohe Homologie zu LTR-Sequenzen von MMTV oder auch HERVs aufwies. Außerdem enthielt dieser Klon, der von SCHIAVETTI mit cDNA104 benannt wurde, auch andere Sequenzen, die typisch für ein retrovirales Transkript sind. Das Vorhandensein einer Primer-Bindestelle für Lysin (K) deutete darauf hin, dass es sich hierbei um ein Mitglied der HERV-K Familie handelte. Die cDNA enthielt keinen ORF, der für ein komplettes retrovirales Protein kodierte. Jedoch gab es einen Leserahmen, der trotz des Vorhandenseins von Stoppcodons 78% Homologie

Nach Identifizierung von HERV-K-MEL wurde von SCHIAVETTI und Kollegen mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) analysiert, wie stark exprimiert dieses gespleißte Transkript in verschiedenen Geweben vorliegt (Abbildung 1-6).

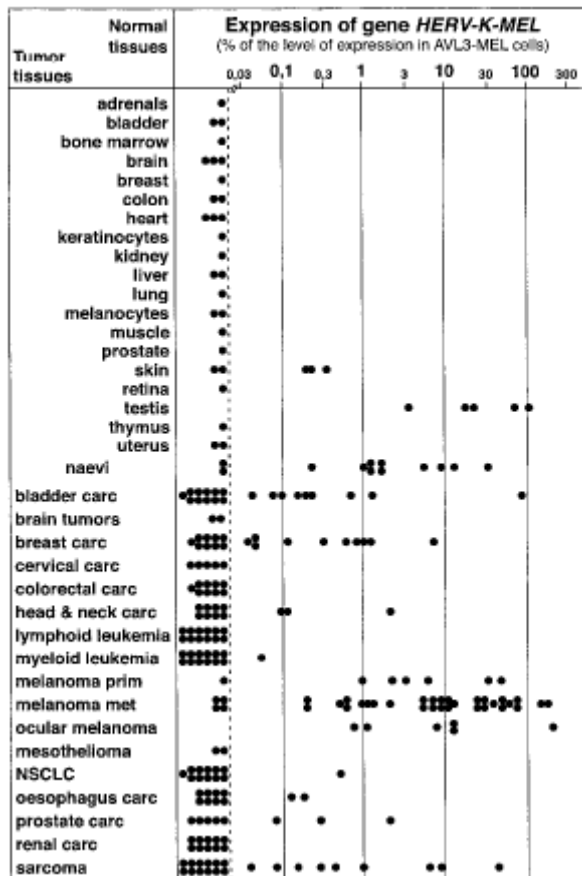


Abbildung 1-6: Expression der *HERV-K-MEL* Gens in normalen und Tumorgeweben. Die Bestimmung erfolgte mittels qRT-PCR unter Verwendung der Abbildung 1-5 gekennzeichneten Primer; normalisiert wurde gegen β -Actin. Jeder Punkt repräsentiert die Expressionshöhe von *HERV-K-MEL* im Gewebe. Die Angabe der relativen Expression erfolgt in Bezug auf die Expression in spezifischen Melanomzellen (AVL3-MEL). Aus SCHIAVETTI *et al.*, 2002.

In den meisten normalen Geweben konnte kein *HERV-K-MEL* Transkript nachgewiesen werden. Jedoch lag es hochexprimiert in Testisgewebe und in einigen Hautproben vor. Besonders in den meisten Melanomisolaten, inklusive primären und metastasierenden kutanen Melanomen sowie primäre Augenmelanomen, war ein starker Expressionsanstieg zu messen. Auch in einer Vielzahl der untersuchten Muttermale (Naevi), die häufig als Vorläufer für Melanome bezeichnet werden, war eine Steigerung messbar. Diese Beobachtungen deuten nach SCHIAVETTI darauf hin, dass *HERV-K-MEL*

hauptsächlich in Zellen melanozytischen Ursprungs exprimiert wird. Außerdem wird vermutet, dass aufgrund der fehlenden bzw. sehr geringen Expression in Melanozyten *HERV-K-MEL* als früher Marker für eine Transformation der Melanozyten in tumoröses Gewebe wie maligne Melanome geeignet sein könnte (SCHIAVETTI *et al.*, 2002).

Eine kürzlich erschienene Studie konnte einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung von *HERV-K-MEL* bei der Entstehung von malignen Melanomen geben. So konnte gezeigt werden, dass die Impfung mit einer Gelbfieber-Vakzine die Inzidenz von malignen Melanomen verringert. Der Impfstoff enthält ein Antigen, das eine hohe Homologie zu *HERV-K-MEL* aufweist und noch zehn Jahre nach Vakzinierung zu einem zehnfach verminderten Risiko einer Melanomerkrankung beitragen kann (MASTRANGELO *et al.*, 2009).

Das maligne Melanom ist der Hauttumor mit der höchsten Malignität und einer hohen und raschen Metastasierungstendenz. Es entsteht intradermal aus Melanozyten oder aus bereits vorhandenen Naevi. Da diese sich in der Epidermis befinden, entwickeln sich 90% der Tumore primär an der Haut. Das maligne Melanom ist außerordentlich gefährlich, da es dazu neigt, bereits bei kleiner Tumorgöße zu metastasieren und nur in geringem Maße auf eine Therapie anspricht (BERKING *et al.*, 2005). Obwohl die Prävalenz für maligne Melanome weitaus geringer ist als die für nicht-maligne, werden die meisten Todesfälle bei Hautkrebserkrankungen durch diese Form verursacht. Die Ätiologie der malignen Transformation gesunder Melanozyten ist nur teilweise bekannt.

Seit Anfang der 1970er Jahre nahm die Inzidenz für maligne Melanome signifikant zu (DE VRIES *et al.*, 2003; DE VRIES *et al.*, 2004). Derzeit treten pro Jahr weltweit etwa 2-3 Millionen nicht-melanom assoziierte Hautkrebserkrankungen sowie 132 000 Fälle des malignen Melanoms auf. (WHO, 2009). Die Erkrankungsfälle nehmen dabei um 6% pro Jahr zu (WEINSTOCK, 1998), wobei es jedoch geographische und ethnische Unterschiede gibt. In der kaukasischen Bevölkerung liegt die Inzidenz des malignen Melanoms um bis zu 100mal höher als bei Afrikanern oder Asiaten (ARMSTRONG UND KRICKER, 1995).

Neben der Herkunft und dem Wohnort hat die steigende Inzidenz weitere Ursachen. So ist das Vorhandensein einer großen Anzahl atypischer Naevi der größte Risikofaktor in der hellhäutigen Bevölkerung, die aufgrund der geringeren Pigmentierung der Haut und der Augen ein ohnehin erhöhtes Risiko aufweist. Außerdem führen gehäufte Sonnenbäder bei hoher UV-Dosis und starken Sonnenbränden ebenfalls zu einem signifikant erhöhten Auftreten von Hautkrebs. Zudem spielt das Alter, eine genetische Prädisposition, immunsuppressive Faktoren und das Lebensalter, in dem erstmals eine starke Sonnenexposition stattgefunden hat, eine entscheidende Rolle (WHITEMAN *et al.*, 2001).

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

Wie bei vielen anderen Krebsarten haben auch maligne Melanome einen genetischen Hintergrund. Etwa 10% aller malignen Melanome treten familiär gehäuft auf. Bei Patienten mit familiärem Melanom wurden verschiedene Gene gefunden, die mit dem dysplastischen Nävuszellnävus-Syndrom und dem damit stark erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Melanoms verbunden zu sein scheinen (BERKING *et al.*, 2005). Die Gene *CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) und *CDK4* (*Cyclin-dependent kinase 4*) sind in den Fokus des Interesses gerückt. Auch *p16*, ein Gen für ein Tumor Suppressor Protein mit einer wichtigen Rolle bei der Zellzyklus-Kontrolle und der Apoptose, ist relativ gut untersucht. Mutationen von *p16* treten bei 25% der familiären Melanome auf (HUSSUSSIAN *et al.*, 1994). *CDK4*-Mutationen dagegen wurden nur in wenigen familiären Melanomen gefunden (ZUO *et al.*, 1996). Allerdings konnte bisher weder für familiär auftretende noch spontane Melanome ein einziges verantwortliches Gen gefunden werden, das in einer Mehrzahl der Melanompatienten mutiert oder verändert exprimiert war (BATAILLE, 2003).

Jedoch treten vermehrt Mutationen von *N-Ras* und *p53* (10-20% aller Fälle) (POLSKY UND CORDON-CARDO, 2003; CHUDNOVSKY *et al.*, 2005) und im *BRAF*-Gen auf (60%). Dieses hat einen Einfluss auf die RAS-RAF-ERK-MAP Signaltransduktion (ANDERSEN *et al.*, 2004).

Eine Mutationsanalyse der Genfamilie der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) in humanen Melanomen identifizierte somatische Mutationen in 23% der Melanome. Fünf Mutationen in *MMP8*, einem der am häufigsten mutierten Gene, reduzierte die MMP-Enzymaktivität deutlich. Die Expression des wildtypischen *MMP8* inhibiert hingegen das Wachstum von Melanomzellen *in vitro* und die Tumorbildung *in vivo*. Daher wird vermutet, dass das Wildtyp-*MMP8* die Melanomprogression inhibieren kann (PALAVALLI *et al.*, 2009).

Einige Studien haben gezeigt, dass auch dem PI3K-AKT-mTOR Signalweg eine maßgebliche Rolle im Überleben und der Resistenz von Tumorzellen zukommt (MEIER *et al.*, 2009; BROGNARD *et al.*, 2001).

Melanomzellen können häufig resistent gegen eine Vielzahl chemotherapeutischer Agenzien sein, da es im Rahmen des Transformationsprozesses zu Veränderungen des Apoptoseweges kommt (SERRONE UND HERSEY, 1999). So kann es zu Resistenzen gegen apoptoseinduzierende Stoffe wie Cisplatin, Vincristin, Camptothecin und einigen anderen kommen (SERRONE UND HERSEY, 1999; McCLAY *et al.*, 1996). Außerdem exprimieren Melanomzellen im Gegensatz zu Melanozyten $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Dieser Rezeptor interagiert mit Kollagen und erhöht die Expression des antiapoptotisch wirkenden *Bcl2*, was zum Überleben der Tumorzellen führt (VAN BELLE *et al.*, 1999; PETITCLERC *et al.*, 1999). Als ein weiteres antiapoptotisches Gen wird *Survivin* erhöht exprimiert (GROSSMAN *et al.*, 1999).

Die Expression von endogenen retroviralen Sequenzen ist in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht worden. Erste Hinweise auf eine Korrelation der *HERV-K* Expression mit verschiedenen apoptoseassoziierten Genen konnten in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden.

Möglicherweise führt eine verbesserte Diagnostik und eine erhöhte Aufmerksamkeit zu einer statistischen Erhöhung der bekannten Hautkrebsfälle. Im Unterschied zu anderen, malignen Tumoren ist die frühzeitige Entdeckung eines Melanoms relativ leicht möglich, da es durch seinen Sitz an der Haut

leicht diagnostiziert werden kann. Das maligne Melanom kann in allen Altersstufen auftreten, vor dem 15. Lebensjahr ist es allerdings selten, gehäuft tritt es zwischen dem 40. und 55. Lebensjahr auf (WHO, 2007).

Nach wie vor stellt die chirurgische Entfernung des Primärtumors die einzig potentiell erfolgreiche Behandlung dar. Ohne Behandlung beträgt die Überlebenszeit durchschnittlich sechs Monate.

Heute ist, trotz der zahlenmäßigen Zunahme, die generelle Prognose des Melanoms besser, da die Tumoren durch frühe Diagnose zum Zeitpunkt der Operation einen geringen Invasionsgrad aufweisen und somit besser heilbar sind.

1.4.3 Die Rolle von HERV-K bei HIV-Infektionen

Neben der Assoziation von HERV-K mit verschiedenen Krebs- und Autoimmunerkrankungen gibt es Studien, die auf eine Korrelation zwischen HERV-K und HIV-1 Infektionen hindeuten. So fand man bei HIV-1 infizierten Patienten mit akuter Blinddarmentzündung, dass ihre Leukozyten HERV-VLPs (*virus-like particles*) bildeten (ORENSTEIN, 2000). Im Plasma und Urin von HIV-1 Patienten konnten HERV-reaktive Antikörper gefunden werden (LÖWER *et al.*, 1996; STEVENS *et al.*, 1999). LÖWER und Kollegen fanden zudem HERV-K Antikörper im Plasma von 70% der an der Studie teilnehmenden HIV-1 Infizierten, wogegen nur 3% der gesunden Blutspender selbige aufwiesen (LÖWER *et al.*, 1996). Auch in Drogenkonsumenten konnten Antikörper nur nach HIV-1 Serokonversion nachgewiesen werden (VOGETSEDER *et al.*, 1993). Durch die Messung einer erhöhten Expression von *HERV-K* in Patienten mit HIV-1 assoziierter Demenz erhärtete sich die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen HIV-1 Infektion und der *HERV-K* Aktivierung (JOHNSTON *et al.*, 2001). Zudem konnte die Existenz extrazellulärer *HERV-K* RNA, vornehmlich der Familien HML-2 und -3, in ca. 95% der Patienten gezeigt werden (CONTRERAS-GALINDO *et al.*, 2006 a). Insbesondere die VLP-bildende HERV-K (HML-2) Familie scheint hierbei eine besondere Rolle zu spielen. So konnte durch Sequenzanalysen eine Aktivierung von 32 der insgesamt 128 Mitglieder dieser Familie nachgewiesen werden (CONTRERAS-GALINDO *et al.*, 2006 b). Es ist jedoch nach wie vor unklar, ob der erhöhten *HERV-K* Expression spezifische

pathologische Störungen in Assoziation mit der HIV-1 Infektion wie Immunsuppression zugrunde liegen, oder ob die HIV-1 Partikel oder viralen Produkte einen direkten Einfluss haben. Desweiteren ist ungeklärt, ob die *HERV-K* Aktivierung zellulär bedingt ist (CONTRERAS-GALINDO *et al.*, 2007). CONTRERAS-GALINDO und Kollegen untersuchten deshalb, ob es einen Zusammenhang zwischen dem HIV-1 Titer und der *HERV-K* Expression gibt. Tatsächlich wiesen *in vitro* Experimente in stimulierten PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) darauf hin, dass die Hochregulation von *HERV-K* von der Dosis der HIV-1 Partikel abhängig zu sein scheint. *In vivo* konnte ein derartiger Zusammenhang aber nicht gezeigt werden (CONTRERAS-GALINDO *et al.*, 2007). Zusätzliche Studien sind daher nötig, um die genaue Rolle von *HERV-K* bei der HIV-1 Infektion und Progression zu klären.

Untersuchungen zur Korrelation von HIV-2 und HERVs sind bisher nicht veröffentlicht. Auch für das mit HIV-2 eng verwandte SIV (*simian immunodeficiency virus*) sind bislang keine Arbeiten bekannt. Erste Untersuchungen zur *HML-2* und *-3* Expression im Zusammenhang mit SIV *in vivo* und *in vitro* wurden in dieser Arbeit vorgenommen.

1.5 RNA-Interferenz

Um die genaue Funktion eines Gens zu klären, ist eine Analyse der Veränderungen bei Regulation des Zielgens von besonderem Interesse. Früher war dies nur über langwierige und teils schwierige Klonierungen zu erreichen, die schließlich zur Generierung von Knockout-Mutanten (z.B. in Mäusen oder Zellen) führten. Seit längerem lassen sich jedoch mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi) Mangelphänotypen *in vitro* schnell erzeugen. Der als RNA-Interferenz bezeichnete Vorgang ist eine sequenzspezifische Herabregulation eines Gens durch ein kurzes Stück doppelsträngiger, zu einem bestimmten Abschnitt des Zielgens komplementärer RNA. Diese Regulation wird als „Knockdown“ eines Zielgens bezeichnet.

Die RNAi-Technik basiert auf dem hochkonservierten System der Zellen zur post-transkriptionellen Regulierung von zelleigenen Genen und zur Verteidigung gegen Viren. Dieser Mechanismus muss sich schon vor der Trennung von Tier- und Pflanzenwelt entwickelt haben, da er bisher in fast allen

untersuchten eukaryotischen Spezies vom Pilz bis zum Menschen gefunden werden konnte (SHARP, 2001).

Die ersten Beobachtungen von RNA-Interferenz wurden an Pflanzen (BAULCOMBE, 1999) und bei Pilzen (COGONI *et al.*, 1996) in Zusammenhang mit posttranskriptionellen Gen-Inaktivierung gemacht.

Eine Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in dem Nematoden *C. elegans* führte zu einem spezifischen Abbau komplementärer mRNA (FIRE *et al.*, 1998). In Experimenten an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde gezeigt, dass dsRNA in einem ATP-abhängigen Vorgang zu kleineren Nukleotidfragmenten prozessiert wird (ZAMORE *et al.*, 2000).

Die Initiation der RNA-Interferenz erfolgt über die Endonuklease Dicer, ein Enzym, das der RNase III analog ist. Dabei wird doppelsträngige RNA unterschiedlicher Länge unabhängig davon, ob es sich dabei um die RNA eines Virus oder einer zelleigenen regulatorischen RNA handelt, in kleine Stücke von 21 bis 25 Nukleotiden Länge geschnitten. Dicer arbeitet in einer ATP-abhängigen Reaktion. Die dabei entstehen Produkte werden siRNAs (*small interfering RNAs*) genannt, wenn sie aus exogenen Quellen kommen, oder aber miRNAs (*microRNAs*), wenn sie von RNA-kodierenden Genen des zelleigenen Genoms stammen. Daneben gibt es noch weitere Klassen von kurzen RNA-Fragmenten wie z.B. rasiRNAs, piRNAs und smRNAs, auf die an dieser Stelle aber nicht weiter eingegangen werden soll.

Nach der Prozessierung durch das Enzym Dicer entstehen aus langen exogenen dsRNAs die siRNAs (Abbildung 1-7) oder aus den kurzen endogenen miRNA-Vorläufern (pre-miRNAs) mit unvollkommenen Haarnadelstrukturen (*stem-loops*) die miRNAs (TANG, 2005). Sowohl siRNAs als auch miRNAs wurden als sequenzspezifische posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression identifiziert und weisen jeweils am 3'-Ende eines jeden Stranges einen charakteristischen Überhang von zwei Nukleotiden auf. Die Genregulation erfolgt bei den siRNAs über sequenzspezifisches Schneiden der perfekt komplementären mRNA, wohingegen die miRNAs eine translationale Repression herbeiführen und es zu einer Degradation des Transkripts bei nicht perfekt komplementären Zielsequenzen kommt. Da die Prozessierung von

miRNA für diese Arbeit unerheblich war, beschränkt sich die weitere Beschreibung nur auf siRNA.

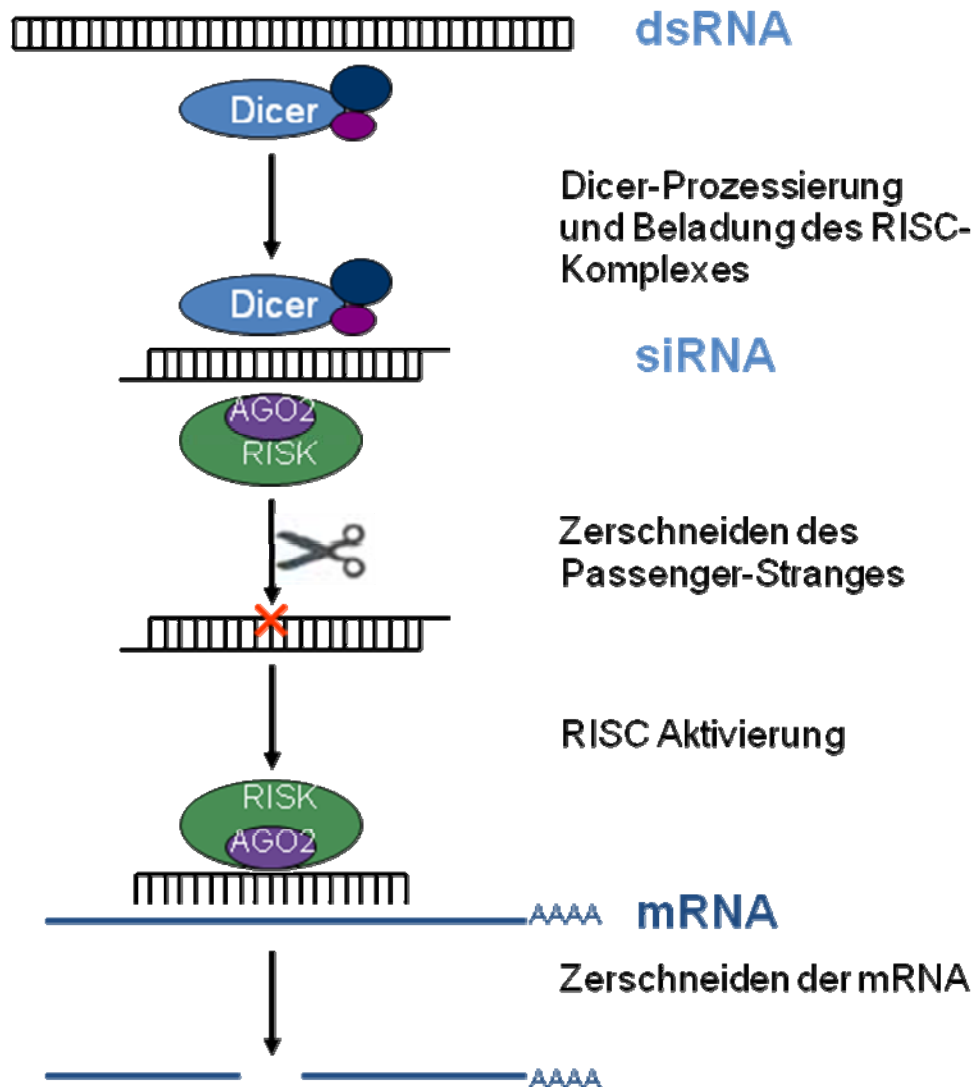


Abbildung 1-7: Vereinfachter schematischer Ablauf des RNAi-Mechanismus in Bezug auf siRNAs in Säugetieren. Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach DE FOUGEROLLES *et al.*, 2007.

Der siRNA-Mechanismus ist wie bereits erwähnt eine evolutionär hochkonservierte Antwort auf von außen in die Zelle eingebrachte dsRNA. Nach dem Schneiden der dsRNA durch die Endonuklease Dicer entstehen siRNAs von 21-23 Nukleotiden Länge. Die siRNAs werden daraufhin in den RISC-Komplex (RNA induced silencing complex) inkorporiert. Nach Entwindung der RNA in einer ATP-abhängigen Reaktion kommt es zu einer Aktivierung des RISC-Komplexes. Das mit dem RISC assoziierte AGO2 (Argonaut 2) enthält

eine katalytische Domäne und sorgt für die Restriktion des Passenger-Stranges, so dass RISC den komplementären Strang (Guide) enthält. Dieser kann jetzt mRNAs mit komplementären Sequenzen erkennen und zerschneiden, wodurch es nicht mehr zur Synthese des entsprechenden Proteins kommen kann. Der RISC- / siRNA-Komplex wird wiederverwertet und kann somit auf weitere Ziel-RNAs wirken (Abbildung 1-7) (DYKXHOORN *et al.*, 2003).

Obwohl der Vorgang der Wechselwirkung von dsRNA und der komplementären RNA der Wirtszelle in der Tier- und Pflanzenwelt ein hochkonservierter Vorgang ist, induziert das Eindringen einer dsRNA von mehr als 30 Nukleotiden Länge eine Interferonantwort in der betroffenen Zelle, welche zum generellen Stopp der Translation und der Einleitung von Apoptose führt. Hierfür verantwortlich ist die durch dsRNA aktivierte Proteinkinase R (PKR), die nach Dimerisierung und Autophosphorylierung den Initiationsfaktor eIF-2 α der Proteinsynthese phosphoryliert. Daraufhin kommt es zur Inhibition der Translation (WILLIAMS *et al.*, 1997; GIL UND ESTEBAN, 2000). Außerdem wird das 2',5'-Oligoadenylat-polymerase/RNaseL-System aktiviert, was zur Inhibition der gesamten Proteinsynthese der Zelle und letztlich zur Induktion von Apoptose führt.

In Untersuchungen konnte 2001 gezeigt werden, dass durch kurze, nur 21-23 Nukleotide lange und chemisch synthetisierte siRNAs keine Interferonantwort ausgelöst wird, die Expression des Zielgens jedoch erfolgreich gehemmt werden kann (ELBASHIR *et al.*, 2001 a,b). Die synthetischen siRNAs nutzen dabei den RNAi-Mechanismus, wobei sie ohne Dicer-Prozessierung direkt in den RISC-Komplex inkorporiert werden können. Die Menge der ausgewählten Proteine ließ sich so innerhalb der Zellen um bis zu 95% reduzieren. Die siRNAs wirkten dabei schon in nanomolaren Konzentrationen. Der Effekt hielt über mehrere Zellteilungen bis zu zehn Tagen an (TUSCHL *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu Pilzen (COGONI *et al.*, 2000), Pflanzen (DALMAY *et al.*, 2000) und Nematoden (SIJEN *et al.*, 2001), die siRNAs vervielfältigen können, gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass dies auch in Säugetierzellen möglich ist. Die Regulation von Proteinen mittels siRNA-Transfektion kann in diesem System daher immer nur temporär sein. Um dieses Problem zu lösen wurde in zahlreichen Experimenten versucht, möglicherweise stabile Knockdown-

Zelllinien über die Verwendung von Vektor basierten Ansätzen zu generieren. Dabei werden haarnadelförmige dsRNAs (shRNA, *short hairpin RNAs*) in die Zellen transfiziert und exprimiert. Die shRNAs werden dann wiederum durch Dicer in siRNAs überführt (PADDISON *et al.*, 2002).

Obwohl siRNAs in aller Regel äußerst spezifisch wirken, ist es dennoch bei jeder Untersuchung mit dieser Methode notwendig, eine Reihe von Kontrollen durchzuführen, um unspezifische Effekte auszuschließen. Hierzu zählt die Verwendung von Kontroll-siRNAs, die gegen kein bekanntes Gen gerichtet sind, somit keine Effekte hervorrufen sollten und zeigen, ob die Transfektionsmethode eine Auswirkung auf die Zellen hat. Desweiteren sollten verschiedene siRNAs, die unterschiedliche Sequenzen innerhalb einer mRNA erkennen, benutzt werden, um Veränderungen in der Expression der Ziel-RNA zu verifizieren.

Die RNA-Interferenz bietet eine Möglichkeit, in Zukunft potenziell jedes beliebige Protein auszuschalten und somit ein Mittel gegen Virusinfektionen oder andere Krankheiten in der Hand zu haben. So haben bereits erste Versuche gezeigt, dass RNAi gegen Humanpathogene eingesetzt werden kann (BANERJEA *et al.*, 2003; BODEN *et al.*, 2003). Die nach wie vor schwierigste Aufgabe ist jedoch der Transport der siRNAs in die Zielzellen. So wurde der lokale Einsatz von siRNAs *in vivo* zwar schon mehrfach beschrieben (THAKKER *et al.*, 2004; BITKO *et al.*, 2005; PALLISER *et al.*, 2006), doch für einen systemischen Transport und einer damit verbundenen Genregulation gibt es nur wenige Nachweise (SOUTSCHEK *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2005; MORRISSEY *et al.*, 2005). ZIMMERMANN und Kollegen konnten jedoch zeigen, dass die Verwendung einer liposomalen Formulierung zu einem systemischen Transport der siRNAs und einem Silencing des Zielgens in nicht-humanen Primaten führen kann (ZIMMERMANN *et al.*, 2006).

Die Zukunft wird zeigen, inwieweit Optimierungen in diesem Bereich zu einem Einsatz der RNA-Interferenz als therapeutisches Mittel führen können.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Da in letzter Zeit vermehrt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der *HERV-K* Expression und verschiedenen Erkrankungen aufgetreten sind, sollte

diese Korrelation in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden. Dazu sollte im ersten Teil ein System entwickelt werden, das die Erstellung von Expressionsprofilen einzelner HML-Gruppen erlaubt. Dabei sollte die hohe Sequenzhomologie im LTR-Bereich ausgenutzt werden, um mit einer 5'-RACE-PCR eine spezifische Amplifikation zu ermöglichen. Als Modell wurde die HERV-K (HML-6) Gruppe gewählt, deren erhöhte Expression im Zusammenhang mit der Entstehung von malignen Melanomen gezeigt werden konnte. Um die Funktionalität der Methode zu verifizieren, sollten exemplarisch zwei Melanomzelllinien und ein Melanozytenisolat untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein spezielles HML-6 Mitglied, das so genannte HERV-K-MEL, und sein Einfluss auf Melanome charakterisiert werden. Über dieses Gen war bislang bekannt, dass es in Melanozyten und Zellen melanozytischen Ursprungs exprimiert wird, wobei eine erhöhte Expression in malignen Zellen zu messen ist. Anhand von RNAi-Experimenten in Melanomzelllinien sollten die Auswirkungen einer Genregulation *in vitro* geprüft werden. Dabei wurden sowohl morphologische als auch molekularbiologische Veränderungen analysiert. Die Herstellung und der Einsatz eines Überexpressionsklons sollte Aufschluss über die Auswirkungen einer erhöhten *HERV-K-MEL* Expression in Melanozyten geben.

Im letzten Teil der Arbeit sollte die *HERV-K* Expression im Verlauf einer Erkrankung *in vivo* betrachtet werden. Dazu sollte ein Vergleich von erkrankten und nicht-erkrankten Individuen unter möglichst gleichen Bedingungen erfolgen. Da dies bei malignen Melanomen und anderen Tumorerkrankungen nicht gegeben ist, wurde ein Infektionsmodell gewählt, die ebenfalls mit einer erhöhten *HERV-K* Expression einhergeht. So konnte in zahlreichen Arbeiten eine Korrelation von HIV-1 und HERV-K (HML-2) und (HML-3) gezeigt werden. Derartige Zusammenhänge in SIV-Infektionen sind bislang noch nicht bekannt. In Impfstoffstudien am Deutschen Primatenzentrum wurden Rhesus-Makaken mit SIV infiziert. Zudem waren nicht infizierte Kontrolltiere vorhanden. Dieses Material sollte genutzt werden, um die *HERV-K* Expression zu analysieren. Außerdem sollte eine mit SIV-infizierte humane T-Zelllinie vergleichend untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien, Organismen und Kulturbedingungen

2.1.1 Herstellung und Sterilisation von Lösungen

Thermostabile wässrige Lösungen und Gebrauchsgegenstände (Glaswaren, Polypropylen-Pipettenspitzen) wurden 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck in einem Dampfdruckautoklaven sterilisiert.

Lösungen, die nicht durch feuchte Hitze sterilisiert werden konnten, wurden sterilfiltriert (Heinemann Labortechnik, Ø: 0,20 oder 0,45 µm). Alle Lösungen, Puffer, Nährmedien und Nähragar wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Sartorius stedim, Arium 611VF) angesetzt. Glas-, Keramik- und Metallwaren wurden für 4 h bei 180°C trockener Hitze entkeimt.

2.1.2 Chemikalien und Geräte

Alle Chemikalien wurden in Analysenqualität verwendet und, soweit nicht anders angegeben, von Sigma, Roth, BD Biosciences, Invitrogen und AppliChem bezogen.

Neben laborüblichen Standardgeräten wie Präzisionspipetten, Magnetrührern u.ä. wurden folgende Geräte verwendet:

Tabelle 2-1: Verwendete Geräte

Anwendung	Bezeichnung & Hersteller
DNA-Sequenzierung	PRISM 310 Genetic Analyzer, ABI
Durchflusszytometrie	BD LSRII, BD Biosciences
Echtzeit-PCR-Verfahren	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems
Elektroporation	Nucleofector II, Amaxa
Geldokumentation	INTAS Geldokumentation, INTAS (Göttingen)
Gelelektrophorese	Elektrophoresekammer, Peqlab Biotechnology
Impedanz-Messung	XCELLigence System, Roche
Spektralphotometer	Mikroliter Spectral Photometer Nanodrop ND-1000, Peqlab Biotechnology

Sterilisation	Systec 2540 EL, Systec
Thermocycler	MyCycler Thermocycler, Biorad
Waage	ED4202S-CW, Sartorius (Göttingen)

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Für alle experimentellen Arbeiten wurden autoklavierte Polypropylen-Einwegartikel (z.B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) bzw. Glasmaterialien (z.B. Messzylinder, Vorratsflaschen) verwendet.

Tabelle 2-2: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co.
Reaktionsgefäße (0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml)	Sarstedt AG & Co.
Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf AG
MicroAmp Reaction Plate (96 well)	Applied Biosystems
MicroAmp Reaction Covers	Applied Biosystems
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co.
Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co.
Falcon Tubes	Sarstedt AG & Co.

2.1.4 Kits, Reaktionskomponenten und Enzyme

Tabelle 2-3: Verwendete Kits

Anwendung	Bezeichnung & Hersteller
Isolierung von Total-RNA	RNeasy Mini Kit, Qiagen
cDNA-Synthese	First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI Fermentas
5'-RACE-PCR	BD SMART RACE cDNA Amplification Kit, BD Biosciences – Clontech
Real-Time PCR (<i>TaqMan</i>)	ImmoMix, Bioline
Isolierung von Plasmid-DNA	QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen
Klonierung	CloneJET PCR Cloning Kit, MBI Fermentas

DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gelen	MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen
DNA-Aufreinigung nach PCR	MinElute PCR Purification Kit, Qiagen
DNA-Sequenzierung	PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems
FACS-Färbung von Zellen	ApoAlert Annexin V Apoptosis Kit, Clontech

Tabelle 2-4: Verwendete Polymerasen

Polymerase	Anbieter
MasterAmp Polymerase	Epicentre
Phusion High Fidelity Polymerase	Finnzymes

2.1.5 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 2-5: Verwendete Primer.

Bezeichnung/ Richtung	Sequenz (5'-3')	Bemerkungen
SMART II A Oligonukleotide	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG	Verwendet für cDNA-Synthese und 5'RACE PCR (SMART)
5'-RACE CDS Primer ¹⁾	(T)25-VN	
Universal Primer A Long	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT	
Universal Primer A Short	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	
Nested Universal Primer A	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT	HERV-K (HML-6) U3-spezifische Primer für 5'RACE-PCR
U3_66-rev ¹⁾	CAT RYA GCC TYC AGT GGA ATG CTG AGT TG	
U3_218A-rev	CCA GAT GTT CCA GTA GAT AAC CTC AA	
U3_218B-rev	CCA GAT GTC CCA GTA GAT AAC TTC AA	
U5_297-for ¹⁾	CCT TCT CCC TAT CTC YTT TAC YCA	

	AT	RACE-PCR
U5_459-for ¹⁾	TGC ATT CRY CCY CCT TTG TTC AG	
GAPDH-For	CCTGCACCACCAACTGCTTA	qRT-PCR-Primer für GAPDH
GAPDH-Rev	CATGAGTCCTTCCACGATACCA	
Bcl2-For	GGTGCCACCTGTGGTCCACCTG	qRT-PCR-Primer zur Analyse von Apoptose-assoziierten Genen
Bcl2-Rev	CTTCACTTGTGGCCAGATAGG	
Bcl-XL-For	GAACGGCGGCTGGGATAC	
Bcl-XL-Rev	CCCAGCAGAACCACGCC	
Bad-For	CATCATGGAGGCGCTGG	
Bad-Rev	GCTCCTCCCCATCCCT	
Bax-For	GGTGCTCAAGGCCCTGTG	
Bax-Rev	AGTCTCACCCAACCACCCTG	
Casp8-For	CACTTGGATGCAGGGGCT	
Casp8-Rev	GCAGTCATCGTGGGGCTT	
Casp9-For	TGGTGATGTCGGTGCTCTTG	
Casp9-Rev	GTGCGGGTGCGGAGC	
NFkB-For	CATGGTGGTCCGCTTCG	
NFkB-Rev	CAAGAGTCCAGGATTATAGCCCC	
TP53-For	TGATTTGATGCTGTCCCCG	
TP53-Rev	GGCATTCTGGGAGCTTCATCT	
HERV-K-MEL-For	TGCAGAGGATATAAGGAGAT	HERV-K-MEL spezifische Primer (nach SCHIAVETTI et al., 2002)
HERV-K-MEL-Rev	TCGTCCGTCTTCATTCCA	
HML-2-For	TCCCCTTGAATACTCCTGTTTTYGT	HERV-K (HML-2) und (HML-3) spezifische Primer
HML-2-Rev	CATTCCTTGTGGTAAACTTTCCAYTG	
Seq34-For	AAAGTGTTGCCACAGGGCA	
Seq34-Rev	AGGGGCAGCACAACTATATCAT	
SLE66676-For	TGTTGCCACAGGGCATGA	
SLE66676-Rev	GGGGACAGCACAAAGTATATCGT	

HERV-K (HML-2) human-For	TCCCCTTGGAATACTCCTGTTTTYGT	HERV-K (HML-2) pol nach CONTRERAS- GALINDO (2007)
HERV-K (HML-2) human-Rev	CATTCCTTGTGGTAAAACCTTCCAYTG	
HERV-K (HML-2) mac- For	TCCCCTTGGAATTCTCCTGTGTTTGT	HERV-K (HML-2) pol nach CONTRERAS- GALINDO (2007), an <i>Macaca mulatta</i> adaptiert
HERV-K (HML-2) mac- Rev	CATTCCTGAGGTAAMACTTCCAYTG	

¹⁾Redundanzen: Y=C+T; R=A+G; V=A+C+G; N=A+C+G+T; M=A+C

2.1.6 Verwendete Bakterien, Plasmide und Cosmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die molekular- und zellbiologischen Experimente die nachfolgend aufgeführten Bakterienstämme, Plasmide und Cosmide verwendet.

Tabelle 2-6: Verwendete Bakterien, Plasmide und Cosmide

Bakterien	Genotyp / relevante Eigenschaften	Referenz
DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA- argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	GRANT <i>et al.</i> , 1990
Plasmide	Relevante Eigenschaften	Anbieter / Referenz
pJET1.2	blunt Klonierungsvektor	MBI Fermentas
pBluescript II SK(+)	Phagemid-Vektor zur Klonierung	Stratagene [®]
Cosmid	Relevante Eigenschaften	Anbieter
RP11-332P24	Cosmid vom humanen Chromosom 16	

2.1.7 Computersoftware und Statistik

Zum Durchsuchen von öffentlichen Datenbanken wurde der NCBI-Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der BLAST-Algorithmus (*Basic Local Alignment Search Tool*; ALTSCHUL *et al.*, 1997) verwendet. Zur weiteren Analyse wurde außerdem die UCSC-Datenbank (*Human Genome Browser*; <http://genome.ucsc.edu/>) benutzt.

Als Quelle für die HERV-Sequenzen diene neben den oben genannten Datenbanken die HERVd-Datenbank (<http://herv.img.cas.cz/>) sowie *RetroSearch* (<http://www.daimi.au.dk/~biopv/herv/res2/>).

Sequenzanalysen und -Vergleiche wurden mit der *Bioedit* Software durchgeführt.

Daten von mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit zwei Replikaten wurden statistisch mit Microsoft®-*Excel* 2007 oder dem Programm *GraphPad Prism* (Version 5.0 for Windows; *GraphPad Prism* Software Inc., San Diego, CA, USA) ausgewertet. Statistische Signifikanzen wurden durch ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche erhoben. Als Kriterium für Signifikanz wurde $p < 0.05$ gesetzt.

Zur Erstellung der Arbeit diene Microsoft® *Word* 2007.

2.2 Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten

2.2.1 Amplifikation von DNA mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase chain reaction“ (PCR); SAIKI *et al.*, 1985) wird zur selektiven Amplifikation von DNA-Sequenzen genutzt. Für die Reaktionen wurden verschiedene DNA-Matrizen und Oligonukleotide verwendet.

Reaktionsansatz für eine PCR mit der Phusion High-Fidelity Polymerase (25 µl):

11,5 µl	H ₂ O
5 µl	GC-Puffer (5x)
1 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
1 µl	Vorwärts-Primer (100pmol / µl)
1 µl	Revers-Primer (100 pmol / µl)
1 µl	DMSO (50%)
0,5 µl	Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U / µl, Finnzymes)

2 μ l Template

Temperaturprofil:

98°C	3 min	
98°C	10 sec	} 35 Zyklen
x °C	90 sec	
72°C	90 sec	
72°C	5 min	

X war abhängig von dem verwendeten Primern. Anschließend wurden die Proben wie unter 2.2.7 beschrieben präzipitiert.

2.2.2 Klonierung von PCR-Produkten in Blunt-Vektoren

Da eine direkte Sequenzierung von PCR-Produkten nur möglich ist, wenn ein einziges, spezifisches PCR-Produkt vorliegt, wurden die durch PCR entstehenden Produkte mithilfe des CloneJET PCR Cloning Kit von MBI Fermentas kloniert. Der in diesem Kit enthaltene Vektor pJET 1.2 besitzt eine „stumpfe“ (*blunt*) Klonierungsstelle, die die Ligation eines Inserts ermöglicht, sofern dieses ebenfalls Blunt-Enden besitzt. Dies wurde durch eine Amplifikation der PCR-Produkte mit der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase erreicht (2.2.1).

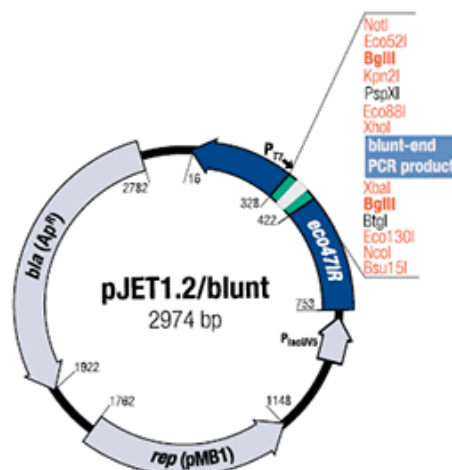


Abbildung 2-1: Vektorkarte des pJET1.2-Vektors.

Nach einer DNA-Präzipitation der PCR-Produkte (2.2.7) kann die Ligation erfolgen. Die aufgeführten Komponenten entstammen alle dem CloneJET PCR Cloning Kit von MBI Fermentas.

Blunt-Ligation von pJET1.2 und PCR-Produkten (20 µl Gesamtvolumen):

10 µl 2x Reaktionpuffer
2 µl PCR-Produkt (150 ng)
1 µl pJET 1.2 (50 ng / µl)
1 µl T4-Ligase
6 µl H₂O

Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht.

Nach Ligation wurden die entstandenen Plasmide in eine TSS-Transformation (2.2.3) eingesetzt.

2.2.3 Aufnahme von Plasmiden durch transformationskompetente *E.coli*-Bakterien

Um Fremd-DNA in Form von Plasmiden in *E.coli*-Bakterien einbringen zu können, müssen die Zellen zunächst kompetent gemacht werden. Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist eine Abwandlung der TSS-Transformation (CHUNG *et al.*, 1989).

Durch Behandlung mit TSS-Puffer lassen sich transformationskompetente *E.coli*-Bakterien herstellen, die durch Hitzeschockbehandlung Plasmid-DNA aufnehmen können. Der genaue Mechanismus für die Aufnahme der eingeschleusten DNA in die kompetenten Zellen ist ungeklärt. Es ist jedoch empirisch bekannt, dass die Zusammensetzung des Puffers und der Hitzeschock die entscheidenden Faktoren sind. Man vermutet, dass diese Komponenten die Durchlässigkeit der bakteriellen Zellwand für Fremd-DNA erhöhen.

Zur Transformation wurden 20 µl *DH5α*-Bakterien in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Aus dieser Übernachtskultur wurden 500 µl in 20 ml frisches LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und ca. 2-4 h bei 37°C inkubiert bis eine OD_{600nm} von 0,5-0,8 erreicht wurde. Bei dieser OD befanden sich die Bakterien in der exponentiellen Phase ihres Wachstums und besaßen ihr höchstes

Aufnahmepotential. Anschließend wurden die Bakterien 30 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet in 2 ml TSS-Puffer suspendiert und der Ansatz zu 200 µl aufgeteilt. Die so kompetent gemachten Bakterien konnten bis zur weiteren Verwendung, jedoch maximal 6 h, auf Eis aufbewahrt werden.

Luria-Bertani (LB)-Medium: (auf 1 l H₂O)

10 g Trypton (Roth)
5 g Hefe-Extrakt (Roth)
10 g NaCl (Roth)

Luria-Bertani (LB)-Agar: (auf 1 l H₂O)

1 l LB-Medium (siehe oben)
15 g Agar (Roth)

TSS-Puffer: (auf 100 ml Gesamtvolumen mit H₂O)

85 ml LB-Medium (siehe oben)
10 g Polyethylenglykol 8000 (PEG, Sigma)
5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, Roth)
1,0165 g MgCl₂ (Roth)

Für die eigentliche Transformation wurden zwischen 1 und 10 µl eines Ligationsansatzes oder etwa 1-2 µl einer Plasmidpräparation zu 200 µl kompetenten Bakterien gegeben und dieses Gemisch für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42 °C und einer Inkubation für 2 min auf Eis wurden 900 µl LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben. Dann wurde der Ansatz 1h bei 37°C geschüttelt und schließlich auf einer LB-Agarplatte mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum und/oder -zusatz ausplattiert. Nach einer Übernachtinkubation bei 37°C waren aus den einzelnen transformierten Bakterien Kolonien gewachsen, wobei davon ausgegangen werden kann, dass eine Kolonie einem transformierten Bakterium entspricht. Die einzelnen Kolonien konnten dann kultiviert und für eine Plasmidpräparation (2.2.4) genutzt werden.

2.2.4 Plasmidpräparation

Zur Präparation von Plasmiden aus Bakterien wurde das QIAGEN Miniprep Kit verwendet. Die im Folgenden verwendeten Puffer (P1, P2 und N3) sind Bestandteile des Kits.

Die DNA-Präparation beruht bei dieser Methode auf der alkalischen Lyse der Bakterien (BIRNBOIM UND DOLY, 1979). Anschließend fanden eine Neutralisation und eine Einstellung auf Hochsalz-Bedingungen statt, so dass die Plasmid-DNA spezifisch an die Silicamembran der QIAprep Säule binden und dann mit Ethanol gewaschen werden konnte. Bei Niedrigsalz-Bedingungen und bei pH-Werten von 7,0 bis 8,5 konnte die DNA nicht mehr an die Membran der Säule binden und konnte bei dem letzten Schritt mit Wasser eluiert werden.

Zunächst wurden einzelne Bakterienkolonien von den Agarplatten aus der TSS-Transformation (2.2.3) mit einer sterilen Pipettenspitze oder einem Zahnstocher in 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension für 10 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in 250 µl P1 Puffer suspendiert und anschließend durch Zugabe von 250 µl P2-Puffer lysiert. Die Neutralisation erfolgte nach Zugabe von 350 µl N3-Puffer, wobei durch mehrmaliges Umdrehen des Reaktionsgefäßes eine gute Durchmischung gewährleistet werden sollte. Dann erfolgte eine Zentrifugation von 10 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf). Der Überstand wurde in die QIAprep-Säulen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 60 sec bei 13000 rpm sollte die DNA an den Filter gebunden haben. Daraufhin wurde mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und unter gleichen Bedingungen wie im vorherigen Schritt zentrifugiert. Nach einer erneuten Zentrifugation, um den übrigen Waschpuffer zu entfernen, erfolgte im letzten Schritt die Elution der DNA mit 50 µl EB-Puffer oder H₂O. Dabei wurde das entsprechende Elutionsmittel auf die Säulen gegeben und diese nach einer Inkubationszeit von etwa einer Minute bei 13000 rpm für 60 sec zentrifugiert. Die so gereinigte DNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren werden.

2.2.5 Horizontale Gelelektrophorese

Zur visuellen Überprüfung und Bestimmung der Größe von Nukleinsäuren z.B. nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau wurde eine Gelelektrophorese vorgenommen. Diese ermöglicht eine Auftrennung der Nukleinsäuren anhand ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Dabei läuft die negativ geladene DNA im elektrischen Feld Richtung Anode durch ein grobmaschiges Netz aus Zuckerpolymeren (Agarose). Abhängig von der zu erwartenden Größe der Fragmente wurden Gele mit einem Agarosegehalt von 1-3% hergestellt, wobei die Konzentration höher gewählt wurde, wenn kleinere Nukleinsäuren erwartet wurden. Um eine qualitativ hochwertige Auftrennung zu erreichen, wurde Metaphor-Agarose (Genaxxon) verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge eingewogen und in 1 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) zum Quellen gebracht. Anschließend wurde dieses Gemisch in einer Mikrowelle aufgeköcht und mit 1%igen Ethidiumbromid-Lösung (EtBr, AppliChem) versetzt. Ethidiumbromid ist ein mit dsDNA interkalierender Farbstoff, der bei einer Wellenlänge 285 und 320 nm sichtbar wird. Die aufgeköchte Agaroselösung wurde dann in einen Gelschlitten gegossen und nach Aushärtung in eine Gelkammer überführt, die ebenfalls mit 1 x TAE-Puffer gefüllt war.

10 x TAE-Puffer (auf 1 l mit H₂O auffüllen):

48,4 g	Tris-Base
7,42 ml	Essigsäure
20 ml	0,5 M EDTA

Die zu betrachtenden Proben wurden nach dem Versetzen mit einem Ladepuffer (6x Loading Dye, MBI Fermentas) in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurden DNA- oder RNA-Leitern eingesetzt, die je nach erwarteter Nukleinsäuregröße variierten. Der jeweils verwendete Marker ist bei jeder Abbildung angegeben.

Tabelle 2-7: Für die Gelelektrophorese verwendete Marker und Ladepuffer

Bezeichnung	Anbieter
Loading dye (6x)	MBI Fermentas
GeneRuler DNA ladder, Ultra Low Range	MBI Fermentas
GeneRuler DNA ladder, 100 bp Plus	MBI Fermentas
GeneRuler DNA ladder, 1kb	MBI Fermentas

Bei einer Spannung von 5V/cm für ca. 60 Minuten wurden die Nukleinsäuren im Agarosegel aufgetrennt, wobei diese Werte in Abhängigkeit von der Agarosekonzentration des Gels in manchen Fällen angepasst wurden. Die visuelle Analyse nach der Auftrennung wurde mit dem INTAS Geldokumentationssystem und der INTAS GDS Application Software bei einer Wellenlänge von 314 nm vorgenommen.

Für eine noch bessere Auftrennung (z.B. unter Verwendung von größeren Elektrophoresekammern) wurde in einigen Fällen statt eines Agarosegels mit TAE-Puffer alternativ ein TBE-Gel verwendet. Dieser Puffer ist wesentlich stabiler als TAE und erlaubt somit höhere Spannungen. Statt herkömmlicher Agarose wurde für diese Gele Rotiphorese Gel 40 (19:1; Roth), eine Polyacrylamid-Stammlösung, verwendet.

10 x TBE-Puffer (auf 1 l mit H₂O auffüllen):

- 108 g Tris-Base
- 55 g Borsäure
- 9,3 g Dinatrium-EDTA

20% TBE-PAGE¹⁾ (100 ml Gesamtvolumen):

- 50 ml Rotiphorese Gel 40 (19:1)
- 10 ml 10 x TBE-Puffer
- 39 ml H₂O
- 1 ml 10% Ammoniumpersulfat (Sigma)
- 60 µl TEMED (Roth)

¹⁾Für niedriger konzentrierte Gele wurde das Verhältnis der Polyacrylamid-Stammlösung zum Wasser entsprechend verändert.

2.2.6 Exzision und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Mit dieser Methode lassen sich elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isolieren und für weitere Verfahren, wie z.B. Ligation, einsetzen. Hierfür wurde das MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Das Kit macht sich die Eigenschaft zu Nutze, dass die DNA unter hohen Salzkonzentrationen (chaotrope Salze) und einem pH von über 7,5 an die Silica-Gelsäule bindet. Verunreinigungen wie Salze, Farbstoffe und EtBr fehlen diese Bindeeigenschaften und werden durch das Waschen mit dem ethanolhaltigen PE-Puffer entfernt. Die DNA kann dann mit H₂O oder EB-Puffer eluiert werden.

Um eine Gelextraktion durchzuführen, wurde das gewünschte DNA-Fragment unter langwelligem UV-Licht mit einem sterilen Skalpell vorsichtig aus dem Gel ausgeschnitten und mit 3 Teilen QG-Puffer zu einem Teil Gel bei 50°C für 10 min (oder bis zur vollständigen Auflösung des Gelstücks) inkubiert. Während dieser Zeit fand alle 2 min eine Durchmischung mit dem Vortex-Mixer statt. Dann wurde 1 Gelvolumen Isopropanol zu dem Gel/Puffer-Mix gegeben und durch mehrfaches Umdrehen des Reaktionsgefäßes gemischt. Danach wurde die aufgelöste Probe auf die MinElute-Säule gegeben und 1 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, auf die Säule wurden erneut 500 µl QG-Puffer gegeben und wieder zentrifugiert. Daraufhin wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Um den restlichen Waschpuffer vollständig zu entfernen, wurde die leere Säule nochmals zentrifugiert. Die DNA wurde mit 10 µl EB-Puffer (10mM TrisHCl, pH 8,5) oder H₂O nach kurzer Inkubation von 1 min und Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß eluiert.

2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem PCR Purification Kit (Qiagen)

Um PCR-Produkte von Primerresten, Nukleotiden und Enzymen zu trennen, wurde das MinElute PCR Purification Kit von Qiagen verwendet. Das Prinzip

dieser Methode entspricht dem des unter 2.2.6 beschriebenen Gel Extraction Kits.

Zur Aufreinigung wurden 5 Teile PBI Puffer zu einem Teil PCR-Ansatz gegeben, gemischt und die gesamte Lösung auf eine MinElute-Säule überführt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm wurde der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde dann mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. In einer erneuten einmütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der verbliebene Puffer entfernt. Die DNA wurde mit 30 µl H₂O in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Die gereinigten PCR-Proben konnten anschließend direkt verwendet oder bei -20°C aufbewahrt werden.

Aufreinigung von PCR-Produkten durch DNA-Präzipitation

Eine Alternative zur Aufreinigung von PCR-Produkten über kommerziell erhältliche Säulen stellt die DNA-Präzipitation über eine Alkohol-Fällung dar. Hierbei wurden zunächst die PCR-Produkte jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Ansatz-Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8 -5,2) sowie 2,5 Volumen 96%igem Ethanol versehen. Nachdem die Proben für 2 h oder über Nacht bei -20°C eingefroren wurden, erfolgte anschließend eine Sedimentation durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Pellet mit eiskaltem, 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min wurde das Pellet bis zum vollständigen Verdampfen des nach Abnahme im Gefäß verbliebenen Ethanols getrocknet und in einer adäquaten Menge Wasser resuspendiert.

2.2.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Der Nanodrop ND-1000 (Peqlab Biotechnology) ist ein Spektralphotometer, das im Wellenlängenbereich von 220-750 nm misst. Damit wurden die Konzentrationen von RNA und DNA bestimmt. Dabei wird 1,5 µl der zu messenden Probe auf das Ende eines optischen Fibernkabels gegeben. Ein zweites optisches Fibernkabel wurde in Kontakt mit der Probe gebracht, so dass es zu einer Verbindung der beiden Fibernkabel über die Flüssigkeit kam. Eine

Xenon-Lampe sendete Lichtblitze aus und ein Spektrometer analysierte dieses Licht nach der Passage der Probe. Aufgrund der Bestimmung der Optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und einem spezifischen Multiplikationsfaktors für DNA und RNA wurde durch die Gerätesoftware die Nukleinsäurekonzentration mittels Beer-Lambert'scher Gleichung berechnet (Gleichung 1). Der Quotient der OD_{260nm} und der OD_{280nm} gibt außerdem Aufschluss über die Proteinkontamination in der Lösung. So sollte dieser Wert für „reine“ DNA bei 1,8, für „reine“ RNA bei etwa 2,0 liegen.

$$c = OD_{260} * \epsilon * V$$

Gleichung 1: Konzentrationsberechnung mit dem Spektralphotometer.

c= Nukleinsäurekonzentration in ng/µl; ϵ =Wellenlängenabhängiger molarer Extinktionskoeffizient (für dsDNA: 50 ng*cm/ml; für ssRNA: 40 ng*cm/ml); V= Verdünnungsfaktor.

2.2.9 DNA-Sequenzierung

Für die Identifizierung von Nukleotidsequenzen von DNA-Fragmenten wurde eine weiterentwickelte Form des Kettenabbruchverfahrens von SANGER *et al.* (1977) verwendet. Hierbei wird die Eigenschaft des Kettenabbruchs nach Einbau von Didesoxynukleotiden genutzt. Es wird zunächst eine PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Polymerasekettenreaktion) mit 4 Desoxynukleotiden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) und im selben Ansatz mit Didesoxynukleotiden (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) durchgeführt. Wird bei der Kettenverlängerung ein Desoxynukleotid eingebaut, so kommt es aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe, die zur Bildung der Phosphodiesterbindung essentiell ist, zum Kettenabbruch. Der Einbau der Didesoxynukleotide erfolgt zufällig. Somit entstehen bei der PCR Abbruchfragmente verschiedener Länge, die auf einem elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Diese Abbruchfragmente besitzen alle an ihrem 3'-Ende ein ddNTP. Da die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können während der Elektrophorese die ddNTPs an den Fragmentenden über einen Laser ermittelt werden. Eine spezielle Software verarbeitet das entstandene Fluoreszenzmuster zu einer Nukleotidsequenz.

Ein Vorteil dieses so genannten *cycle sequencing*-Verfahrens ist, dass nur geringe Mengen einzel- oder doppelsträngiger DNA eingesetzt werden müssen,

da das DNA-Fragment durch Anlagerung eines einzelnen Primers linear amplifiziert wird. Die Amplifikation erfolgt dabei wie bei einer PCR durch die temperaturabhängige Anlagerung des Primers und dessen Verlängerung nach Denaturierung der Zielsequenz. Die Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung des BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt, wobei sowohl aufgereinigte PCR-Produkte als auch präparierte Plasmid-DNA sequenziert werden konnten.

Ansetzen der Sequenzierreaktion

Einfacher Reaktionsansatz für eine Sequenzierreaktion (10 μ l Gesamtvolumen):

1 μ l Big Dye (Applied Biosystems)	
1.5 μ l 5x Big Dye Puffer (Applied Biosystems)	
1 μ l Primer (3.3 pmol/ μ l)	
x μ l Plasmid (200-300 ng)	} 6.5 μ l
y μ l H ₂ O	

Zur Amplifikation der Zielsequenz wurde folgendes Temperaturprofil im MyCycler (Biorad) genutzt:

96°C	30 sec	} 25 Zyklen
50°C	15 sec	
60°C	4 min	
4°C	∞	

Nach Ablauf des Temperaturprogrammes wurden die Reaktionsansätze mit je 90 μ l ddH₂O verdünnt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Bei 4°C durch Zugabe von 10 μ l 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 250 μ l 96%igem Ethanol wurde die DNA gefällt. Daraufhin wurde sie durch Zentrifugation bei 13.000 rpm über 10 min sedimentiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das DNA-Pellet wurde mit 250 μ l 70% eiskalten Ethanol gewaschen, erneut für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und danach einige Minuten an der Luft

getrocknet, bis der verbliebene Ethanol verdampft war. Zur Sequenzierung im PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI) wurden die Proben mit Formamid-haltigem TSR-Reagenz (ABI) aufgenommen, bei 95°C für 2 min denaturiert und zur Unterdrückung der Renaturierung schnell auf Eis abgekühlt. Nach sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz über 30 sec auf das Kapillargel aufgetragen und bei einer Spannung von 15 kV und einer Temperatur von 50°C elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenzsignale wurde vollautomatisch durch die *Sequence Analysis V3.4.1*-Software (ABI) vorgenommen. Zur Analyse der Sequenzen wurde die *Bioedit* Software eingesetzt.

2.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden das Melanozytenisolat NHEM-M2 sowie die beiden Melanomzelllinien SK-Mel-28 und A-375 verwendet (Tabelle 2-8).

Tabelle 2-8: Verwendete Zellen

Zellstamm	Ursprung / Isolat / Morphologie / Besonderheiten	Herkunft / Referenz
NHEM-M2	Humane Melanozyten, isoliert aus der Wange einer 55-jährigen Mannes kaukasischen Ursprungs; adhärent, wächst als Monolayer	Promocell Nr.C-12403; BROWN <i>et al.</i> , 1998
SK-Mel-28	Humane Melanomzelllinie, isoliert aus einem malignen Melanom eines 51-jährigen Mannes kaukasischen Ursprungs; adhärent, wächst als Monolayer; onkogen in Nacktmäusen	ATCC HTB-72; CAREY <i>et al.</i> , 1976
A-375	Humane Melanomzelllinie, isoliert aus einem malignen Melanom einer 54-jährigen Frau kaukasischen Ursprungs; adhärent, wächst als Monolayer; onkogene Eigenschaften	ATCC CRL-1619; GIARD <i>et al.</i> , 1973

Zellen aus flüssigem Stickstoff (-196°C) wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in eine 75 cm² Zellkultur-Flasche mit 20 ml des entsprechenden Zellkulturmediums überführt. Die Kultivierung sämtlicher Zellen

wurde bei 37°C, 5% CO₂ und einer mit H₂O gesättigten Atmosphäre in einem Zellinkubator (Heraeus Instruments) in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe (Sarstedt AG & Co.) in den in Tabelle 2-9 angegebenen Medien vorgenommen.

Tabelle 2-9: Verwendete Kulturmedien

Zellstamm	Kulturmedium, Katalognummer	Anbieter
NHEM-M2	Melanocyte Growth Medium M2 (C-24300), komplettiert mit Supplement Mix (C-39420)	Promocell
SK-Mel-28, A-375	MEM mit Earle's Salzen und GlutaMAX I (Kat.Nr.41090), 1x Nichtessentielle Aminosäuren (Kat.Nr.11140), 1x Natriumpyruvat (100mM, Kat.Nr.11360)	Invitrogen
	+10% FCS Gold (Kat.Nr.A15-151)	PAA

Beim Erreichen einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen zunächst mit auf 37°C vorgewärmten PBS gewaschen und mit einer adäquaten Menge Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02% in PBS, PAN Biotech) versetzt, um eine Ablösung der adhärennten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu ermöglichen. Anschließend wurde die so erhaltene Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und bei 120 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in vorgewärmtem Zellkulturmedium suspendiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen jeweils in Verdünnungen zwischen 1:3 und 1:8 subkultiviert oder in nachfolgende Experimente eingesetzt.

2.4 Arbeiten mit RNA und Transkriptionsanalyse

Da RNA sehr anfällig für spontane oder enzymatische Hydrolyse durch ubiquitär vorkommende RNasen ist, wurden beim Arbeiten mit RNA besondere Vorkehrungen getroffen. Hierzu gehörten die Benutzung steriler gestopfter Pipettenspitzen sowie RNase-freier Lösungen. Isolierte RNA wurde in RNase-freiem H₂O (Qiagen) in RNase-freien Reaktionsgefäßen bei -80 °C gelagert.

2.4.1 Isolation von RNA aus Zellkulturen

Zunächst wurden die Zellen wie bereits unter 2.3.1 beschrieben trypsiniert und bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands konnten die Zellen entweder direkt in die RNA-Isolation eingesetzt oder zur späteren Isolation mit RNAlater (Qiagen) überschichtet und bei 4°C oder -20°C gelagert werden.

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Zellzahl pro Ansatz betrug hierbei nicht mehr als 1×10^7 Zellen. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 350 µl RLT Puffer, der zuvor mit 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml Puffer versehen wurde, suspendiert und gemischt. Sollte sich das Pellet nicht richtig gelöst haben, wurde zusätzlich mit einer Spritze und einer sehr dünnen Kanüle durch mehrfaches Auf- und Abziehen homogenisiert. Das homogenisierte Lysat wurde anschließend mit 350 µl 70% Ethanol versetzt und nach Durchmischung auf eine RNeasy Spin Säule transferiert. Es folgten mehrere Zentrifugations- und Waschschriffe nach Herstellerangaben und eine Elution der RNA mit 30 µl RNase-freiem H₂O. Anschließend wurde die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (2.2.8).

2.4.2 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

Die sensitive Methode der PCR lässt sich nicht nur auf DNA-Templates anwenden, sondern kann auch zur indirekten Vervielfältigung von RNA-Molekülen genutzt werden. Somit lässt sich beispielsweise die Transkriptionsrate verschiedener RNAs in unterschiedlichen Geweben untersuchen. Voraussetzung für eine solche Untersuchung ist das Umschreiben von RNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels viraler reverser Transkriptase (RT).

Zur Synthese von cDNA aus einem RNA-Template wurde eine genetisch modifizierte Reverse Transkriptase (RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase, MBI Fermentas) verwendet, die sich von der nativen RT aus dem *Moloney Murine Leukemia Virus* in der Struktur und katalytischen Eigenschaften unterscheidet. Das Enzym besitzt eine RNA- und DNA-abhängige Polymeraseaktivität und eine geringe RNaseH-Aktivität, die zum spezifischen Abbau von RNA in RNA-DNA-Hybriden führt.

Als weiterer Bestandteil in der cDNA-Synthese wurde der rekombinante RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas) eingesetzt, der das RNA-Template vor Degradation schützt.

Zur Amplifikation des Templates wurde ein Gemisch aus Oligo(dT)₁₈- und *Random-Hexamer*-Primern verwendet. Der Oligo(dT)₁₈-Primer bindet selektiv an den Poly(A)-Schwanz der mRNA. Der *Random-Hexamer*-Primer hingegen benötigt keinen solchen Überhang und kann somit auch zur Transkription von 5'-Endregionen der mRNA oder der cDNA-Synthese von RNA ohne Poly(A)-Schwanz (z.B. mature microRNAs) verwendet werden. Da in dieser Arbeit teilweise unbekannt war, welche mRNA-Transkripte von dem Zielgen gebildet werden, wurde stets ein Oligo(dT)₁₈/*Random-Hexamer*-Gemisch eingesetzt.

Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese (20 µl Gesamtvolumen):

10 ng – 5 µg Total-RNA

0,5 µl Oligo(dT)₁₈-Primer (100 pmol / µl)

2 µl *Random-Hexamer*-Primer (100 pmol / µl)

Auf 12,5 µl mit H₂O auffüllen,

Inkubation für 5 min bei 70°C, danach 2 min auf Eis.

Zugabe von:

4 µl 5x Reaktionspuffer (MBI Fermentas)

2 µl dNTP-Mix (je 10 mM)

0,5 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U / µl; MBI Fermentas)

Inkubation für 5 min bei 37°C.

Zugabe von:

1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U / µl; MBI Fermentas)

Inkubation für 90 min bei 42°C. Anschließend kann die cDNA direkt in eine PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

2.4.3 Quantifizierung von Transkripten mittels Echtzeit-PCR

Die unterschiedliche Expression von mRNAs in humanen Zelllinien und Geweben kann mit der quantitativen *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) analysiert werden. Die qRT-PCR ist eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR (SAIKI *et al.*, 1985). Diese Technik ist eine Analyse der DNA-Amplifikation in Echtzeit durch die Messung von fluoreszierenden Markern (Abbildung 2-2).

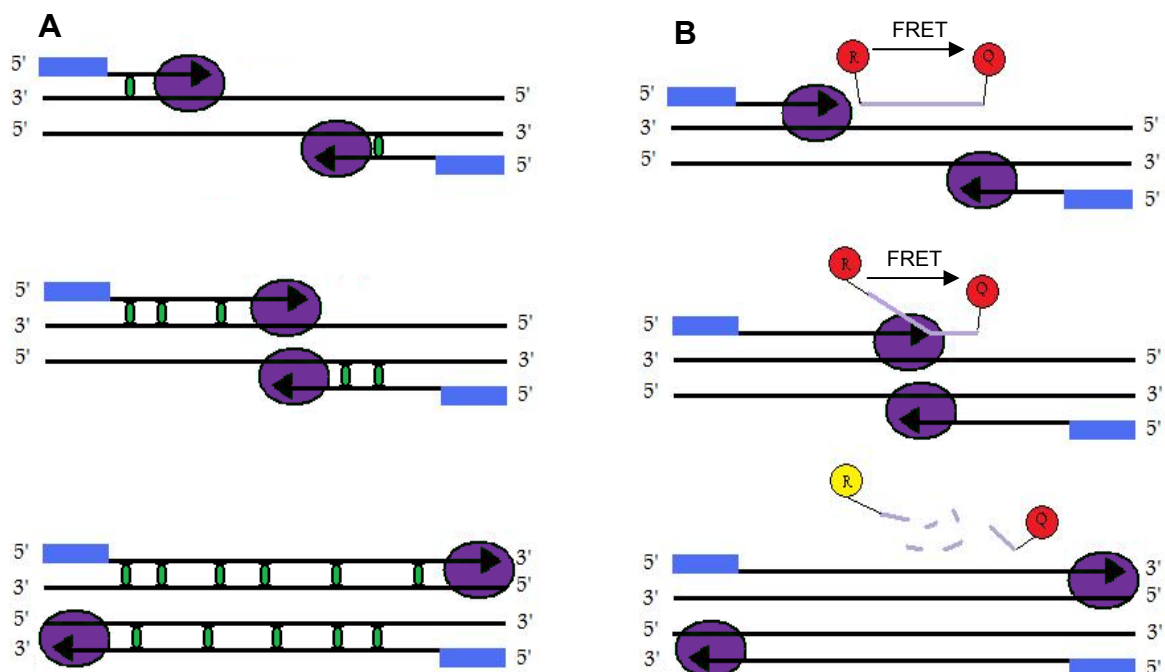


Abbildung 2-2: Prinzip des *SybrGreen*-Assays (A) und der *TaqMan*-PCR (B). Die Taq-Polymerase ist durch eine violette Ellipse symbolisiert, gebundene Oligonukleotidprimer durch blaue Rechtecke, eingebautes *SybrGreen* durch grüne Ellipsen. Weitere Erklärungen sind im Text zu finden.

Ein großer Vorteil der qRT-PCR liegt neben der PCR-eigenen Sensitivität, dem hohen Maß an Selektivität und Reproduzierbarkeit auch in der linearen Konzentrationsabhängigkeit während der Amplifikation, wobei letztere besonders für die Analyse der mRNA-Expression nach siRNA-Silencing in den Zelllinien in dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung war.

Die *Real-Time*-Technologie basiert auf einem 5'-Nuklease-Assay (HOLLAND *et al.*, 1991), bei dem man unter Ausnutzung der 5'-3'- Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase eine sequenzspezifische Amplifikation nachweisen kann.

Die einfachste Möglichkeit zur Quantifizierung der Genexpression ist der so genannte *SybrGreen*-Assay, bei dem der DNA-Farbstoff SybrGreen verwendet wird, der mit dsDNA interkaliert und zu einem Anstieg der Fluoreszenz dieses Farbstoffs in Korrelation mit dem Anstieg der Ziel-DNA führt (Abbildung 2-2 A). Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht differenziert werden kann. Mit einer Schmelzkurvenanalyse, die auf den unterschiedlichen Schmelzpunkten in Abhängigkeit der Fragmentlängen beruht, kann jedoch die Spezifität bestimmt und beispielsweise Primerdimere von „echten“ PCR-Produkten unterschieden werden.

Eine weitere gängige Methode zur Bestimmung der Genexpression mit der qRT-PCR basiert auf der Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET, CARDULLO *et al.*, 1988). Dabei wird zusätzlich zum spezifischen Primerpaar einer Standard-PCR eine fluorogene Sonde eingesetzt, welche genau wie diese spezifisch an die zu amplifizierende DNA-Zielsequenz hybridisiert (Abbildung 2-2 B). Die Sonde besteht aus einem 24-30 bp langem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff (6'-FAM) verknüpft ist, während das 3'-Ende mit einem so genannten Quencher-Farbstoff (TAMRA) versehen ist. Zudem ist das 3'-Ende durch einen Phosphatrest blockiert, damit die sequenzspezifische Sonde nicht auch durch die Polymerase verlängert werden und somit als dritter Primer fungieren könnte. Solange die Sonde intakt ist, findet ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt. Die normalerweise nach Anregung (Wellenlänge $\lambda=488$ nm) als Licht emittierte Energie des Reporterfarbstoffs wird auf den Quencher übertragen, so dass nach außen nur sehr geringe Lichtsignale messbar werden. Die Absorption der Energie durch den Quencher ist nur möglich, solange sich Reporter-Markierung und Quencher in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander befinden, wie es bei intakten Sondenmolekülen gegeben ist. Wird die Oligonukleotidsonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase während der Elongationsphase einer PCR-Reaktion hydrolysiert, so entfernen sich die beiden Farbstoffe voneinander und die emittierte Energie des Reporterfarbstoffs wird als Fluoreszenzsignal ($\lambda=518$ nm) messbar. Voraussetzung für eine Hydrolyse der Sonde durch die

5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase ist eine stabile Hybridisierung der Sonde an die Zielsequenz. Zu diesem Zweck sollte die Schmelztemperatur (T_m) der Sonde mindestens 8-10 °C über T_m der Oligonukleotidprimer liegen. Ist dies der Fall, so trifft die Taq-Polymerase während der Extensionsphase auf die Sonde und beginnt, diese zu verdrängen. Die dabei entstehende Y-förmige Sekundärstruktur, in der die ersten Basen der Sonde bereits verdrängt wurden, induziert die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, und die Sonde wird hydrolysiert. Eine nur schwach an die Matrize gebundene Sonde, wie z.B. bei einer Fehlpaarung in einer abweichenden Sequenz eines Allels, würde von der Polymerase so schnell verdrängt werden, dass keine Hydrolyse stattfinden könnte.

Zu Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation, in der das Fluoreszenzsignal den linearen Bereich der PCR-Reaktion und den Schwellenwert erreicht, verdoppelt sich die Anzahl nicht gequenchter Reportermoleküle mit jedem Zyklus. Da die Amplifikation in der exponentiellen Phase im Gegensatz zur Endpunktbestimmung keinem limitierenden Faktor unterliegt, ist die Methode gut reproduzierbar. Durch die Abhängigkeit eines messbaren Fluoreszenzsignals von der Hybridisierung zweier bzw. dreier verschiedener Oligonukleotide (zwei Standardprimer und eventuell die Sonde) ist die qRT-PCR ein hochspezifischer Assay. Die benötigten Primer wurden mit der *Primer Express 3.0* Software (Applied Biosystems) entworfen und von Sigma Genosys bezogen.

Zur Messung der Expressionsänderung auf mRNA-Ebene erfolgte zunächst eine cDNA-Synthese wie unter 2.4.2 beschrieben. Diese wurde dann als Template für die qRT-PCR genutzt. Alle Proben wurden in Duplika gemessen. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes betrug 25 µl. Der inerte Farbstoff Rox wurde als Referenzpuffer eingesetzt, um minimale Variationen im Gesamtvolumen des Ansatzes aufgrund von Pipettierungenauigkeiten zu korrigieren. Die Quantifizierungen erfolgten fast ausschließlich mit einem *SybrGreen*-Assay.

Die qRT-PCR wurde in optischen 96-well-Platten oder optischen Tubes (MicroAmp, Applied Biosystems) vorgenommen. Ein Reaktionsansatz bestand standardmäßig aus 1 x Immomix, 0,25 x Rox, 1 x SybrGreen (alles Biotek), 10

pmol Vorwärts-Primer, 10 pmol Revers-Primer und 1 µl cDNA (10-50 ng RNA-Äquivalentmenge). Um das Gesamtvolumen von 25 µl zu erhalten, wurde mit RNase-freien Wasser (Qiagen) auf dieses Volumen aufgefüllt.

Die qRT-PCR wurde bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt: Aktivierung der *Taq*-Polymerase bei 96°C für 10 min. Die Denaturierung der dsDNA bei 96°C für 15 sec und die Anlagerung (Annealing) der Primer sowie die Elongation des DNA-Stranges bei 60°C für 1 min wurde in 40 Zyklen wiederholt. Die Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten während der qRT-PCR wurden mit Hilfe des ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) gemessen. Die Anregung erfolgte bei 488 nm durch eine Halogenlampe und die Fluoreszenzmessung durch eine CCD-Kamera bei jedem Zyklus während der Elongationsphase. Die Formeln zur Berechnung der Expression finden sich im Abschnitt 2.5.2 (Gleichung 2).

Die in der qRT-PCR unter Verwendung des *SybrGreen*-Assays entstehenden Produkte wurden über Gelelektrophorese und Sequenzierung darauf analysiert, ob es sich bei dem Amplifikat um ein spezifisches PCR-Produkt handelte. Die Verwendung von Wasser anstelle von cDNA ermöglichte die Kontrolle auf mögliche Kontaminationen der genutzten Reagenzien. Als endogene Amplifikationskontrolle zum Abgleich der eingesetzten cDNA-Menge und Normalisierung diente in den Messungen das an der Glykolyse beteiligte und somit essentielle Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (*GAPDH*).

2.4.4 5'-RACE-PCR

Die SMART Technologie (*Switching Mechanism at 5'-End of RNA Template*; Abbildung 2-3) der Firma Clontech bietet die Möglichkeit der Amplifikation Voller-Länge cDNAs in reversen Transkriptionsreaktionen (Zhu et al., 2001). Dies wird möglich durch den Gebrauch eines speziellen Primers, dem so genannten SMART Oligo, und einer reversen Transkriptase, die eine Variante der RT des *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MuLV) ist. Die M-MuLV RT bietet hierbei zwei spezifische Besonderheiten, die bei der SMART Technologie ausgenutzt werden. Zum Einen ermöglicht sie die Addition von nicht zum Template komplementären Nukleotiden am 3'-Ende des neusynthetisierten

cDNA-Strangs nach Erreichen des 5'- Endes des mRNA Templates (terminale Transferase-Aktivität). Zum Anderen besitzt die reverse Transkriptase die Fähigkeit, auf ein zweites Template zu wechseln.

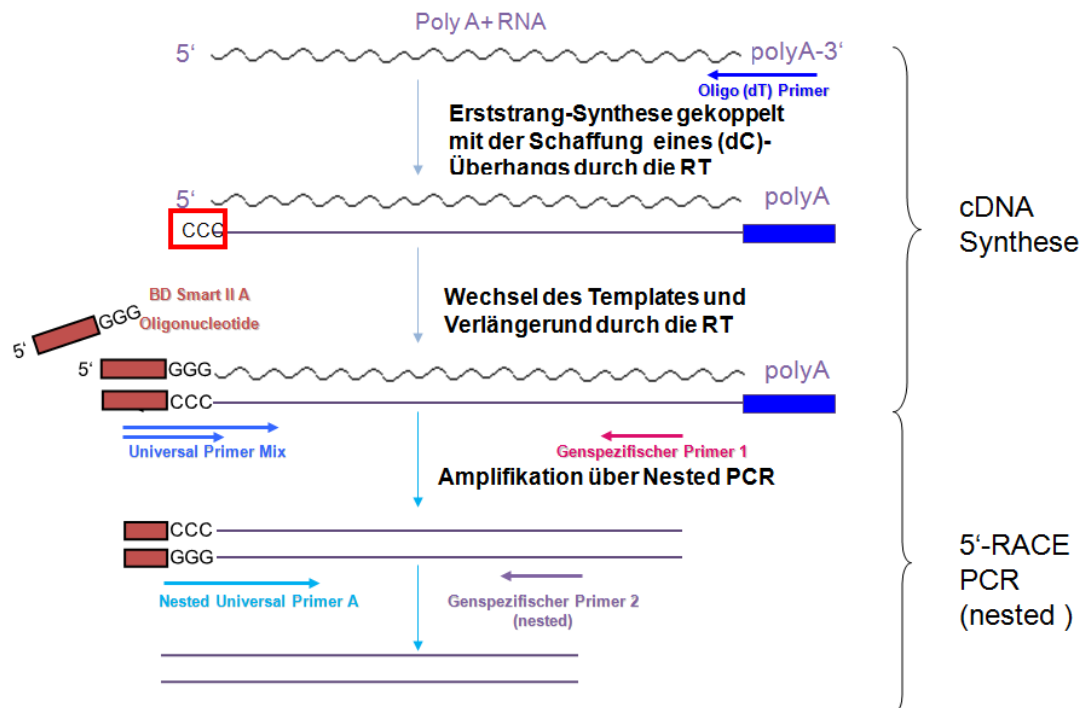


Abbildung 2-3: Das Prinzip der SMART-Technologie. Erklärungen siehe Text.

Zunächst wird die cDNA Synthese durch einen modifizierten Oligo(dT)-Primer eingeleitet, der eine zusätzliche Erkennungssequenz am 3'-Ende enthält. Sobald die M-MuLV RT das 5'-Ende der mRNA erreicht hat, sorgt die terminale Transferase-Aktivität für ein Anfügen von drei bis fünf zusätzliche Nukleotide, die vornehmlich Desoxycytidine (dC) sind, an den neu synthetisierten cDNA-Strang. Daraufhin kann sich das SMART-Oligo, welches ein Abschnitt von mehreren Guaninen am 3'-Ende besitzt, mit dem verlängerten dC-reichen Schwanz der cDNA paaren. Aufgrund der Eigenschaft der RT zum Wechsel des Templates kommt es daraufhin zu Amplifikation vom SMART-Oligo aus, so dass eine komplette cDNA Kopie der originalen RNA mit einer zusätzlichen SMART-Sequenz am Ende entsteht. Da die dC-Anhangsaktivität der RT die höchste Effizienz besitzt, wenn das Enzym das Ende des RNA-Templates erreicht hat, wird die zusätzliche SMART Sequenz typischerweise nur angehängt, um die Primärstrang-cDNA zu komplettieren. Die so entstandene cDNA kann daraufhin direkt in eine PCR (in diesem Fall: RACE (*rapid*

amplification of cDNA ends)) eingesetzt werden, ohne dass eine Sekundärstrang-Synthese oder Adaptorligation erforderlich ist. Bei einer RACE-PCR wird ein kurzer, bekannter Sequenzabschnitt einer cDNA genutzt, um deren Nukleotidsequenz in 5'- wie auch in 3'- Richtung zu vervollständigen (FROHAN *et al.*, 1988).

Für die folgende 5'-RACE cDNA-Amplifikation ist im Gegensatz zur herkömmlichen PCR nur ein genspezifischer Primer nötig, da der zweite Primer auf dem während der cDNA Synthese entstehenden Überhang basiert. Zudem wurde eine *Nested PCR* durchgeführt, d.h. das PCR-Produkt einer ersten PCR dient als Template für eine zweite Amplifikation mit anderen Primern. Das zweite Primerpaar liegt dabei zwischen dem ersten. So werden „falsche“ Amplifikationsprodukte der ersten Amplifikationsrunde nicht weiter amplifiziert und es ist möglich, selbst extrem geringe Templatemengen nachzuweisen.

Als Template diente RNA, die zuvor aus den Melanomzelllinien SK-Mel28 und A-375 sowie aus der Melanozytenzelllinie NHEM isoliert wurde. Für die PCR wurden Primer entworfen, die spezifisch den LTR-Bereich der HERV-K (HML-6) Gruppe amplifizieren. Genaue Informationen zum Design finden sich im Ergebnisteil unter 3.1.2.

Reaktionsansatz zur First strand cDNA-Synthese (10 µl):

- 50 ng – 1 µg Total-RNA
- 1 µl 5'-CDS Primer (12 pmol)
- 1 µl SMART II A Oligo (12 pmol)

Auf 5 µl mit H₂O auffüllen, gut mischen und kurz zentrifugieren.

Inkubation für 2 min bei 70°C, danach 2 min auf Eis.

Anschließend erneut zentrifugieren

Zugabe von (20 µl Gesamtvolumen):

- 2 µl 5x First-Strand Puffer
- 1 µl DTT (20 mM)
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM each)
- 1 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (Clontech)

Inkubation für 1,5 h bei 42°C im Cycler, dann Zugabe von Tricine-EDTA-Puffer (20 µl bei <200ng, 100 µl bei >200 ng Total-RNA als Template).

Inkubation für 7 min bei 72°C;

Anschließend können die Proben direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

Reaktionsansatz zur *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) (50 µl):

Äußere PCR

- 16,3 µl H₂O
- 5 µl Puffer (Epicentre)
- 15 µl Enhancer (Epicentre)
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
- 0,2 µl MasterAmp Polymerase (Epicentre)
- 5 µl 10x Universal Primer Mix (UPM, Clontech)
- 1 µl Genspezifischer Primer außen (10 pmol / µl)
- 2,5 µl Template aus cDNA-Synthese

Innere PCR

- 17,8 µl H₂O
- 5 µl Puffer (Epicentre)
- 15 µl Enhancer (Epicentre)
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
- 0,2 µl MasterAmp Polymerase (Epicentre)
- 5 µl Nested Universal Primer A (10pmol / µl, Clontech)
- 1 µl Genspezifischer Primer innen (10 pmol / µl)
- 1 µl Template aus äußerer PCR (1:40 verdünnt)

Temperaturprofil für die äußere und innere PCR:

95°C	5 min	}	35 Zyklen
95°C	1 min		
x °C	90 sec		
68°C	90 sec		

x °C war abhängig von den verwendeten LTR-spezifischen Primern (Tabelle 2-10). Die PCR wurde jeweils im MyCycler (Biorad) durchgeführt.

Tabelle 2-10: Annealingtemperatur der LTR-spezifischen Primer

Primer-Name	Bemerkungen	Annealingtemperatur	
U3_218A-rev	Wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt	62°C	Äußere PCR
U3_218B-rev			
U5_459-for			
U3_66-rev		55°C	Innere PCR
U5_297-for			

2.5 Der Einfluss von RNA-Interferenz auf Melanomzellen

2.5.1 Transfektion und Transduktion von Melanomzellen

Für die RNAi-Experimente verschiedene siRNAs und shRNAs gegen *HERV-K-MEL* und *Bcl2* verwendet. Um bei siRNA-Silencing unspezifische Effekte wie den Einfluss auf andere Gene weitestgehend auszuschließen, wurde Designsoftware (Eurofins MWG Operon sowie Integrated DNA Technologies) verwendet. Die von der Software empfohlenen siRNAs sollten laut Anbieter zu einem optimalen Silencing von *HERV-K-MEL* führen. Sie wurden zunächst in der NCBI-Datenbank analysiert, um die Spezifität zu prüfen. Zusätzlich wurden mehrere siRNAs entworfen, die über das von SCHIAVETTI (2002) propagierte env-Transkript verteilt binden (Abbildung 2-4).

Neben den gegen *HERV-K-MEL* gerichteten siRNAs wurden drei siRNAs gegen *Bcl2* verwendet, die von der Firma Ambion entworfen und bezogen wurden.

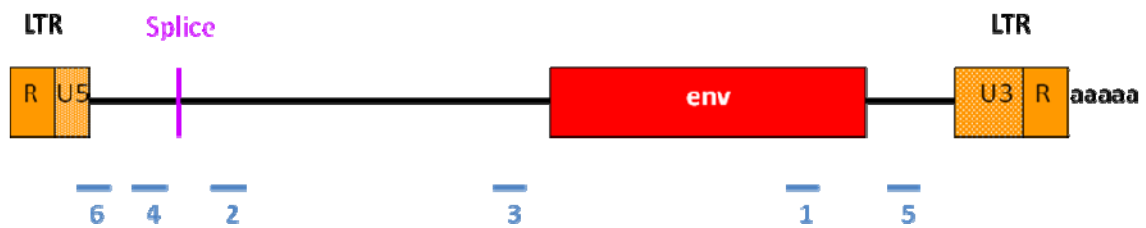


Abbildung 2-4: Lage der siRNAs gegen *HERV-K-MEL* auf dem von *SCHIAVETTI* (2002) propagiertem *env*-Transkript.

Desweiteren wurden so genannte Scrambled-siRNAs benutzt, die in der Nukleotidzusammensetzung mit den jeweiligen *HERV-K-MEL*-siRNAs übereinstimmen, durch eine abweichende Nukleotidfolge aber weder an das Zielgen noch an ein anderes Gen binden können. Dies wurde ebenfalls durch einen Blast in der NCBI-Datenbank geprüft. Für die anfänglichen Titrationsversuche wurde außerdem eine Cy3-markierte siRNA gegen *GAPDH* verwendet, die eine mikroskopische und durchflusszytometrische Auswertung der Transfektionseffizienz erlaubte.

Tabelle 2-11: Verwendete siRNAs unter Angabe der Sequenz

siRNA	Sequenz (5' → 3')		Anbieter
	Sense	Antisense	
Bcl2 #1	GGAUUGUGGCCUUCUUUGAtt	UCAAGAAGGCCACAAUCctc	Ambion ID#42815
Bcl2 #2	GAUAGUGAUGAAGUACAUCtt	GAUGUACUUCAUCACUAUCtc	Ambion ID#214532
Bcl2 #3	AGUACAUCCAUAUAAGCUtt	AGCUUAUAUAUGGAUGUACUtc	Ambion ID#214532
HERV-K-MEL #1	ACAGAAGUGGCAAUGUUAAtt	UUAACAUUGCCACUUCUGUtt	MWG Biotech AG
HERV-K-MEL #2	UGAAGACCGACGAGAGUCAtt	UGACUCUCGUCGGUCUUCAtt	MWG Biotech AG
HERV-K-MEL #3	UAGUAAUAGUGCUCAAUACtt	GUAUUGAGCACUAUUACUAtt	MWG Biotech AG
HERV-K-MEL #4	ACUGACCAGAUGAAUGAGAtt	UCUCAUUCAUCUGGUCAGUtt	MWG Biotech AG
HERV-K-MEL #5 (21mer)	CACCAACCAGCAAUUGAGAtt	UCUCAAUUGCUGGUUGGUGtt	MWG Biotech AG
HERV-K-MEL #6 (21mer)	CUGACAGCCACAAGUGGCAtt	UGCCACUUGUGGCUGUCAGtt	MWG Biotech AG

HERV-K-MEL #5 (27mer)	5Phos/CACCAACCAGCAAUUG AGAGCUGAA	UUCAGCUCUCAAUUGCUGGU UGGUGUU	Integrated DNA Technologies
HERV-K-MEL #6 (27mer)	5Phos/CUGACAGCCACAAGU GGCACCUGAA	UUCAGGUGCCACUUGUGGC UGUCAGUU	Integrated DNA Technologies
Scrambled 3a	AACGACUAUAGGAAGCUAGtt	CUAGCUUCCUAUAGUCGUUtt	MWG Biotech AG
Scrambled 3b	AAUUGCGAAUCGUACUUAAtt	UUAAGUACGAUUCGCAAUUt	MWG Biotech AG
Scrambled 3c	AUAUAGUAUCUAACGUGCAtt	UGCACGUUAGAUACUAUAUt	MWG Biotech AG
Scrambled 5a	CCACAUAGCGCAACAUAAGtt	CUUAUGUUGCGCUAUGUGGtt	MWG Biotech AG
Scrambled 5b	CCACUGAAACCGACAAUAGtt	CUAUUGUCGGUUUCAGUGGtt	MWG Biotech AG
Cy3-labeled GAPDH siRNA	Keine genaue Angabe vom Anbieter!		Ambion (AM4623)

Die RNA-Interferenz mit shRNA wurde mit adenoviralen Vektoren der Firma Sirion durchgeführt. Das Design der shRNAs oblag hierbei dem Hersteller (Tabelle 2-12). Die Herstellung der Viren ist unter 2.5.1.2 beschrieben.

Tabelle 2-12: Verwendete Adeno-shRNA-Viren mit Zielsequenz

Virus	Zielsequenz	Zielgen
Ad-PL	KEINE	KEINS
Ad-sh-Bcl2-536	GTGATGAAGTACATCCATTAT	Bcl-2
Ad-sh-Bcl2-544	GTACATCCATTATAAGCTGTT	
Ad-sh-HERV-K-MEL-767	CCAATTATGTGAGCCTGTGAT	HERV-K-MEL
Ad-sh-HERV-K-MEL-1204	CGAGAGTCACACTGACGTCAA	

Für die RNAi-Experimente wurden diverse Transfektionsmethoden benutzt. Nachfolgend werden die einzelnen Methoden beschrieben. Eine Analyse der Genregulation wurde standardmäßig 48 h nach Transfektion bzw. Transduktion durchgeführt.

2.5.1.1 siRNA-Transfektion von Melanomzellen mit Transfektionsagenzien

In dieser Arbeit wurden verschiedene liposomen-basierte Transfektionsagenzien zur Optimierung der Transfektionseffizienz genutzt. Die einzelnen Transfektionen wurden in unterschiedlichen Zellkultur-Formaten durchgeführt. Zur vereinfachten Übersicht beziehen sich die Angaben jeweils auf Transfektionen im 6-Well-Platten-Maßstab.

Tabelle 2-13: Verwendete siRNA-Transfektionsagenzien

Transfektionsagenz	Hersteller	Kat.-Nr.
HiPerFect	Qiagen	301702
Xtreme Gene siRNA	Roche	04 476 093 001
Nanofectin siRNA	PAA	Q0002-007

Transfektion von Melanomzellen mit HiPerFect (Qiagen)

Bei der Verwendung dieses Agenz wurden die zu transfizierenden Zellen unmittelbar vor der Transfektion ausgesät. Dabei wurden die Zellen zunächst trypsinisiert und zentrifugiert. Nach der Suspension des Zellpellets in Zellkulturmedium wurden 4×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte verwendet. Die so vorbereiteten Zellen wurden daraufhin bis zur Transfektion im Inkubator aufbewahrt. Für die Transfektion wurden in einem Reaktionsgefäß 100 µl OptiMEM mit 0,12 µl siRNA (100 µM) versetzt. Dann wurden 12 µl des Transfektionsagenz zur siRNA-Lösung gegeben und durch vorsichtiges Pipettieren vermischt. Nach einer Inkubation von 5–10 min wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bis zur Analyse bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Transfektion von Melanomzellen mit X-tremeGENE siRNA (Roche)

Am Vortag der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro Vertiefung in einer 6-Well-Platte ausgesät. Für die Transfektion wurde zunächst in einem Reaktionsgefäß OptiMEM vorgelegt und mit 10 µl Transfektionsreagenz versetzt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 100 µl OptiMEM mit 1-2 µl der zu verwendenden siRNA gemischt. Die beiden Ansätze wurden daraufhin durch vorsichtiges Pipettieren vereinigt. Nach einer Inkubationszeit von 15–20

min bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch zu den vorbereiteten Zellen gegeben. Die Zellen wurden bis zur Analyse bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Transfektion von Melanomzellen mit Nanofectin siRNA (PAA)

24 h vor Transfektion wurden 2 x 10⁵ Zellen pro Vertiefung in 6-Well-Platten ausgesät, so dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von etwa 50% aufwiesen. Am Tag der Transfektion wurde jeweils in einem Reaktionsgefäß 200 µl OptiMEM mit 20 µl Agenz, in einem zweiten 120 µl OptiMEM mit 1-2 µl siRNA (100 µM) gemischt. Anschließend wurden diese beiden Ansätze vereinigt und nach einer Inkubationszeit von 15 – 20 min zu den am Vortag ausgesäten Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bis zur Analyse bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Tabelle 2-14: Übersicht der Bedingungen für die liposomen-basierte Transfektion

Agenz	Anzahl Zellen / Well	Zell-aussaat	siRNA (µl eines 100 µM-Stocks)	siRNA-Menge (µg)	Agenz (µl)
HiPerFect	4x10 ⁵	direkt	0,12	0,15	12
XtremeGene siRNA	2x10 ⁵	Vortag	1,6	2	10
Nanofectin siRNA	2x10 ⁵	Vortag	1,6	2	10

2.5.1.2 Transduktion von Melanomzellen mit adenoviralen shRNA-Vektoren

Zusätzlich zur Verwendung von siRNAs wurden adenovirale Vektoren durch die Firma Sirion hergestellt, die zu einem gezielten Knockdown des zu untersuchenden Gens über shRNAs (*short-hairpin RNAs*) führen sollen. Dazu wurden verschiedene doppelsträngige sh-Oligonukleotidkassetten in ein Plasmid (Plasmid A) vor den humanen U6-Promotor kloniert. Der U6-shRNA-Bereich aus dem Plasmid A wurde anschließend durch Rekombination in das Genom eines deletierten, replikationsdefizienten Ad5-Vektor transferiert, der in einem zweiten Plasmid (im Folgenden mit B bezeichnet) enthalten ist. Mit dem durch Restriktion von Plasmid B mit *PacI* freigesetzten rekombinanten viralen

Genom wurden *HEK293* Produktionszellen transfiziert und intakte infektiöse Virenpartikel hergestellt. Die Viren wurden anschließend chromatographisch aufgereinigt (ViraBind Adenovirus Purification Kit, Cell Biolabs Inc.) und titriert. Zur Titerbestimmung wurde das virale Hexonprotein in infizierten *HEK293* Zellen immunologisch nachgewiesen.

Zur Transduktion der Melanomzelllinien *SK-Mel-28* und *A-375* wurden am Vorabend der Transduktion pro Vertiefung einer 6-Well-Platte 1×10^5 Zellen ausgesät. Am nächsten Morgen hatten die Zellen eine Konfluenz von etwa 30-50% erreicht und wurden mit unterschiedlichen MOIs (*Multiplicity Of Infection*) transduziert. Der Hersteller empfahl wurde eine MOI von 40, was bedeutet, dass bei 1×10^5 ausgesäten Zellen 4×10^6 infektiöse Einheiten verwendet werden sollten. Die entsprechende Anzahl an Viren wurde zu den Zellen gegeben und anschließend bei 37°C und 5% CO₂ für 24 h im Brutschrank inkubiert. Zudem wurde ein promotorloser Kontrollvektor (Ad-PL) verwendet. Als weitere Negativkontrolle dienten nicht transduzierte Zellen.

Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit vorgewärmten PBS gewaschen und frisches Zellkulturmedium zugegeben. Danach wurden die Zellen für weitere 24 h inkubiert und wie unter 2.3.1 angegeben trypsiniert. Im Anschluss wurde RNA isoliert und eine Genexpressionsanalyse wie nachfolgend beschrieben vorgenommen.

2.5.2 Analyse der Genregulation durch quantitative Real-Time PCR

Zur Analyse der Genregulation unter RNA-Interferenz wurde aus den Zellen zunächst RNA isoliert (2.4.1). Anschließend wurde cDNA synthetisiert (2.4.2). Im Anschluss wurde die veränderte Genexpression mit Hilfe einer relativen Quantifizierung über qRT-PCR gemessen (2.4.3). Die Berechnungen der Effekte auf das Zielgen wurden wie unter Gleichung 2 beschrieben vorgenommen. Zusätzlich zu den Expressionsmessungen des Zielgens wurden Messungen der *GAPDH*-Expression zur Normalisierung sowie weiterer, möglicherweise beeinflusster Gene durchgeführt. Die exakte Vorgehensweise findet sich bei den jeweiligen Experimenten vermerkt.

Berechnung der Genexpression nach siRNA-Silencing

Zur Bestimmung der verbleibenden Genexpression (% Expression) und der Regulation (% Silencing) nach siRNA-Silencing in Zellen wurde zunächst RNA isoliert und cDNA synthetisiert. In der anschließenden qRT-PCR wurden die Effekte der siRNA auf das Zielgen gemessen. Dazu wurde eine endogene Kontrolle (z.B. *GAPDH*) verwendet und der normalisierte Expressionswert (ΔC_T) für das Zielgen in der experimentellen Probe mit dem entsprechenden ΔC_T für die mit einer Kontroll-siRNA transfizierte Probe (Scrambled) verglichen. Die ΔC_T - und $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden unter Zuhilfenahme der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (Gleichung 2; Winer *et al.*, 1999).

$$\Delta C_T (\text{Probe}) = [C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{endogene Kontrolle})]$$

$$\Delta C_T (\text{Scrambled}) = [C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{endogene Kontrolle})]$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Probe}) - \Delta C_T (\text{Scramble})$$

$$\% \text{ Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\% \text{ Silencing} = 100 - \% \text{ Expression}$$

Gleichung 2: Berechnung des Gensilencings und der verbleibenden Expression.

2.5.3 Bestimmung des Zellindex über Impedanzveränderungen

Analog zum Ohmschen Gesetz, wonach der elektrische Widerstand der Quotient aus Gleichspannung und Gleichstrom ist, ist der Wechselstromwiderstand (Impedanz) der Quotient aus der komplexen, zeitabhängigen Wechselspannung $\underline{u}(t)$ und des komplexen, zeitabhängigen Wechselstroms $\underline{i}(t)$.

$$\underline{Z} = \frac{\underline{u}(t)}{\underline{i}(t)}$$

Sie ergibt sich jedoch nicht als Quotient aus der reellen zeitabhängigen Wechselspannung $u(t)$ und des reellen zeitabhängigen Wechselstroms $i(t)$.

Der Betrag der komplexen Impedanz ist der Scheinwiderstand Z :

$$Z = |\underline{Z}|$$

Das Xcelligence System von Roche Applied Science ist ein mikroelektronisches Biosensor-System für zelluläre Anwendungen, das eine dynamische Echtzeit-Analyse ohne Notwendigkeit einer Markierung der Zellen erlaubt. Im Gegensatz zu anderen Methoden, bei der es sich meist um eine Endpunktanalyse handelt, können hiermit kontinuierlich Messungen getätigt werden, die auf der Messung der Impedanz beruhen. Dieses Verfahren wird auch als *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS) bezeichnet. Dabei wachsen die Zellen auf einer flachen Goldfilm-Elektrode auf dem Boden des Kulturgefäßes. Die Impedanz der zellbedeckten Elektrode wird bei einer oder mehreren Frequenzen als Funktion der Zeit gemessen und von der *RTCA* Software als Zellindex (CI) ausgegeben. Da sich die Zellen aufgrund der isolierenden Eigenschaften ihrer Plasmamembran wie dielektrische Partikel verhalten, nimmt die Impedanz mit zunehmenden Bewuchs der Elektrode zu bis sich schließlich eine kontinuierliche Zellschicht gebildet hat. Dabei hat die Zellform einen maßgeblichen Einfluss auf die gemessene Impedanz. Kommt es zu einer Änderung der Zellform, so ändern sich auch die Stromwege in der Zelle und führen somit zu einer entsprechenden Veränderung der Impedanz und des Zellindex (Abbildung 2-5). Somit kann diese Methode für eine Vielzahl von zellbiologischen Anwendungen wie z.B. Wirkstoff- und Zytotoxizitätsscreenings genutzt werden (XIAO *et al.*, 2002).

Mit dem ECIS konnte Einfluss der RNA-Interferenz auf das Zellwachstum der untersuchten Melanomzellen genauer analysiert werden. Dazu wurden die Zellen wie unter 2.5.1.1 beschrieben ausgesät und nach optimiertem Protokoll mit siRNA transfiziert.

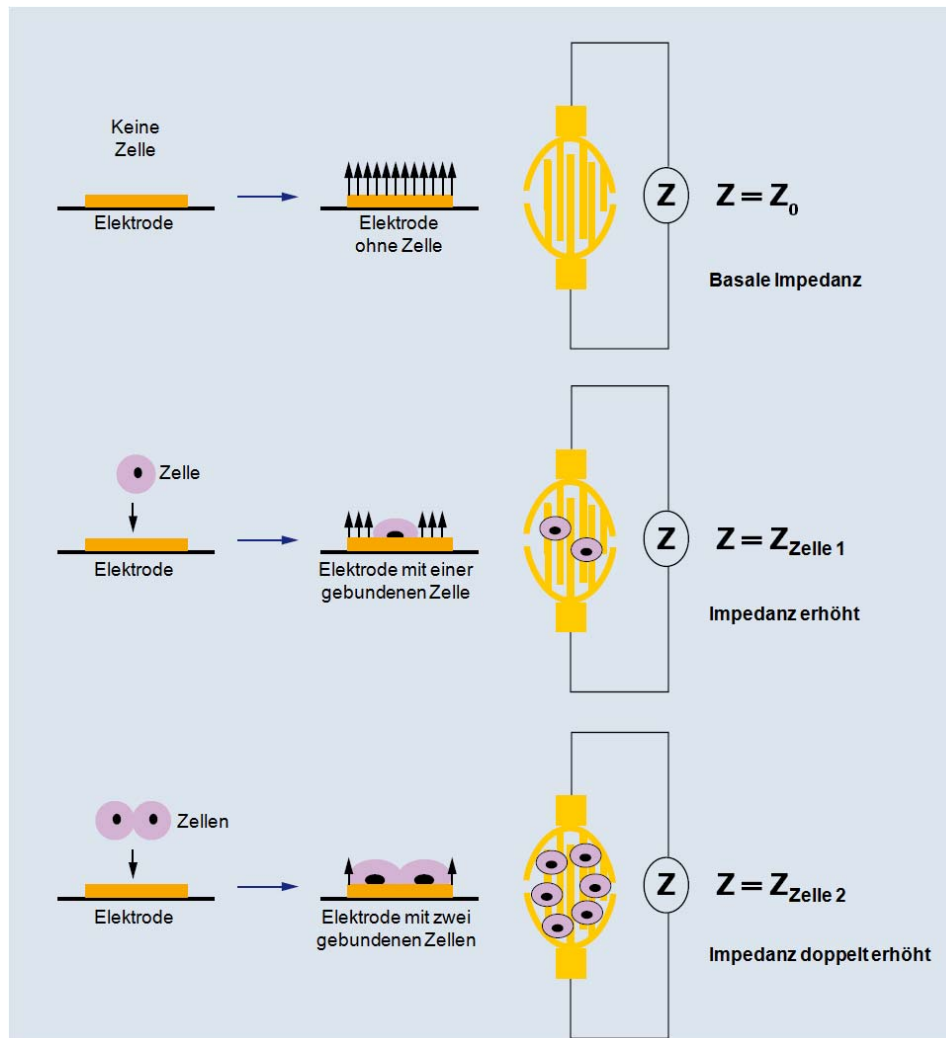


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Impedanz-Messung mittels Xcelligence System (Roche). Z bezeichnet die Impedanz, die in Ohm gemessen wird. Die Impedanz wird von der RTCA Software gemessen und als Zellindex (CI) ausgegeben.

2.5.4 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie oder auch FACS (*fluorescence activated cell sorting*) ermöglicht es, bestimmte Eigenschaften von Zellen zu analysieren. Die Messung beruht auf der Emission von optischen Signalen, die von Zellen ausgesandt werden, wenn sie von einem Laserstrahl passiert werden. Die in Lösung befindlichen Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und durchqueren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Daraufhin wird durch die Zellen ein Teil des Lichts gestreut, welches mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen wird. Es besteht eine Korrelation zwischen der Menge des gestreuten Lichts und der Größe und Komplexität der Zelle. Das

Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) gibt Aufschluss über die Größe und das Volumen der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Mit diesen beiden Parametern lassen sich unterschiedliche Zellen in einer Probe unterscheiden. Neben dem gestreuten Licht ist es möglich, im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben (Fluorochrome) zu messen. Man verwendet hierfür Farbstoffe, die an bestimmte Bestandteile der Zelle binden. So kann man durch den Einsatz interkalierender Farbstoffe aufgrund der Helligkeit bestimmen, wie viel DNA in der Zelle vorhanden ist. Auch Antikörper, die gegen bestimmte Oberflächenproteine gerichtet und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können verwendet werden. Mit Hilfe von Laser und Filter, die die Fluorochrome bei unterschiedlichen Wellenlängen anregen und messbar machen, ist eine Unterscheidung der Zellen nach diesen Merkmalen möglich.

Das hier verwendete Durchflusszytometer war ein LSRII der Firma Becton Dickinson (BD). Es wurden unterschiedliche Konjugate zur Färbung der Melanomzellen je nach Ziel der Untersuchung benutzt.

Färbung der Melanomzellen mit Hoechst 33342 zur Untersuchung der Zahl lebender Zellen

Das blau fluoreszierende Hoechst 33342 (Invitrogen) ist ein DNA-Farbstoff mit einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einem Emissionsmaximum bei 461 nm. Hoechst 33342 ist zellpermeabel und interkaliert mit dsDNA. Diese Färbung wurde benutzt, um lebende Zellen zu quantifizieren. Dazu wurden die zu betrachtenden Zellen zunächst trypsiniert, bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und nach dem Waschen mit PBS in 1 ml PBS aufgenommen. Dann wurden 5 µg (=0,5 µl einer 10 mg/ml Stocklösung) Hoechst 33342 zugegeben und die Zellen 30 min bei Raumtemperatur gefärbt. Darauf wurden sie mit 0,5% BSA + 0,05% Na-Azid in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min wurden die Zellen mit 0,37% Formaldehyd in Isoton zur direkten FACS-Messung fixiert. Die so gefärbten Zellen konnten anschließend

im FACS mit einem 405 nm-Laser und einem 440/40 nm-Filter analysiert und zusätzlich unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Messung der Transfektionseffizienz gelabelter siRNAs in Melanomzellen

Zur Untersuchung der Transfektionseffizienz nach siRNA-Transfektion in den Melanomzellen, wurde eine Cy3-markierte Kontroll-siRNA gegen *GAPDH* (Ambion) verwendet. Die transfizierten Zellen wurden 48 h p.t. zunächst trypsiniert und mit PBS gewaschen. Ohne weiteres Waschen und ohne Fixierung wurden die Zellen danach im FACS analysiert. Die Anregungswellenlänge für Cy3 liegt bei ca. 550 nm und das Emissionsmaximum bei ca. 570 nm. Die Zellen wurden daher mit einem 575/26-Filter nach einer Anregung mit einem 561 nm-Laser gemessen.

Färbung der Melanomzellen mit 7-Aminoactinomycin und Annexin V zur Untersuchung von Apoptose

Um die Häufigkeit von Apoptose in kultivierten Zellen analysieren zu können, wurden die Zellen mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD; BD Biosciences) und Annexin V-FITC (Clontech) gefärbt. Durch die Doppelfärbung mit 7-AAD, einem mit dsDNA interkalierenden Farbstoff, und Annexin V, einem Calcium-abhängigen Phospholipid-bindenden Protein, war es möglich, lebende Zellen (7-AAD und Annexin V negativ) von früh- (7-AAD negativ, Annexin V positiv) bzw. spätapoptotischen oder -nekrotischen Zellen (7-AAD und Annexin V positiv) zu unterscheiden. Die Anregungswellenlänge für 7-AAD liegt bei 481 nm und das Emissionsmaximum bei 647 nm, für Annexin V-FITC liegen diese Werte bei 494 nm und 518 nm.

Für diese Analyse wurden die Zellen zunächst trypsiniert und wie bei der Hoechst 33342-Färbung beschrieben gewaschen. Für die Doppelfärbung wurde ein Mastermix hergestellt, der pro Probe 100 µl Annexin V-Bindepuffer (aus dem ApoAlert Apoptosis Kit, Clontech), 2,5 µl Annexin V und 0,1 µl einer 7-AAD-Stocklösung (4 mg/ml) enthielt. Dieser Mastermix wurde nach der Zentrifugation zu den Zellpellets gegeben und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden nach einem weiteren Waschschrift mit Bindepuffer und der Fixierung mit 0,37% Formaldehyd in Isoton im FACS analysiert. Beide

Farbstoffe wurden mit einem 488 nm-Laser angeregt. Die Emissionsmessung wurde für 7-AAD mit einem 695/40-Filter und für Annexin V-FITC mit einem 530/30-Filter vorgenommen.

3 ERGEBNISSE

3.1 HERV-K (HML-6) Expression in Melanomzellen und Melanozyten

Da es ständig wachsende Hinweise auf eine Beteiligung von HERV-K an der Entstehung verschiedener Erkrankungen gibt, sollte ein System entwickelt werden, das eine Analyse exprimierter HERVs erlaubt. Zur Etablierung der Methode wurde zunächst die HERV-K (HML-6) Familie ausgewählt, deren erhöhte Expression im Zusammenhang mit dem Auftreten von malignen Melanomen beschrieben wurde.

Mitglieder der HERV-K (HML-6) Familie, die auch als HERV-K3 bezeichnet wird, zeichnen sich neben einer hohen Homologie in der *pol*-Region auch durch große Übereinstimmungen im LTR-Bereich aus. Dieser Umstand wurde zur Analyse der exprimierten HERV-K (HML-6) Mitglieder in den Melanomzelllinien SK-Mel-28 und A-375 sowie in den Melanozyten NHEM-M2 genutzt. Zunächst wurde hierzu eine Datenbank erstellt, auf deren Grundlage Primer ausgewählt wurden, die eine HERV-K (HML-6) spezifische PCR-Amplifikation im Bereich des LTR ermöglichen. Nach Amplifikation wurden die entstandenen PCR-Produkte kloniert und sequenziert.

3.1.1 Das Melanozytenisolat NHEM-M2 und die Melanomzelllinien SK-Mel-28 und A-375

Zur Untersuchung der *HML-6* Expression in verschiedenen Zellen wurden die Melanomzelllinien SK-Mel-28 und A-375 sowie als Referenz das Melanozytenisolat NHEM-M2 genutzt.

Bei beiden verwendeten Melanomzelllinien handelt es sich um Isolate aus Melanomen. Diese Zelllinien sind morphologisch und physiologisch sehr unterschiedlich (Abbildung 3-1). Von der Zelllinie SK-Mel-28 ist bekannt, dass sie HERV-K *env*-Transkripte bildet (BÜSCHER *et al.*, 2005), hohe Titer an virusähnlichen Partikel (VLP, *virus-like particles*) produziert (MUSTER *et al.*, 2003) und die Transplantation dieser Zellen in Mäuse zur Induktion von Melanomen führt (SCHADENDORF *et al.*, 1996). Die Transplantation von A-375 Zellen in

Nacktmäuse führt ebenfalls zur Induktion von Tumoren (KITAGAWA *et al.*, 2005). Eine Bildung von VLPs ist in dieser Zelllinie bisher nicht beschrieben.

Als Referenzzelllinie diente in dieser Arbeit NHEM-M2 (im Folgenden kurz NHEM genannt). Es handelt sich hierbei um ein Melanozytenisolat aus der Wange eines Mannes. Im Gegensatz zu Melanomzellen wachsen Melanozyten deutlich langsamer. Sie wurden eingesetzt, da sich Melanome aus transformierten Melanozyten entwickeln und somit als Vorläufer der entarteten melanomatösen Zellen bezeichnet werden können.

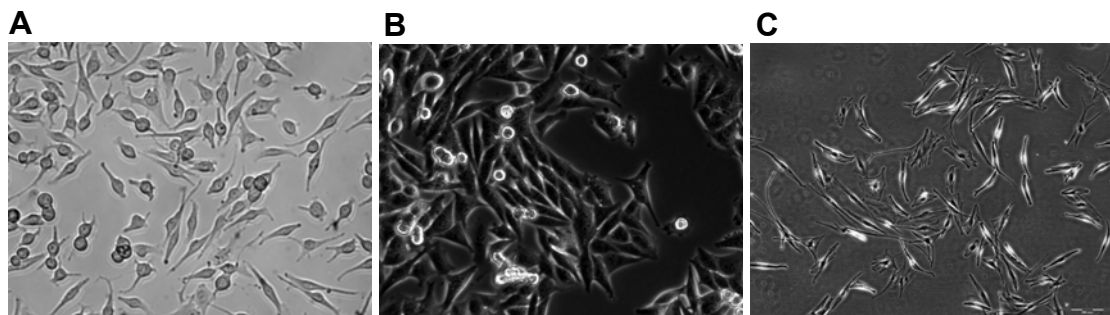


Abbildung 3-1: Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zelllinien. (A) SK-Mel-28 und (B) A-375 (Melanom) sowie (C) NHEM-M2 (Melanozyten). Vergrößerung: 400fach.

3.1.2 Erstellung einer Datenbank für HERV-K (HML-6)

Zum Design einer LTR-spezifischen Datenbank für HERV-K (HML-6) wurde zunächst mit Hilfe der *Retroscore*-Datenbank (<http://www.daimi.au.dk/~biopv/herv/>) eine typische LTR-Sequenz (LTR3) dieser HERV-Familie ermittelt (Anhang 7.1.1). Die LTR3-Sequenz wurde dann in die *UCSC*-Datenbank (*Humane Genome Browser*; <http://genome.ucsc.edu/>) eingegeben und mittels *Blat Search* analysiert. Es ergaben sich dabei Treffer sowohl für vollständige Mitglieder der HERV-K (HML-6) Familie als auch für einzelne (*solitary*) LTR3s, die über das gesamte humane Genom verteilt vorliegen. Die exakten Identifikationsnummern (*accession number*) und chromosomalen Positionen sind im Anhang unter 7.1.2 aufgeführt. Der Vergleich der Sequenzen untereinander (7.1.3) durch die *Bioedit* Software zeigte, dass sich Bereiche hoher Homologie innerhalb der LTRs finden lassen. Auf Basis der Sequenzvergleiche dieser homologen Regionen, die hauptsächlich in den U3- und U5-Bereichen der LTRs zu finden sind, wurden Primer erstellt, die eine spezifische Amplifikation ermöglichen. Der U3-Primer

wurde dabei revers gewählt, während der U5-Primer in Vorwärts-Orientierung vorlag, um eine lineare Amplifikation in Richtung der Insertionsstelle zu gewährleisten. Zusätzlich wurden *Nested PCR* Primer erstellt, um auch gering exprimierte HERV-K Sequenzen spezifisch nachzuweisen. Die Datenbank-Erstellung, der Sequenzvergleich und das Primer-Design wurden mit Hilfe von Dr. Stephan Fröde durchgeführt.

Tabelle 3-1: LTR3-spezifische Primer für die 5'-RACE-PCR.

Primer-Name	Sequenz		
U3_218A-rev	CCA GAT GTT CCA GTA GAT AAC CTC AA	}	1:1
U3_218B-rev	CCA GAT GTC CCA GTA GAT AAC TTC AA		
U5_297-for	CCT TCT CCC TAT CTC YTT TAC YCA AT		Äußere PCR
U3_66-rev	CAT RYA GCC TYC AGT GGA ATG CTG AGT TG		Innere PCR
U5_459-for	TGC ATT CRY CCY CCT TTG TTC AG		

3.1.3 Analyse der exprimierten HERVs durch eine 5'-RACE-PCR

Mit den erstellten Primern wurden die in den Melanomzelllinien und Melanozyten exprimierten HERVs der Familie HML-6 analysiert. Dazu wurde aus den Zellen zunächst RNA isoliert und in die so genannte SMART (*Switching Mechanism at 5'-End of RNA Template*) wie unter 2.4.4 beschrieben eingesetzt. Nach der cDNA-Synthese wurden 2,5 µl des Produkts in eine äußere PCR eingebracht, von der wiederum 1 µl einer 1:40-Verdünnung als Template für eine innere PCR verwendet wurden. Diese PCR-Produkte wurden zur Überprüfung gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5). Für das analytische Gel der äußeren PCR wurde ein 6% TBE-PAGE und für das präparative der inneren PCR ein 1,5% TAE-Agarosegel verwendet. Wie in Abbildung 3-2 zu erkennen ist, weist jede der eingesetzten Zelllinien ein spezifisches Bandenmuster auf, welches charakteristisch für die jeweilige Zelllinie ist und auf die Expression unterschiedlicher HERVs hindeutet. So sind einige HERV-K Sequenzen ausschließlich in Melanozyten hoch exprimiert. In Melanomzellen

jedoch fehlen sie gänzlich oder werden nur schwach transkribiert (z.B. Abbildung 3-2, Bande 4). Wiederum sind auch in den Melanomzelllinien HERV-K Sequenzen zu sehen, die in den Melanozyten deutlich geringer exprimiert werden (z.B. Abbildung 3-2, Bande 2). Die Banden stark exprimierter Transkripte, die in den anderen Zelllinien nicht in dieser Intensität auftraten, wurden isoliert und sequenziert (Abbildung 3-2; rote Rechtecke). Zudem wurden exemplarisch einzelne Banden analysiert, um die spezifische Amplifikation von *HERV-K (HML-6)* Transkripten nachzuweisen (Abbildung 3-2; grüne Rechtecke).

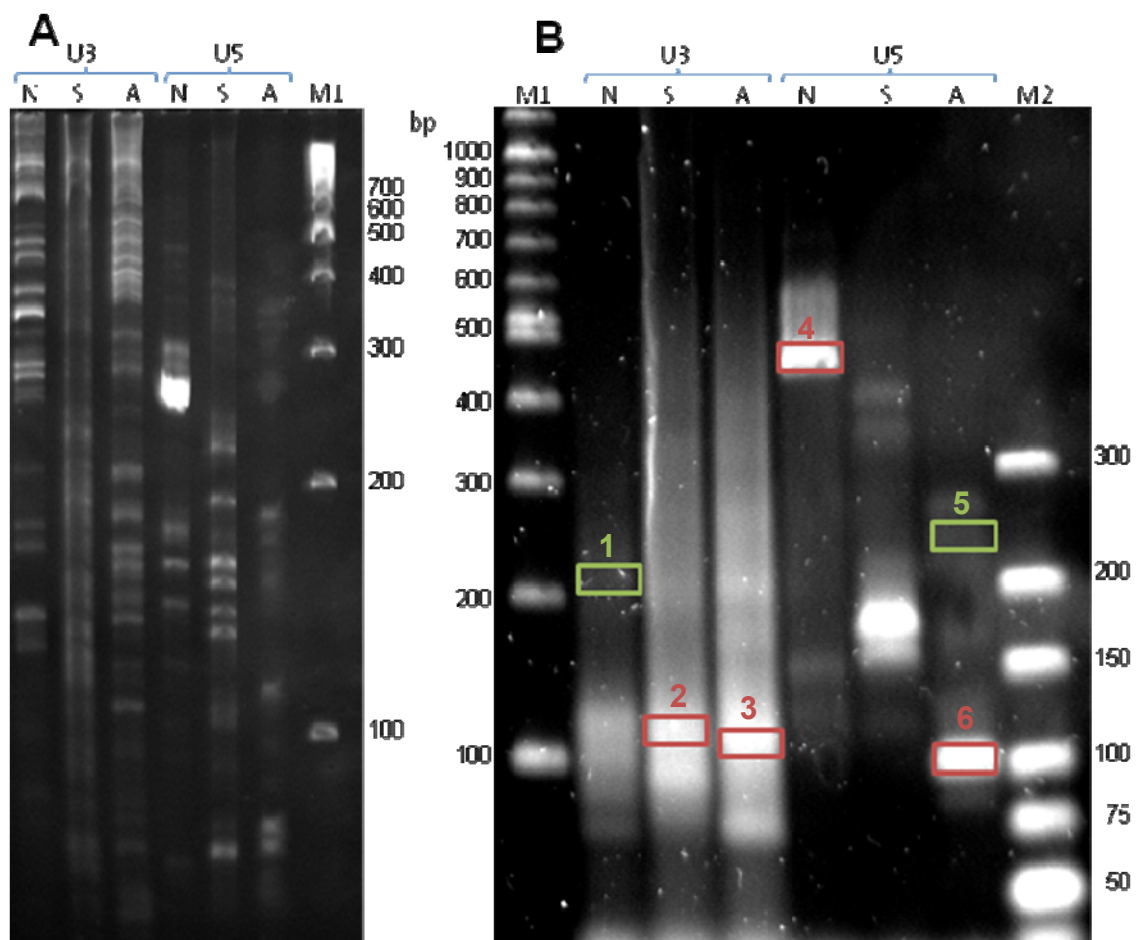


Abbildung 3-2: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate aus der 5'-RACE-PCR. Analytisches 6% TBE-PAGE der äußeren PCR (A) und präparatives 1,5% TAE-Agarosegel der inneren PCR (B). N: NHEM (Melanozyten); S: SK-Mel-28 (Melanom); A: A-375 (Melanom). Die Rechtecke kennzeichnen Banden, die ausgeschnitten wurden. Rot markiert sind abundante Banden, grün markiert Banden, die exemplarisch isoliert wurden (siehe Text).

3.1.4 Charakterisierung von melanom- bzw. melanozyten-spezifischen *HML-6* Transkripten

Nach Exzision und Aufreinigung (2.2.6) wurden die Amplifikate kloniert und sequenziert. Dazu wurden die DNA-Fragmente zunächst mittels *Phusion*-Polymerase nachbehandelt (2.2.1). Diese Polymerase führt zu stumpfen Enden (*Blunt Ends*) an der amplifizierten DNA und ermöglicht so eine Ligation in den pJet1.2-Vektor. Für die Ligation wurde ein Vektor/Insert-Verhältnis von 1:3 gewählt (2.2.2). Nach einer TSS-Transformation (2.2.3) wurden einzelne Klone kultiviert und eine Plasmidpräparation (2.2.4) durchgeführt. Die Plasmide wurden anschließend unter Verwendung von pJet1.2-spezifischen Primern sequenziert (2.2.9) und mit der *Bioedit* Software analysiert. Nach Sequenzvergleichen (*Blast*) mit den *NCBI*- und *UCSC*-Datenbanken (7.1.4) ergaben sich die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse. Da eine Analyse der gesamten Sequenz bei einzelnen Transkripten keine Resultate erbrachte, wurden die Sequenzen in Abschnitte unterteilt und mit den angegebenen öffentlichen Datenbanken verglichen.

U3-spezifische Amplifikation:

Bande 1: U3-NHEM (~210 bp im präparativen Gel)

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|
      10      20      30      40      50      60      70      80
TCCCTTTGGC CTTTTGGCT CCAACATCC CGCGTACTCT GCGTTGATAC CACTGCTCGC GTACTCTGCG TTGATACCAC TGCT

```

Der Sequenzvergleich des 1. Abschnitts (Nkt. 1-30) ergab eine Übereinstimmung mit mehreren LTR3-Fragmenten auf verschiedenen Chromosomen. Die größte Ähnlichkeit ergab sich mit einem LTR3 auf Chromosom 20 (gelb hinterlegt, [ref|NT_011387.8|Hs20_11544](#)), das lediglich im letzten Nukleotid von der Sequenz abweicht.

Bei dem Abschnitt 2 (grau) handelt es sich um ein repetitives Element, das ebenso in gleicher Abfolge im 3. Abschnitt (blau) zu finden ist. Die Expression der gesamten Nukleotidfolge wurde in der EST-Datenbank in Zusammenhang mit malignen Melanomen beschrieben (DEICHMANN *et al.*; [AJ293392.1](#)). Dabei wiederholt sich die repetitive Sequenz mehrfach. Zudem wurde eine sehr

Bande 3: U3-A-375 (~110 bp im präparativen Gel)

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
AGCAGTGGTA TCAACGCAGA GTACGCGGGC GAGAGAGAAA AAAGAAAGGA C|TGTAGAGAG CCAAAAGCCA AAGGGTCAAC CAACTCAGCA
.....|.....| .....|.....| .....|.....|
      100     110     130
TCCA|CTGAAG GCTGCATGAT CTT

```

Der 1. Abschnitt dieser Sequenz (Nkt.1-41; grau) zeigte Übereinstimmungen mit dem humanen Chromosom 1 ([ref|NT_004487.18|Hs1_4644](#)). Außerdem wurde eine Expression in der EST-Datenbank von TRINKLEIN beschrieben, die auf Grundlage einer 5'-RACE-PCR humaner cDNA entstand ([gb|EL582426.1|](#)).

Der 2. Abschnitt (Nkt. 42-113) wies hingegen Übereinstimmungen mit Chromosom 19 auf ([ref|NT_011109.15|Hs19_11266](#)). Eine Expression in Retina ([gb|AA668223.1|](#)) und Testis ([dbj|DB522697.1|](#)) wurde beschrieben, eine Assoziation zu Melanomen wurde aber bisher noch nicht gezeigt. Der gelb hinterlegte Bereich kennzeichnet den LTR3-homologen Bereich.

Aufgrund der unterschiedlichen chromosomalen Ähnlichkeiten der beiden Abschnitte war eine genomische Zuordnung der gesamten Sequenz nicht möglich.

U5-spezifische Amplifikation:**Bande 4: U5-NHEM (~450 bp im präparativen Gel)**

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
GCAGTGGTAT CAACGCAGAG TACGGGGGAA GCGCCTTTGT GAAGTAGGCC TTATTTCTCT TGTCCTTTTCG TACAGGGAGG AATTTGAAGT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      100     110     120     130     140     150     160     170     180
AGATAGAAAC CGACCTGGAT TACTCCGGTC TGA|ACTCAGA TCACATAGGA CTTTAATCGT TGAACAAACG ATCCTTTAAT AGCGGCTGCA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      190     200     210     220     230     240     250     260     270
CCATCGGGAT GTCCTGATCC AACATCGAGG TCGTAAACCC TATTGTTGAT ATGGACTCTA GAATAGGATT GCGCTGTTAT CCCTAGGGTA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      290     300     310     320     330     340     350     360     370
ACTTGTTCG TTGGTCAAGT TATTGGATCA A|TTGAGTAAA AGAGATAGGA A|GAAGC|TGA ACAAAGGAGG ACGAATGCAA TCTTCTAGAA
.....|.....| .....|.....|
      380     390
GATCTCCTAC AAATCCG

```

Bei dieser Sequenz war keine Unterteilung in einzelne Abschnitte nötig. Ein direkter Vergleich der gesamten Nukleotidfolge ergab eine Übereinstimmung mit dem mitochondrialen Genom ([gb|FJ986465.1|](#)). Außerdem wurde die

Expression dieser Sequenz im Augapfels beschrieben (ZHOU *et al.*, 2007, [gb|EL953752.1|](#)), wobei hier keine Hinweise auf eine Expression im Zusammenhang mit einer Erkrankung vorlag. Desweiteren konnten die Bereiche der Nukleotide 301-326 (gelb; [ref|NT_005612.15|Hs3_5769](#)) und 327-347 (grün; [ref|NT_007995.14|Hs8_8152](#)) jeweils als LTR3-Elemente identifiziert werden.

Bande 5: U5-A-375_1 (~230 bp im präparativen Gel)

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
AGCAGTGGTA TCAACGCAGA GTACGCGGGC ACGTGTTAGG GGAATGTAGG TACTCATTGC CATGGACCCCT GGGACAACAA AGGAGGACGA
.....|.....|
      100
ATGCAATC

```

Der Vergleich des 1. Abschnitts dieser Sequenz (grau) ergab nur fragmentale Übereinstimmungen mit dem humanen Genom. Eine Expression der Nukleotide 1-29 wurde für humane mRNA beschrieben ([emb|BX647566.1|](#)), allerdings ohne Assoziation zu melanozytenhaltigen Geweben und Krebs oder Autoimmunerkrankungen.

Der 2. Abschnitt wies genomische Übereinstimmungen zu Chromosom 9 auf ([ref|NT_008470.18|Hs9_8627](#)). Eine partielle Expression wurde im Zusammenhang mit Leukämie beschrieben ([gb|BM147374.1|](#)). Der LTR3-homologe Bereich wurde auch hier gelb hinterlegt.

Eine genomische Zuordnung der gesamten Nukleotidfolge zu Chromosom 9 ließ sich hier nicht vornehmen, da der 1. Abschnitt keinerlei Homologie zu diesem Chromosom aufwies.

Bande 6: U5-A-375_2 (~100 bp im präparativen Gel)

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
GCATTCGTCC CCCTTTGTTT AGTCCAACAG GGATTGGGTC CACGTCAGCT TTC CCCGGCG TACTCTCGTT GATACCTCTG CTTTCTTGCA
.....|.....|.....|.....|
      100      110
GAAGATGTCC TAGA

```

Der 1. Abschnitt (Nkt. 1-53) wies genomisch Ähnlichkeit zu Chromosom 18 auf ([ref|NT_010966.13|Hs18_11123](#)). Es handelte sich hierbei um ein LTR3-Element ([gb|U60268.1|HSU60268](#)).

Der 2. Abschnitt konnte genomisch nicht genau zugeordnet werden. Mehrere Fragmente wiesen auf unterschiedliche Chromosomenlokalisationen hin. Die Expression eines Teils der Sequenz (Nkt. 55-83) wurde von TRINKLEIN im Rahmen der 5'-RACE-Amplifikation humaner cDNA beschrieben ([gb|EL585000.1|](#)).

Eine Zuordnung der gesamten Nukleotidfolge konnte genomisch nicht erfolgen.

Insgesamt war festzustellen, dass bei der Auswertung der Sequenzen aller Proben Übereinstimmungen mit in der UCSC-Datenbank publizierten LTR3-Elementen zu finden waren. Eine chromosomale Zuordnung der jeweiligen gesamten Sequenz konnte nicht vorgenommen werden, da sich die homologen Bereiche der einzelnen Abschnitte auf unterschiedlichen Chromosomen befanden und die Gesamttranskripte in dieser Form mit Ausnahme des Klonen der Bande 4 (U5-NHEM) noch nicht beschrieben wurden. Die datenbankgestützte Analyse der umliegend amplifizierten Regionen wies größtenteils Übereinstimmungen mit in der EST-Datenbank veröffentlichten Sequenzen einer 5'-RACE-Amplifikation humaner RNA (TRINKLEIN *et al.*, 2007) auf oder konnte in einen Zusammenhang mit der Expression in malignen Melanomen oder im Augapfel gebracht werden.

Die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass es sich bei allen Amplifikationsprodukten um LTR3-spezifische Elemente handelte. Inwiefern es sich dabei tatsächlich um Transkripte der verwendeten Zelllinien oder um Artefakte handelte, konnte nicht abschließend beurteilt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Primer für eine weitere Untersuchung exprimierter HERV-K (HML-6) Mitglieder geeignet sind, da sie eine spezifische Amplifikation

erlaubten. Auf Basis dieser Analysen ist es letztlich möglich, eine Charakterisierung der Zelllinien vornehmen zu können und unter Umständen Hinweise auf potentielle Melanommarker zu erhalten.

3.2 Analyse von *HERV-K-MEL* und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, untersuchten SCHIAVETTI und Kollegen (2002) verschiedene Gewebetypen auf die Expression von *HERV-K-MEL*, einem Mitglied der *HERV-K* (*HML-6*) Gruppe. Dabei stellten sie fest, dass es in Geweben melanozytischen Ursprungs und in Melanomgeweben zu einer stark erhöhten Expression kommt. Daher wurde vermutet, dass eine erhöhte *HERV-K-MEL* Expression ein früher Marker für die Transformation von Melanozyten zu Melanomen sein könnte.

In dieser Arbeit wurde versucht, die Funktion und den Einfluss von *HERV-K-MEL* genauer aufzuklären, indem RNA-Interferenz-Versuche in Melanomzelllinien durchgeführt wurden. Desweiteren wurde versucht, ein Überexpressionsklon für *HERV-K-MEL* zu generieren, der in Melanozyten transfiziert werden sollte, um zu untersuchen, ob eine vermehrte *HERV-K-MEL* Expression eine Transformation der Zellen induziert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind im Folgenden dargestellt.

3.2.1 Endogene Expression von *HERV-K-MEL* in Zelllinien

Bevor die Funktion von *HERV-K-MEL* in Melanomzellen untersucht wurde, wurde zunächst die endogene Expression dieses Gens in den verwendeten Melanomzelllinien SK-Mel-28 und A-375 mit der Expression in den Melanozyten NHEM verglichen. Dazu wurde RNA isoliert und nach cDNA-Synthese in einer quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) analysiert (Abbildung 3-4). Die für die qRT-PCR verwendeten Primer entsprachen denen, die bereits in der Arbeit von SCHIAVETTI benutzt wurden (Abbildung 3-3).

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 78

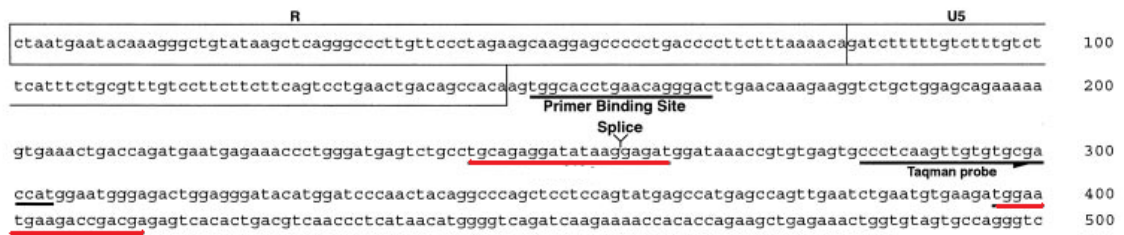


Abbildung 3-3: Lokalisation der Primer (rot unterstrichen) zur Amplifikation von HERV-K-MEL in der qRT-PCR. Nach SCHIAVETTI *et al.*, 2002.

Eine Besonderheit des Vorwärtsprimers besteht darin, dass er exakt über der postulierten Spleißstelle lokalisiert ist, so dass eine Erhöhung der spezifischen Bindung an das Transkript vorliegt. Um auszuschließen, dass neben *HERV-K-MEL* auch andere ungewünschte Genprodukte amplifiziert werden, wurden die Amplifikate nach erfolgter PCR kloniert und sequenziert. Die Analyse von zehn unterschiedlichen Klonen ergab, dass alle die publizierte *HERV-K-MEL* Sequenz aufwiesen. Zudem wurde ermittelt, ob der Einsatz einer spezifischen Sonde in der qRT-PCR notwendig ist oder die Reaktion mit SybrGreen, einem interkalierenden Farbstoff, erfolgen kann. Auch hier ergab die Analyse von zehn Klonen, dass die Auswahl der verwendeten Primer eine ausreichend spezifische Amplifikation ermöglicht, weshalb qRT-PCRs zur Analyse der *HERV-K-MEL* Expression in dieser Arbeit ausschließlich über *SybrGreen*-Assays erfolgten (2.4.3). Zudem wurde geprüft, ob *GAPDH* zur Normalisierung der Messwerte in der qRT-PCR geeignet ist. Da *GAPDH* sowohl in Melanozyten als auch Melanomzellen stabil und in konstanten Mengen exprimiert wurde (nicht gezeigt), erfolgten die Normalisierungen in nachfolgenden Experimenten ausschließlich gegen dieses Gen.

Bei der Analyse der endogenen Expression der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (Abbildung 3-4) zeigte sich, dass *HERV-K-MEL* in Melanozyten geringer transkribiert wird als in den Melanomzelllinien. So ist die endogene Expression in der Zelllinie SK-Mel-28 um den Faktor 4,2, in den A-375-Zellen sogar um den Faktor 8,2 gegenüber den Melanozyten NHEM erhöht. Dies bestätigte die von SCHIAVETTI gewonnenen Ergebnisse, dass *HERV-K-MEL* in Melanozyten deutlich weniger exprimiert vorliegt als in Melanomen und damit ein potentieller Marker für den Transformationsprozess sein könnte. Wie die

3.2 Analyse von *HERV-K-MEL* und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 79

Ergebnisse zeigen, war der experimentelle Ansatz für weitere Untersuchungen geeignet.

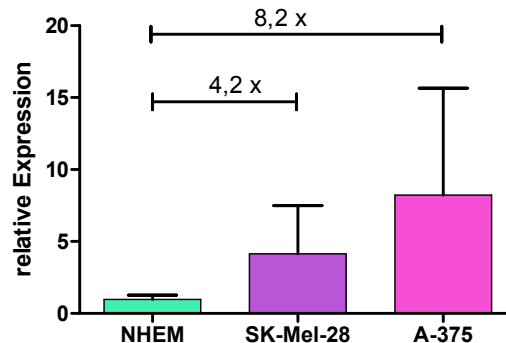


Abbildung 3-4: Endogene Expression von *HERV-K-MEL* in Melanozyten (NHEM) und Melanomzelllinien (SK-Mel-28 und A-375) mittels qRT-PCR. Gezeigt ist die relative Expression, wobei die *HERV-K-MEL* Expression in NHEM als 1 gesetzt wurde. n=6 (\pm SEM).

3.2.2 Etablierung der RNA-Interferenz in Melanomzelllinien

Da eine erhöhte Expression von *HERV-K-MEL* in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten zwar gezeigt werden konnte, dessen Auswirkungen aber bislang ungeklärt waren, wurde die Technik der RNA-Interferenz eingesetzt, um die Bedeutung dieses Gens aufzuklären. Dazu wurden chemisch synthetisierte siRNAs verwendet, die gegen das Zielgen *HERV-K-MEL* gerichtet waren und zu einem spezifischen Silencing führen sollten.

3.2.2.1 Optimierung der Transfektionsbedingungen (Mikroskopie, FACS, qRT-PCR)

Vor dem Einsatz der RNA-Interferenz mussten die Transfektionsbedingungen optimiert werden. Dazu wurden 48 h nach Transfektion (p.t.) jeweils die Transfektions- und Silencingeffizienzen analysiert. Um siRNAs transient in die Zellen zu bringen, wurde die Technik der lipid-basierten Transfektion benutzt. Da eine Vielzahl von Agenzien angeboten werden, die nicht für jede Zelllinie gleich gut geeignet sind, wurde in einigen Ansätzen geprüft, welches Agens sich für die Transfektion von siRNA in die hier verwendeten Melanomzellen am besten eignet. Dazu wurden zunächst Experimente mit der Melanomzelllinie SK-Mel-28 unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Agens- und siRNA-Mengen durchgeführt.

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 80

Um die Transfektionseffizienzen in den Melanomzellen visuell bestimmen zu können, wurde zunächst eine Cy3-markierte siRNA gegen *GAPDH* verwendet und die Zellen 48 h nach Transfektion (p.t.) mikroskopisch untersucht (Abbildung 3-5).

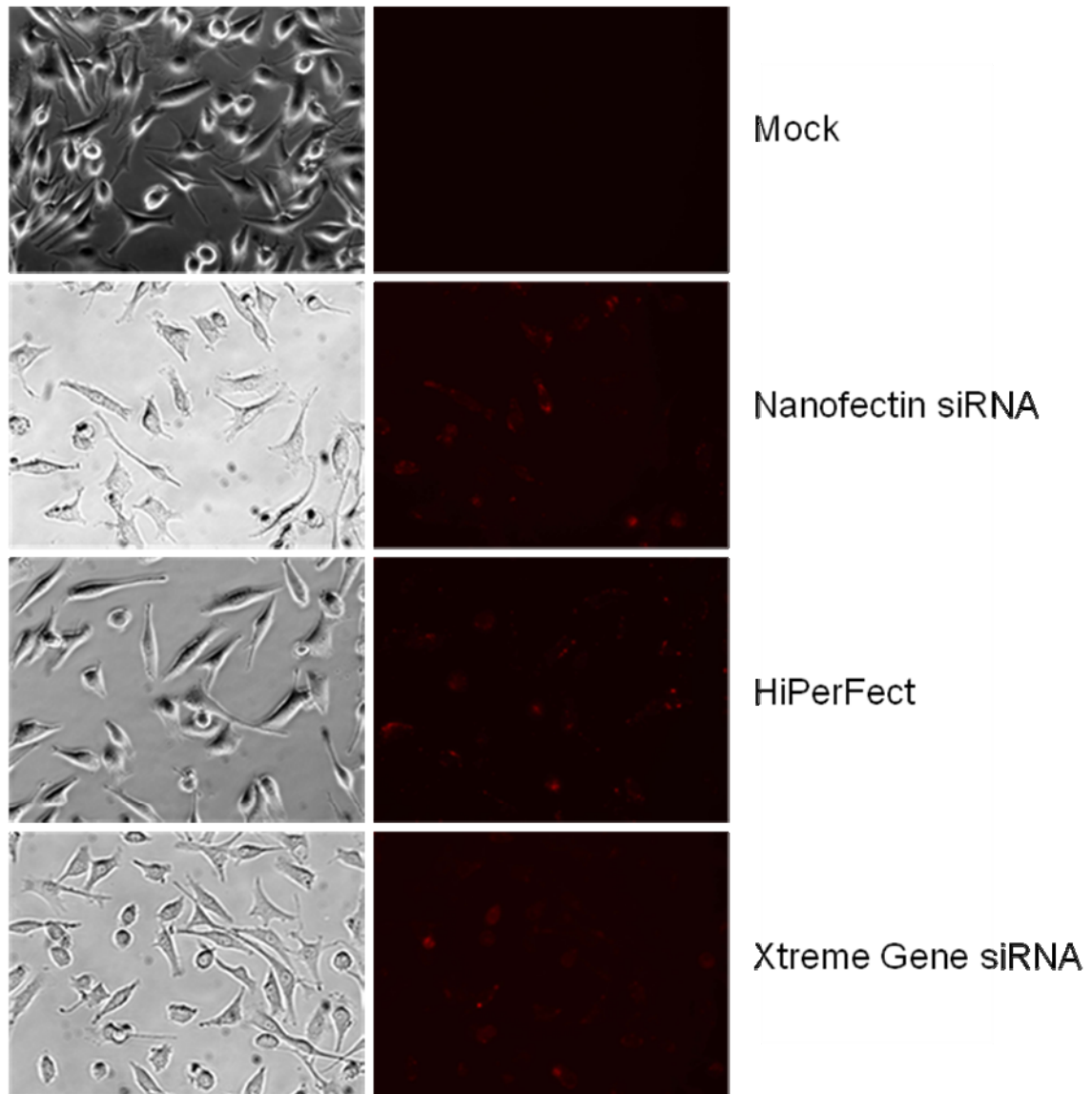


Abbildung 3-5: Mikroskopische Bestimmung der Transfektionseffizienzen mit Cy3-markierter siRNA gegen *GAPDH* in SK-Mel-28 mit verschiedenen Transfektionsagenzien. Links: Phasenkontrast, rechts: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen im Cy3-Filter. Vergrößerung: 400fach.

Bei der Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von mit Nanofectin siRNA, HiPerFect und Xtreme Gene siRNA transfizierten SK-Mel-28 Zellen ist visuell kein Unterschied zwischen den Effizienzen der einzelnen

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 81

Agenzien auszumachen. Daher wurden die Zellen einer durchflusszytometrischen Analyse im FACS unterzogen. Durch die Verwendung der Cy3-markierten siRNA war eine Messung transfizierter Zellen und somit eine Quantifizierung möglich. Nach Trypsinierung und Färbung der Zellen mit Hoechst 33342 zur Unterscheidung lebender, intakter Zellen von Zellfragmenten im FACS wurden sie im PE-Kanal analysiert. Die Werte dieser Messungen sind in Abbildung 3-6 aufgeführt, wobei die Population nicht-lebender Zellen nach Hoechst-Färbung bereits heraus gerechnet werden konnte.

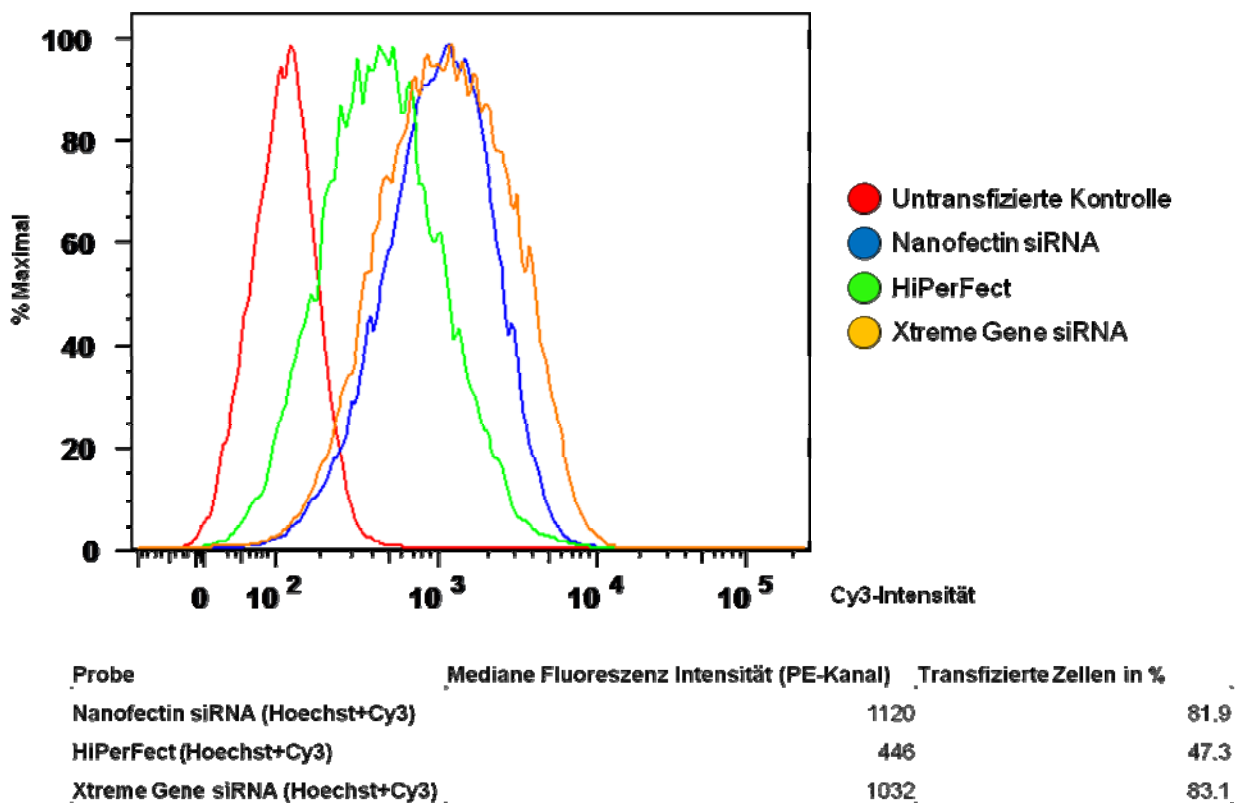


Abbildung 3-6: Quantitative Bestimmung der Transfektionseffizienzen nach Verwendung von Cy3-markierter siRNA gegen *GAPDH* in SK-Mel-28 im FACS. Die Zellen wurden mit Cy3-markierter siRNA transfiziert und mit Hoechst 33342 zur Unterscheidung lebender Zellen von Zellfragmenten gefärbt. Bei den aufgeführten Werten wurden die Fragmente bereits heraus gerechnet. Auf der x-Achse ist die Cy3-Intensität, auf der y-Achse die maximale Fluoreszenzintensität in % aufgetragen.

Wie anhand der durchflusszytometrischen Daten in Abbildung 3-6 ermittelt werden konnte, lag die Transfektionseffizienz für mit HiPerFect transfizierte Zellen bei ca. 47,3%. Die Verwendung von Xtreme Gene siRNA und Nanofectin

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 82

siRNA führte mit 81,9 bzw. 83,1% zu einer deutlich besseren Effizienz. Demnach traten bei gleichen Transfektionsbedingungen und unter Beachtung der Herstellerempfehlungen Schwankungen in der Effizienz auf, die mikroskopisch zwar nicht sichtbar waren, bei einer quantitativen Analyse im Durchflusszytometer jedoch deutlich wurden.

Da bei der RNA-Interferenz jedoch weniger die Transfektionseffizienz als vielmehr die Stärke der Regulation des entsprechenden Zielgens entscheidend ist, wurde eine Analyse der Silencingeffizienz vorgenommen. Dazu wurden drei unterschiedliche siRNAs gegen das antiapoptotisch wirkende *Bcl2* eingesetzt, von denen laut Hersteller mindestens zwei siRNAs einen Silencingeffekt von über 70% hervorrufen sollten. 48 h p.t. erfolgte eine Trypsinierung und RNA-Isolation der transfizierten SK-Mel-28 Zellen. Nach cDNA-Synthese wurde die verbliebene Expression in einer qRT-PCR quantifiziert, mit der sich unmittelbar auf die Silencingeffizienz schließen lässt (siehe Gleichung 2). Die Messwerte wurden dabei gegen *GAPDH* normalisiert (Abbildung 3-7).

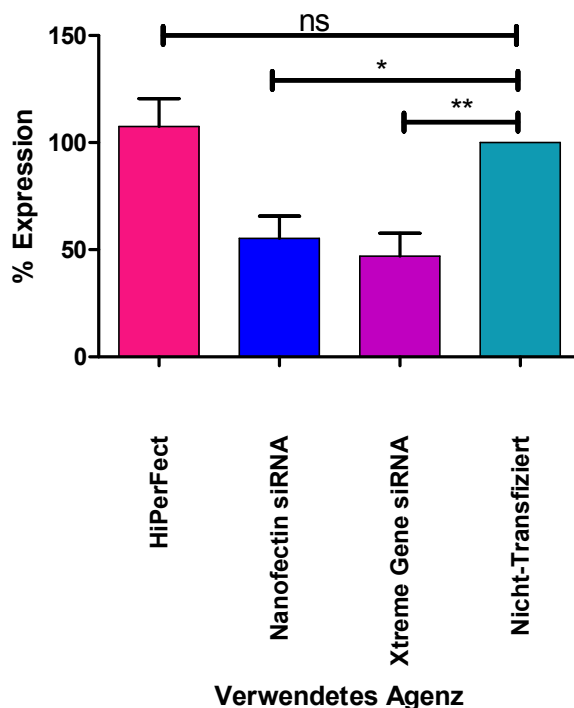


Abbildung 3-7: Vergleich der verbliebenen Expression unter Verwendung von siRNAs gegen *Bcl2* in SK-Mel-28. Die Bestimmung des Expression erfolgte mittels qRT-PCR. Die Normalisierung wurde gegen *GAPDH* vorgenommen, die Verrechnung der Werte erfolgte gegen nichttransfizierte Zellen (=100% Expression). n=9 (\pm SEM). Signifikanztest: One-Way ANOVA; *: p<0,05; **: p<0,01.

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 83

Die Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR im direkten Vergleich mit denen der Durchflusszytometrie zeigten eine Korrelation der Transfektions- und Silencingeffizienzen. Demnach führt HiPerFect, das im FACS eine Transfektionseffizienz von 47,3% aufwies, in der qRT-PCR nicht zu einem signifikanten Silencing von *Bcl2*. Die Agenzien Nanofectin siRNA und Xtreme Gene siRNA hingegen führten zu einer deutlichen Regulation von *Bcl2* ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) und wurden daher für weitere Optimierungen der Transfektionen eingesetzt.

Die Optimierung der Transfektionen für die zweite Melanomzelllinie A-375 erfolgte auf die gleiche Weise wie zuvor für SK-Mel-28 beschrieben. Da sich die Ergebnisse der Zelllinien SK-Mel-28 und A-375 entsprachen, wurde auf eine Darstellung der A-375 spezifischen Daten verzichtet. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die effektivsten Transfektionen unter Verwendung von Nanofectin siRNA und Xtreme Gene siRNA durchgeführt werden konnten.

In Titrationsexperimenten wurde die Silencingeffizienz weiter optimiert. Dabei wurden unterschiedliche Mengen siRNA mit unterschiedlichen Mengen Transfektionsagens eingesetzt, um das ideale siRNA/Agens-Verhältnis zu bestimmen. Exemplarisch ist hier die Titration für das Nanofectin siRNA Agens gezeigt. Die Quantifizierung von *GAPDH* wurde 48 h p.t. durch eine qRT-PCR wie zuvor beschrieben vorgenommen (Abbildung 3-8).

Die Titration ergab, dass bei geringen siRNA-Mengen (2 µg) eine Abhängigkeit der Silencingeffizienz vom siRNA-/Agensverhältnis besteht. Das ideale Verhältnis lag bei 1:5, was den Empfehlungen des Transfektionsagens-Herstellers entspricht. Eine Verwendung dieser Mengen führte in der Titration zu einer Verringerung der Expression um ca. 50%. Bei einer Verdopplung der siRNA-Menge auf 4 µg hatte das Mengenverhältnis keine deutlichen Effekte auf den Verlauf der Silencingeffizienz. Die maximale Regulation der Expression auf ca. 40% ergab sich erneut bei einem Verhältnis von 1:5, wobei auch der Einsatz eines Verhältnisses von 1:6 als geeignet angesehen werden kann.

Bei einer weiteren Erhöhung der siRNA-Menge auf 8 µg spielte das siRNA-/Agensverhältnis keine Rolle mehr, da konstant eine Genregulation auf 20% erzielt wurde. Bei einer mikroskopischen Betrachtung der Zellen fiel jedoch auf, dass die Verwendung dieser hoher siRNA- und Agensmengen zu zytotoxischen

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 84

Effekten führte. Daher wurden für alle Experimente die Mengen in die Transfektion eingesetzt, bei denen ein gutes Silencing gemessen werden konnte, zytotoxischen Effekt in den Zellen aber noch nicht beobachtet werden konnten. Eine Übersicht über die optimierten Bedingungen gibt die Tabelle 2-14.

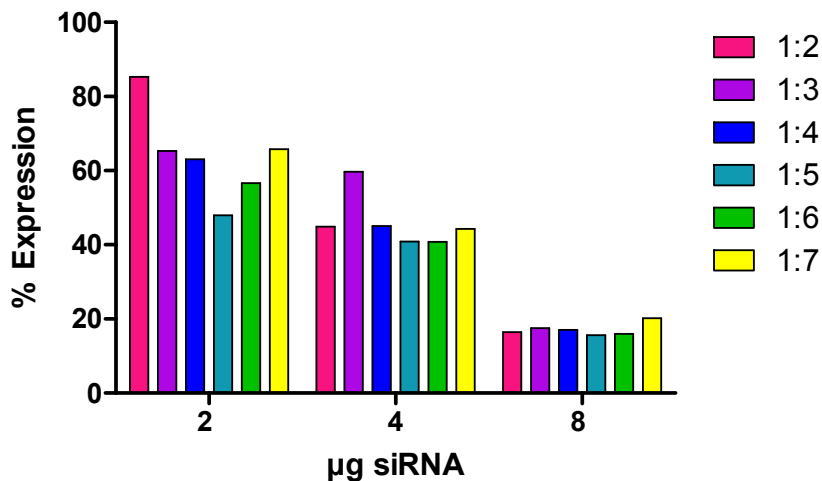


Abbildung 3-8: Titration des optimalen siRNA:Transfektionsagens-Verhältnisses unter Verwendung von siRNA gegen *GAPDH* und Nanofectin siRNA Agens auf A-375-Zellen. Gemessen wurde die verbleibende Expression mittels qRT-PCR. Die Verrechnung der Werte erfolgte gegen nichttransfizierte Zellen.

3.2.3 Silencing von *HERV-K-MEL* in Melanomzellen

Nach der Optimierung der Bedingungen wurden Transfektionsexperimente mit siRNAs gegen *HERV-K-MEL* in Melanomzellen durchgeführt. Dabei wurde von dem *HERV-K-MEL env*-Transkript ausgegangen, das von SCHIAVETTI (2002) beschrieben wurde (Abbildung 3-9).

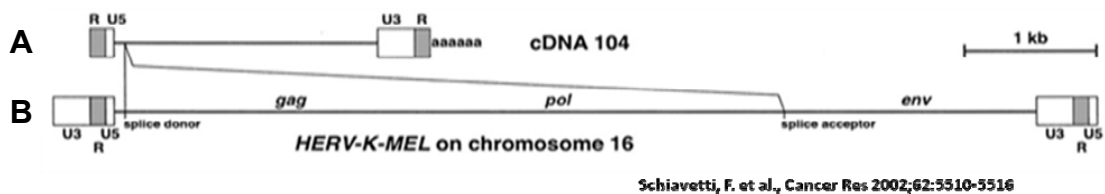


Abbildung 3-9: Von SCHIAVETTI postuliertes *HERV-K-MEL env*-Transkript vor (B) und nach (A) Spleißen. Während des Spleißvorgangs wird der *gag/pol*-Bereich entfernt.

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 85

Das Design der siRNAs erfolgte mit dem *Eurofins MWG Operon siRNA-Design Tool* (https://ecom.mwgdna.com/services/webgist/sirna_design.tcl) sowie dem *Integrated DNA Technology RNAi Design SciTool* (<http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/RNAi/RNAi.aspx>).

Die siRNAs wurden so gewählt, dass sie über das gesamte *env*-Transkript verteilt vorliegen (Abbildung 3-10). Um die Wahrscheinlichkeit zu minimieren, dass die siRNAs auch andere Gene als *HERV-K-MEL* beeinflussen (*Off-Target*-Effekte), wurde durch einen Sequenzvergleich in der *NCBI*-Datenbank geprüft, ob die ausgewählten siRNAs Sequenzübereinstimmungen mit anderen bekannten Genen aufweisen und diese unter Umständen ebenfalls beeinflussen könnten. Zudem wurden mehrere siRNAs gegen das Zielgen entworfen. Zusätzlich zu den herkömmlichen siRNAs von 21 Nukleotiden Länge (21mer, von MWG Operon) wurden für die *HERV-K-MEL* siRNAs Nr. 5 und 6 27mer-siRNAs (IDT) verwendet, da diese zu einem bis zu 100-fach erhöhten Silencing aufgrund von verbesserter Prozessierung im Dicer-Substrat-Komplex führen sollten (Kim *et al.*, 2005). Diese These konnte jedoch nicht bestätigt werden (nicht gezeigt).

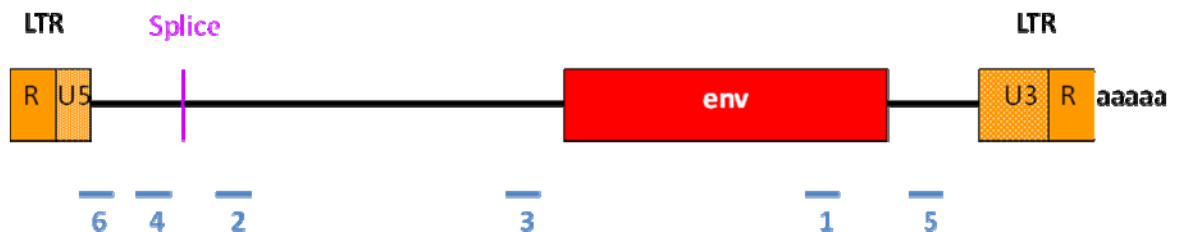


Abbildung 3-10: Lage der verwendeten siRNAs zum Silencing von *HERV-K-MEL*.

Die Melanomzelllinien SK-Mel-28 und A-375 wurden unter den zuvor optimierten Bedingungen (Tabelle 2-14) mit Nanofectin siRNA-Agenz und Xtreme Gene siRNA-Agenz transfiziert. Zunächst wurde untersucht, ob die Lage der verwendeten siRNAs einen Einfluss auf die Regulation von *HERV-K-MEL* hat. Dazu wurden die Expression dieses Gens in den Zellen 48 h p.t. nach Trypsinierung, RNA-Isolation und cDNA-Synthese in einer quantitativen Real-Time-PCR geprüft. Dabei wurde gegen *GAPDH* normalisiert. Als Negativkontrolle dienten nichttransfizierte Zellen (nt; Abbildung 3-11). In die Auswertung sind die Daten mehrerer unabhängiger Experimente

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 86

aufgenommen, wobei hier nicht zwischen den verwendeten Transfektionsagenzien unterschieden wurde. Zudem wurden die Daten nur in die Wertung einbezogen, wenn die Regulation mehr als 20% betrug. Andernfalls wurde die Transfektion als nicht erfolgreich definiert.

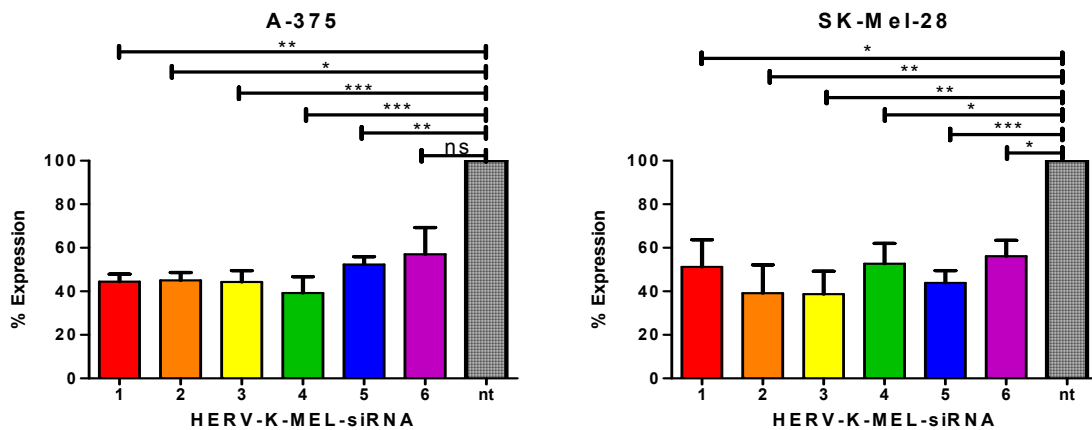


Abbildung 3-11: Relative Quantifizierung der *HERV-K-MEL* Expression nach Transfektion mit verschiedenen siRNAs gegen *HERV-K-MEL* mittels qRT-PCR. Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH*, die Verrechnung der Werte gegen nichttransfizierte Zellen (nt). n=20 (\pm SEM); Signifikanztest: One-Way ANOVA (ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Aus den Ergebnissen dieser Messungen lässt sich schließen, dass das Silencing von *HERV-K-MEL* unabhängig von der Lage der verwendeten siRNAs war. So konnte sowohl in A-375 als auch in SK-Mel-28 ein durchschnittliches Silencing von 50-60% erzielt werden. Zudem kann anhand der Daten gefolgert werden, dass das von SCHIAVETTI postulierte *env*-Transkript von *HERV-K-MEL* tatsächlich gebildet wird. Die entworfenen siRNAs konnten daher alle in nachfolgenden Experimenten eingesetzt werden.

3.2.3.1 Mikroskopische Betrachtung morphologischer Veränderungen nach Silencing

Um zu untersuchen, ob ein Silencing von *HERV-K-MEL* zu morphologischen Änderungen der Zellen führt, wurden A-375 Zellen nach siRNA-Transfektion mikroskopisch betrachtet (Abbildung 3-12). Bei einem direkten Vergleich von unbehandelten und mit *HERV-K-MEL* siRNA transfizierten Zellen fiel auf, dass die transfizierten Zellen deutlich weniger Zellwachstum zeigten als die nicht behandelten. Außerdem kam es in einigen Zellen zu einer beginnenden Abrundung, was ein Hinweis auf einen zytopathischen Effekt (CPE) oder

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 87

beginnende Apoptose sein könnte. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen durch das Agens oder die Verwendung von siRNA induzierten Effekt handelte, wurde eine Scrambled-siRNA eingesetzt. Diese siRNA besteht anteilmäßig aus den gleichen Nukleotiden wie die im Experiment eingesetzte siRNA gegen das Zielgen, wurde jedoch in ihrer Sequenzfolge geändert. Zudem wurden die verwendeten Scrambled-siRNAs in einem Sequenzvergleich auf Komplementarität zu anderen bekannten Genen überprüft, um mögliche *Off-Target*-Effekte zu minimieren.

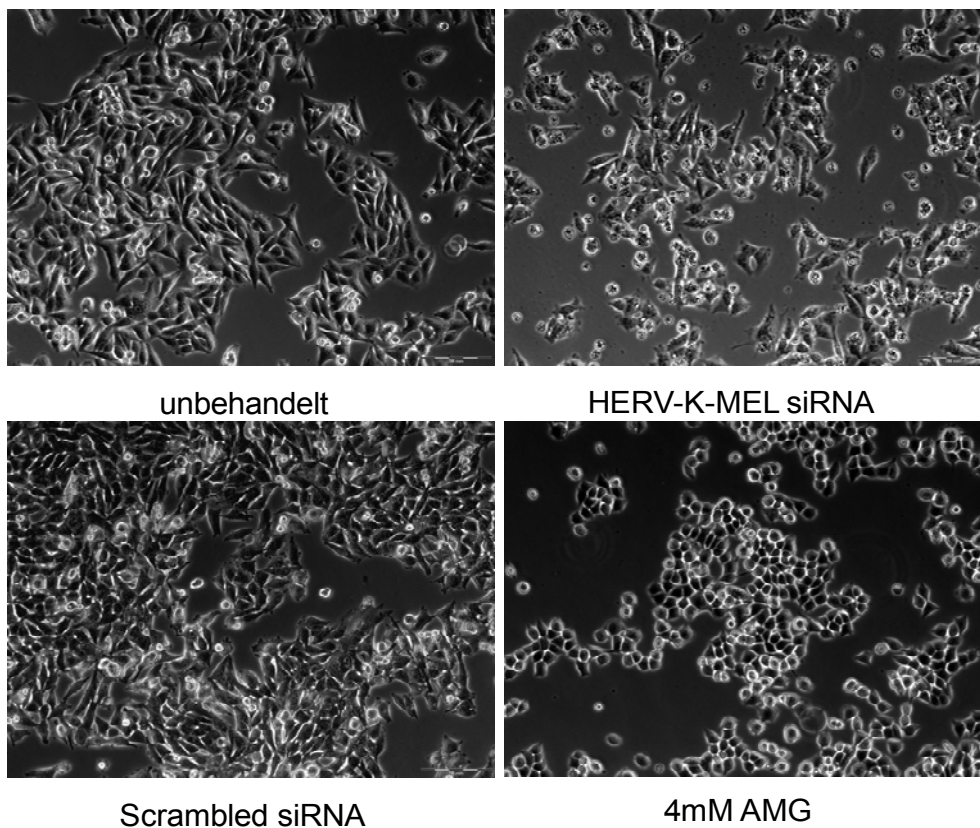


Abbildung 3-12: Mikroskopische Aufnahmen nach Transfektion bzw. AMG-Behandlung von A-375 (48 h p.t.). 400fach vergrößert.

In den mikroskopischen Aufnahmen war kein Unterschied zwischen den nicht-behandelten und den Scrambled-siRNA transfizierten Zellen auszumachen, so dass die geringere Wachstumsdichte nicht auf die Verwendung von Transfektionsagenzien oder das Einbringen von siRNAs zurückzuführen war. Neben den Auswirkungen einer siRNA-Transfektion wurde in diesem Experiment der Einfluss von Apoptose auf Morphologie und Wachstum der Melanomzellen untersucht. Dazu wurden die A-375 Zellen mit Aminoguanidin-

Hemisulfat (AMG) behandelt, indem Zellen in serumfreien Wachstumsmedium 4 mM AMG zugesetzt und bis zur Trypsinierung auf diesen belassen wurde. AMG ist ein iNOS-Inhibitor und bewirkt eine Reduktion von BCL2 auf Proteinebene. Daraufhin kommt es zu einer Induktion des intrinsischen Apoptoseweges (SALVUCCI *et al.*, 2001). In den mikroskopischen Aufnahmen war eine deutliche Abrundung der AMG-behandelten Melanomzellen zu beobachten. Im Vergleich mit der *HERV-K-MEL* siRNA transfizierten Probe traten die morphologischen Unterschiede besonders hervor. So sind zwar auch in den transfizierten Zellen vereinzelt, abgerundete Zellen zu entdecken, in der Deutlichkeit wie nach AMG-Behandlung traten diese aber nicht auf. Auffällig war jedoch die geringe Konfluenz beider Proben im Vergleich zu nicht behandelten und Scrambled-siRNA transfizierten Zellen. Diese Beobachtungen wurden im Verlauf der Arbeit mehrfach in unabhängigen Experimenten wiederholt, so dass hier nicht von einem zufälligen Ereignis gesprochen werden kann. Es wurde daher anhand der mikroskopischen Ergebnisse die Hypothese aufgestellt, dass es nach einem Silencing von *HERV-K-MEL* in Melanomzellen zu einer Inhibition des Zellwachstums kommt, die sich unter Umständen auf Apoptose zurückführen lassen könnte.

3.2.3.2 Bestimmung der Anzahl lebender und toter Zellen durch mikroskopische Zählung

Da das *HERV-K-MEL* Silencing mikroskopisch betrachtet einen Einfluss auf die Wachstumsdichte der Melanomzellen hatte (Abbildung 3-12), stellte sich die Frage, ob dies auch in einer verminderten Zellzahl und einer Veränderung des Verhältnisses von lebenden zu toten Zellen resultiert. Daher wurde eine Transfektion der Zelllinien A-375 und SK-Mel-28 im 24-Well-Format mit mehreren Replikaten (n=6) durchgeführt. 48 h p.t. wurden die Zellen trypsinisiert und nach Trypanblau-Färbung (1:1) von zwei Mitarbeitern ohne Kenntnis der Hypothese gezählt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch die Membran lebender Zellen zurückgehalten wird. Tote Zellen mit poröser Zellmembran sind für den Farbstoff permeabel und färben sich blau. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer konnte so die Gesamtzellzahl ermittelt und gleichzeitig die Zellen

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 89

auf ihre Vitalität geprüft werden. Die Ergebnisse dieser Zählungen sind in Abbildung 3-13 dargestellt.

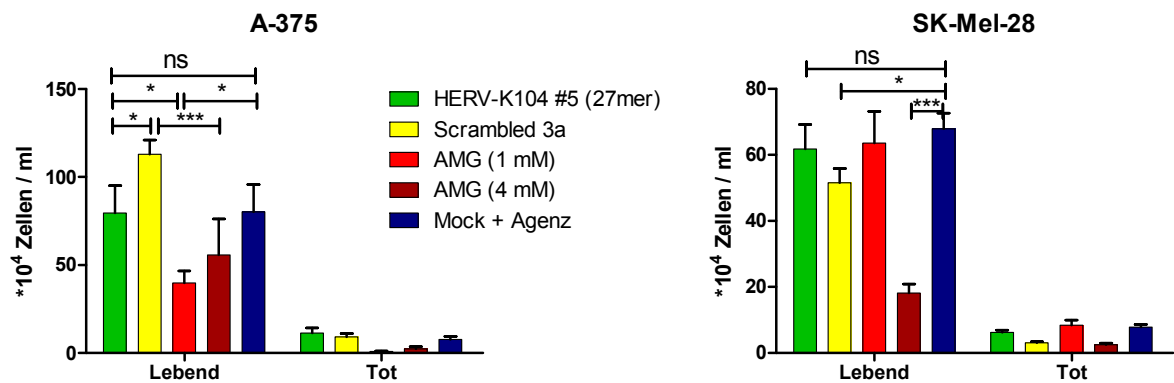


Abbildung 3-13: Veränderungen der Zellzahlen nach Transfektion bzw. AMG-Behandlung von Melanomzellen. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte über Zählung in einer Neubauer-Zählkammer nach Trypanblau-Färbung. n=6 (\pm SEM); Signifikanztest: One-Way ANOVA (ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Anhand der Zählungen konnte geschlossen werden, dass die Transfektion einer gegen *HERV-K-MEL* gerichteten siRNA zu keiner signifikanten Verminderung der Zellzahl sowohl bei A-375 als auch bei SK-Mel-28 führte. Der Einsatz von AMG resultierte jedoch in einer signifikanten Reduktion der Zellzahlen in beiden Zelllinien. Bei der Anzahl toter Zellen waren keine Veränderungen in Abhängigkeit der Behandlung der Zellen auszumachen. So hat die Gabe von AMG mikroskopisch zwar einen deutlichen morphologischen Effekt bewirkt, dieser war jedoch anhand des Verhältnisses lebender zu toter Zellen nicht messbar. Da selbst die Verwendung von AMG, das als Positivkontrolle für apoptotische Zellen eingesetzt wurde, in der mikroskopischen Zellzählung zu keinem erhöhten Auftreten toter Zellen führte, wurde die Durchflusszytometrie zur Messung von Apoptose eingesetzt.

3.2.3.3 Durchflusszytometrische Analyse der transfizierten Melanomzellen

Da sich anhand der verwendeten Apoptose-Kontrolle zeigte, dass eine zuverlässige Aussage über apoptotische Zellen mit Hilfe der zuvor durchgeführten mikroskopischen Zellzählung nicht möglich war, sollte diese nun durch eine Annexin V-FITC / 7-AAD-Färbung im FACS nachgewiesen werden. Dazu wurden neben den AMG-behandelten auch die transfizierten Zellen 48 h

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 90

p.t. trypsiniert und mit beiden Farbstoffen gefärbt. Spätapoptotische Zellen sollten im FACS als doppelt positiv auftreten, frühapoptotische als Annexin V-positiv (FITC-Kanal), 7-AAD negativ (PerCP-Cy55-Kanal).

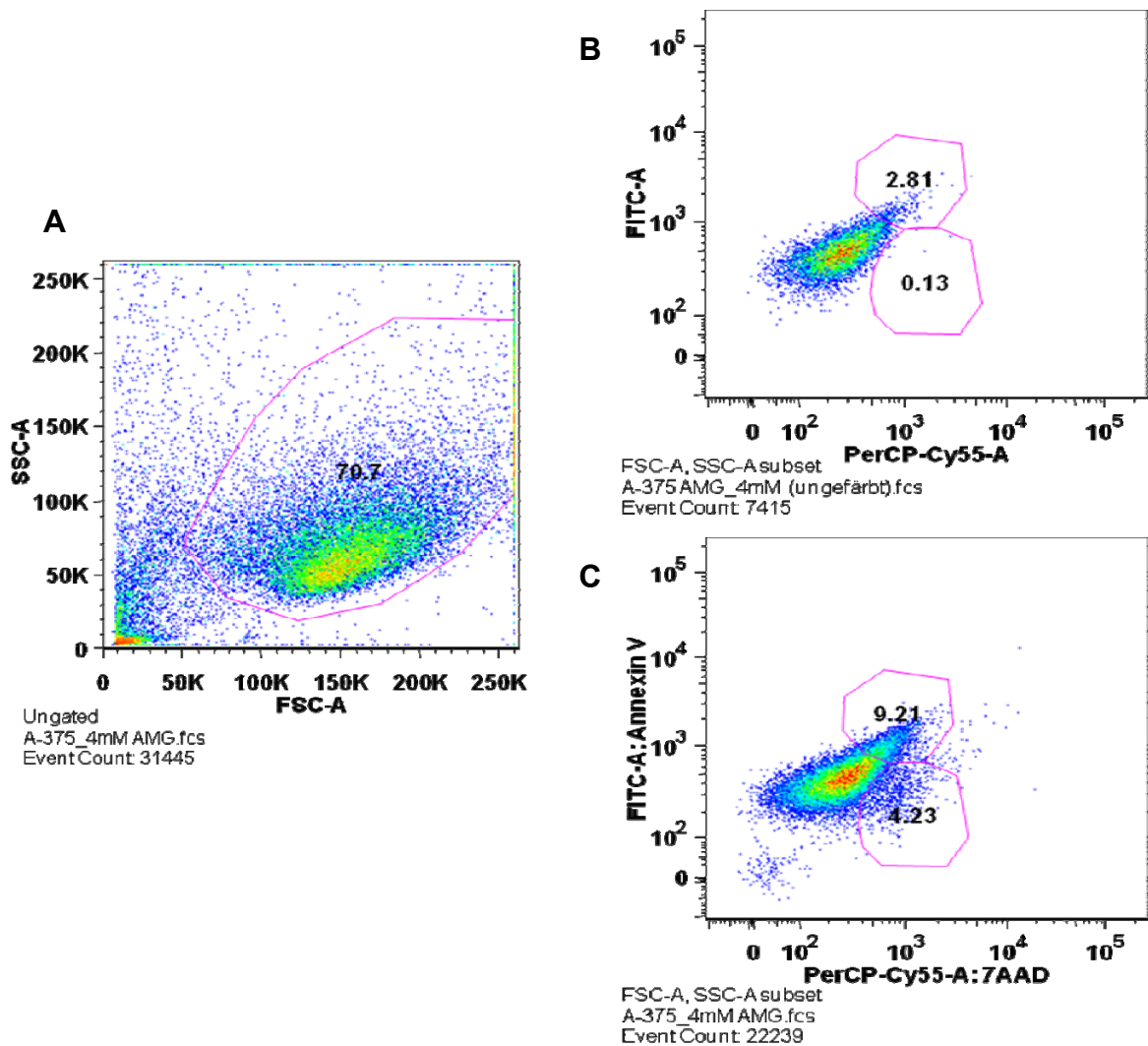


Abbildung 3-14: FACS-Analyse von A-375-Zellen, die für 48 h mit 4 mM AMG behandelt wurden. (A) FSC/SSC-Messung. (B) ungefärbte Probe. (C) Messung der mit Annexin V-FITC und 7-AAD gefärbten Zellen.

In Abbildung 3-14 sind exemplarisch grafische Auswertungen der FACS-Analyse AMG-behandelter Zellen gezeigt. Unter Abbildung 3-14 A ist die FSC/SSC-Messung zur Bestimmung der Größe und Granularität der Zellen zu sehen. Abbildung 3-14 B zeigt die Analyse einer ungefärbten Probe im FITC- und PerCP-Cy5-Kanal. Die zuvor nach Kompensation und Messung von

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 91

Kontrollen festgelegten Populationsgrenzen zeigten eine kleine Zellpopulation von etwa 2,8 %, die obwohl nicht behandelt als doppelt positiv und somit apoptotisch erschienen. Nach Färbung mit Annexin V und 7-AAD ist diese Population deutlich größer und 9,2 % der Zellen können als apoptotisch definiert werden. Diese Werte für AMG-behandelte Zellen korrelieren mit den von SALVUCCI publizierten Ergebnissen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass der Apoptosenachweis mittels der Doppelfärbung in der verwendeten Zelllinie A-375 möglich war.

Bei der Messung der mit siRNA-transfizierten Proben war eine Auswertung der Annexin V / 7-AAD-Populationen jedoch nicht erfolgreich. Zum Einen waren in vielen Fällen sehr wenige Zellen im Vergleich zu den nicht-transfizierten Proben vorhanden, zum Anderen konnten die Populationen nicht differenziert betrachtet werden. Daher war es nicht möglich, den Einfluss eines *HERV-K-MEL* Silencings auf die Apoptose in A-375 Zellen durchflusszytometrisch zu bestimmen. Auch die zweite Melanomzelllinie SK-Mel-28 konnte nach Transfektion mit dieser Methode nicht untersucht werden. Es wird vermutet, dass es sich entweder bei dem durch *HERV-K-MEL* Silencing hervorgerufenen Effekt nicht um Apoptose handelte oder der Marker in Verbindung mit zuvor erfolgter Behandlung der Zellen mit Transfektionsagenz nicht geeignet war.

3.2.3.4 Wechselwiderstandsanalyse transfizierter Melanomzellen

Mit der durchflusszytometrischen Analyse konnte kein Hinweis auf eine potenzielle Apoptoseinduktion durch *HERV-K-MEL* Silencing erhalten werden. Daher sollte der Einfluss der Expressionsreduktion auf das Zellwachstum mit Messungen des Wechselwiderstands (Impedanz) untersucht werden. Mit dieser Methode ist es möglich, Veränderungen der Zellen in Echtzeit zu bestimmen ohne diese durch analytische Vorgänge zu beeinflussen.

Die Impedanz-Veränderungen der Melanomzellen nach Transfektion wurden mit dem Xcelligence-Monitoring der Firma Roche gemessen. Dazu wurden wie unter 2.5.3 beschrieben Zellen auf einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät, die auf ihrer Oberfläche mit Goldelektroden beschichtet war. Zunächst wurden auch in diesem Experiment die Transfektionsbedingungen wie einzusetzende Zellzahl und Transfektionszeitpunkt optimiert. Die ideale Menge ausgesäter

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 92

Zellen lag bei 1×10^4 Zellen pro Vertiefung. Die Transfektion erfolgte bei einem Zellindex (CI) von etwa 0,5 - 0,8 (ca. 48 h nach Aussäen der Zellen), da sich zu diesem Zeitpunkt die Zellen in der Wachstumsphase befanden. Kinetische Messungen zeigten, dass die siRNA zu diesem Transfektionszeitpunkt den größten Einfluss auf die Zellen hatte (nicht gezeigt). Daraufhin wurden mehrere Ansätze unter diesen optimierten Bedingungen durchgeführt. In Abbildung 3-15 sind exemplarisch zwei Verläufe gezeigt.

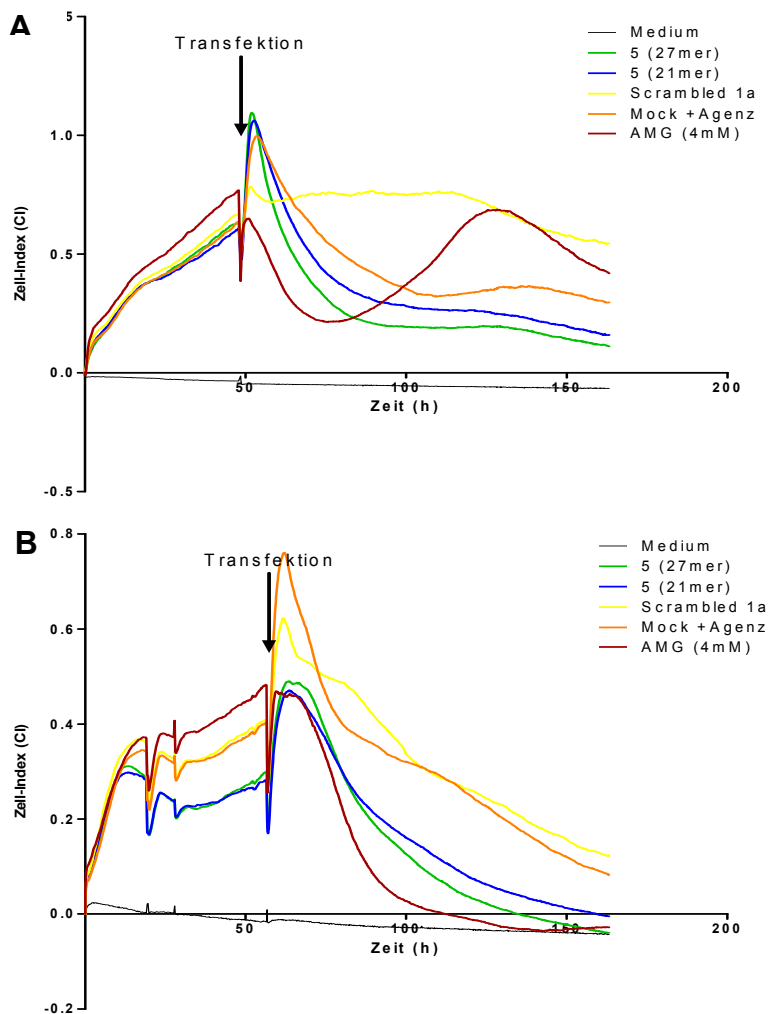


Abbildung 3-15: Impedanz-Messung von zwei unabhängigen Transfektionen auf SK-Mel-28. Ausgesät wurden 1×10^4 Zellen pro Vertiefung. Die Transfektion erfolgte 48 h nach Zellaussaat. Als Positivkontrolle für Apoptose wurde 4 mM AMG eingesetzt. Der Zellindex (CI) ist ein Maß für die Impedanz. Die Messung wurde im Institut für Virologie, Uniklinikum Göttingen durchgeführt. n=3.

In Abbildung 3-15 A ist der Einfluss der gegen *HERV-K-MEL* gerichteten siRNAs auf das Wachstum der verwendeten SK-Mel-28 Zellen deutlich

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 93

erkennbar. Sowohl die 21- als auch die 27mer siRNA führte bereits wenige Stunden nach Transfektion zu einem starken Einbruch des Zellindex, der ein Maß für die Impedanz ist. Dies wies auf ein Absterben oder zumindest auf morphologische Änderungen der Zellen hin. Im Vergleich mit der Scrambled-siRNA transfizierten Probe wurde deutlich, dass dieser Effekt nicht vom Transfektionsagens verursacht wurde. Dem widerspricht jedoch der Verlauf des Zellindex der leer transfizierten Probe (Mock + Agenz). Hierbei war ein fast ebenso starker Einfluss wie bei Verwendung der zielgerichteten siRNAs zu beobachten. Daher wurde der beobachtete Effekt wohl nicht durch das *HERV-K-MEL* Silencing hervorgerufen. Zudem zeigte sich in der Positivkontrolle, bei der eine Behandlung mit AMG erfolgte, ein gänzlich anderer Verlauf als in den transfizierten Proben. So kam es im Anschluss an die Reduktion des Zellindex zu einem erneuten Anstieg. Inwieweit dies ein neuerliches Zellwachstum anzeigt, ist nicht bekannt.

In Abbildung 3-15 B ist wie schon im vorherigen Experiment ein Einfluss des *HERV-K-MEL* Silencings auf den Zellindex sichtbar. So kommt es wenige Stunden nach Transfektion zu einer Abnahme, die offensichtlich auf die Transfektion zurückzuführen war. In dieser Messung war jedoch der Effekt der leer transfizierten Zellen nicht so stark ausgeprägt wie zuvor. Auch die zweite Negativkontrolle (Scrambled-siRNA) zeigte einen weniger starken Einfluss auf den Zellindex. Der Verlauf der Positivkontrolle AMG entsprach hier eher dem der *HERV-K-MEL* siRNA-transfizierten Zellen.

Aufgrund der beiden abgebildeten und der weiteren durchgeführten Messungen, die trotz gleichbleibender Reaktionsbedingungen alle ein sehr heterogenes Bild zeigten, konnte durch die Impedanzanalyse keine definitive Aussage über durch Transfektion induzierte Prozesse in den Melanomzellen getroffen werden. Es ist jedoch sicher, dass der alleinige Vorgang der Transfektion schon einen Einfluss auf den Zellindex hatte. Inwieweit eine Unterscheidung von Apoptose und „einfachen“ morphologischen Veränderungen anhand der Messwerte möglich sein soll, wie es von der Herstellerfirma beworben wird, konnte nicht festgestellt werden.

3.2.3.5 Bestimmung der *Bcl2*-Expression nach *HERV-K-MEL* Silencing

Da es mit den genannten Methoden nicht möglich war, den Effekt eines *HERV-K-MEL* Silencings auf eine potenzielle Apoptoseinduktion genauer zu charakterisieren, wurden weitere Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt. Dazu wurde die *Bcl2*-Expression analysiert. Dieses Gen wurde gewählt, da es innerhalb des intrinsischen, mitochondrialen Apoptoseweges gleich an mehreren Stellen regulierend wirkt (Abbildung 3-16). Eine Analyse ermöglicht so eine schnelle und dennoch relativ umfassende Betrachtung mehrerer potentiell betroffener Signalwege.

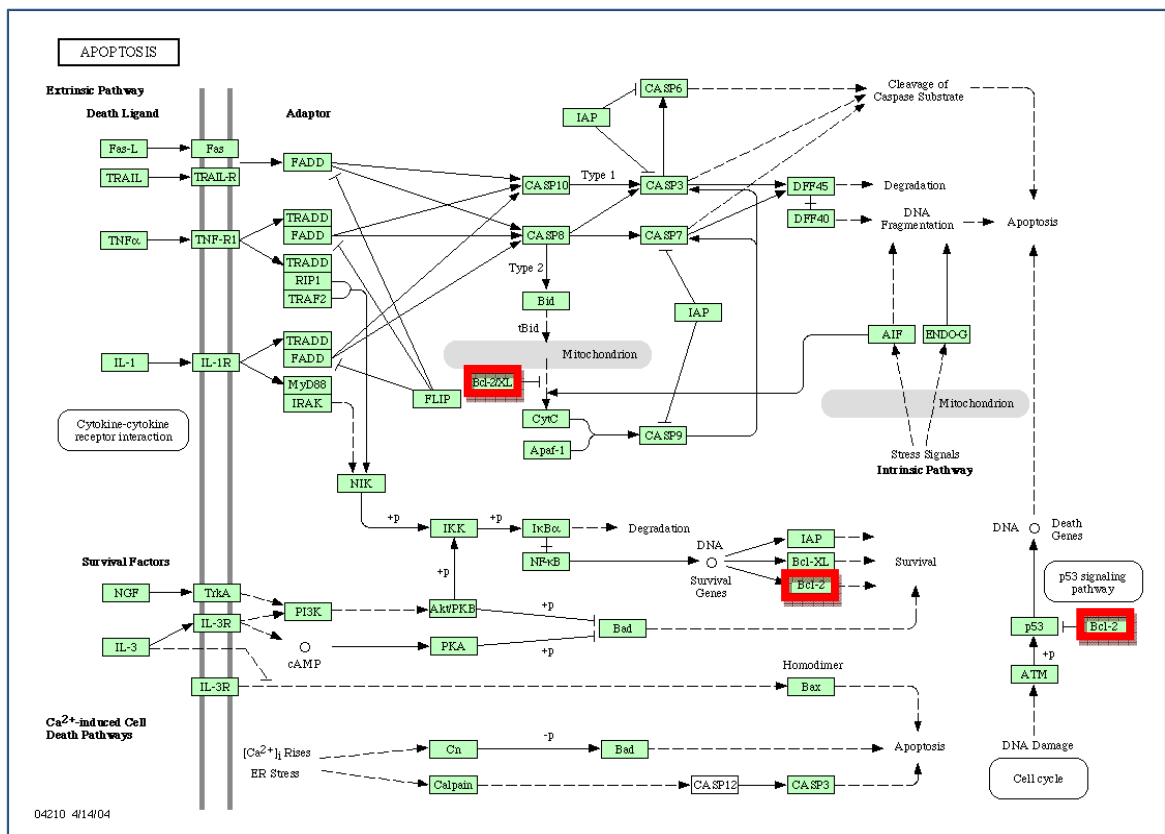


Abbildung 3-16: Schematische Übersicht der Apoptosewege. In Rot sind die Positionen gekennzeichnet, an denen Bcl2 eingreift. Quelle: KEGG.

Um zu untersuchen, ob ein *HERV-K-MEL* Silencing in den verwendeten Melanomzellen einen Einfluss auf die Transkription von *Bcl2* hat, wurden die Proben vorheriger Transfektionen, bei denen zuvor lediglich *HERV-K-MEL* analysiert wurde, auch auf ihre *Bcl2*-Expression geprüft (Abbildung 3-17).

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 95

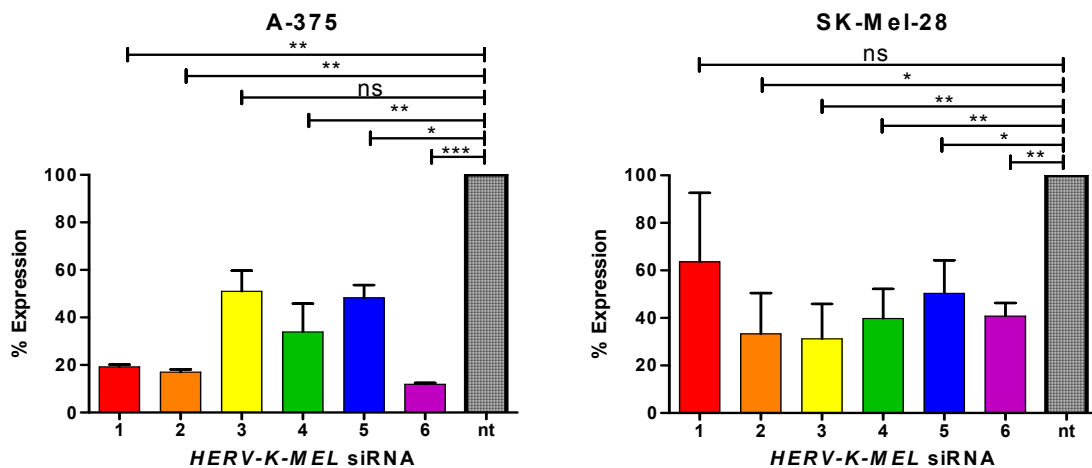


Abbildung 3-17: Relative Quantifizierung der *Bcl2*-Expression nach Transfektion mit verschiedenen siRNAs gegen *HERV-K-MEL* mittels qRT-PCR. Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH*, die Verrechnung der Werte gegen nichttransfizierte Zellen (nt). n=10 (\pm SEM); Signifikanztest: One-Way ANOVA (ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Anhand der Ergebnisse der Expressionsmessungen in beiden Zelllinien wird deutlich, dass ein Silencing von *HERV-K-MEL* auch eine fast ausnahmslos signifikante Reduktion der *Bcl2*-Expression bewirkte.

Auffällig war dabei, dass in A-375 die *HERV-K-MEL* siRNAs Nr. 3 und 5 zu einer weniger deutlichen verminderten Expression von *Bcl2* führten. Auch in der zweiten Melanomzelllinie SK-Mel-28 traten Unterschiede in der Stärke der Regulation in Abhängigkeit von der Lage der *HERV-K-MEL* siRNAs auf. So war der geringste Effekt bei Verwendung der siRNA Nr. 1 zu beobachten. Auch die siRNA Nr. 5 führte erneut zu einer geringeren Regulation. Die genannten siRNAs Nr.1, 3 und 5 liegen alle in unmittelbarer Nähe des viralen *envs* (Abbildung 3-10). Inwieweit es einen Zusammenhang zwischen der potentiellen Transaktivierung von *Bcl2* und *HERV-K-MEL* gibt, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.

Zur weiteren Charakterisierung und Verifizierung der Korrelation von *Bcl2* und *HERV-K-MEL* wurden im Verlauf dieser Arbeit zahlreiche siRNA-Experimente in den beiden Melanomzelllinien SK-Mel-28 und A-375 durchgeführt. Jeweils 48 h nach Transfektion wurde RNA aus den transfizierten Zellen isoliert und nach cDNA-Synthese in eine qRT-PCR eingesetzt (Abbildung 3-18). Dabei wurde nicht nur die Expression von *HERV-K-MEL* gemessen, sondern auch die *Bcl2*-Expression, um die zuvor beobachtete Korrelation dieser beiden Gene

3.2 Analyse von *HERV-K-MEL* und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 96

bestätigen zu können. Aufgeführt ist jeweils die relative Expression nach Verwendung einer gegen *HERV-K-MEL*-gerichteten und einer Scrambled-siRNA im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen, wobei hier nicht zwischen den einzelnen siRNAs und den Transfektionsagenzien unterschieden wurde. Die Expression wurde jeweils gegen *GAPDH* normalisiert. Die Daten wurden nur dann ausgewertet, wenn das *HERV-K-MEL* Silencing über 33% betrug.

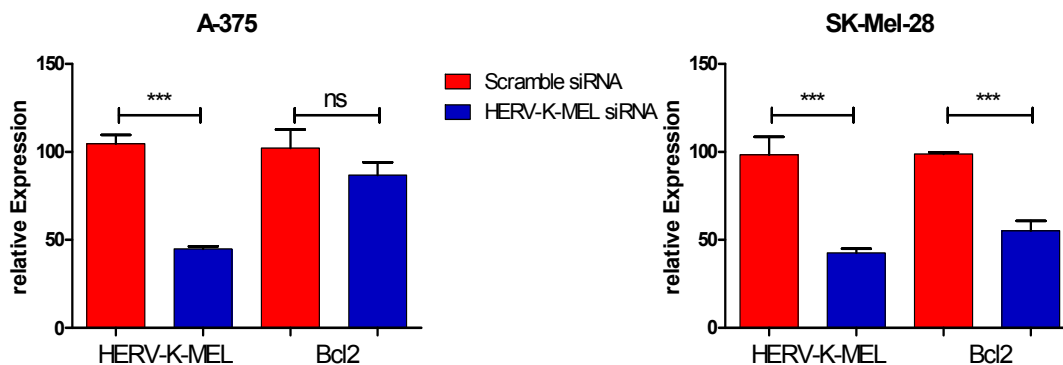


Abbildung 3-18: Relative Quantifizierung der Expression in den Melanomzelllinien nach *HERV-K-MEL* Silencing mittels qRT-PCR. Gemessen wurde die Expression von *HERV-K-MEL* und *Bcl2* 48 h p.t. Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH*. Als Referenzwert diente die Expression in nichttransfizierten Zellen. Es erfolgte keine Unterscheidung der Transfektionsagenzien oder der Lage der siRNAs. Die Anzahl der Wiederholungen betrug für A-375: n=91; für SK-Mel-28: n=55 (jeweils \pm SEM; One-Way ANOVA; ns: nicht signifikant; ***: $p < 0,001$).

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Silencing von *HERV-K-MEL* in der Melanomzelllinie A-375 keine signifikante Reduktion der *Bcl2*-Expression zur Folge hatte, obwohl das die in Abbildung 3-17 gezeigten Daten vermuten ließen. Der Stichprobenumfang der in Abbildung 3-18 berücksichtigten Messungen war jedoch deutlich größer. Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse der Zelllinie SK-Mel-28 wie auch in Abbildung 3-17, dass ein *HERV-K-MEL*-Silencing zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,0001$) der *Bcl2*-Expression führte. Somit kann aus dieser Genexpressionsanalyse geschlossen werden, dass eine Korrelation zwischen *HERV-K-MEL* und *Bcl2* in der Melanomzelllinie SK-Mel-28 besteht. Für die zweite hier untersuchte Zelllinie A-375 konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht signifikant gezeigt werden.

3.2.3.6 Bestimmung der *HERV-K-MEL* Expression nach *Bcl2*-Silencing

Da die vorherigen Untersuchungen ergaben, dass ein *HERV-K-MEL* Silencing zu einer Regulation von *Bcl2* führt, wurde in nachfolgenden Experimenten geprüft, ob dieser Effekt auch *vice versa* zu messen ist. Daher wurden Transfektionen mit gegen *Bcl2*-gerichteten siRNAs durchgeführt. Die dabei verwendeten Transfektionsprotokolle entsprachen exakt denen der *HERV-K-MEL* siRNAs. So wurde auch hier nach einer RNA-Isolation und cDNA-Synthese 48 h p.t. die Expression mit einer qRT-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-19 dargestellt.

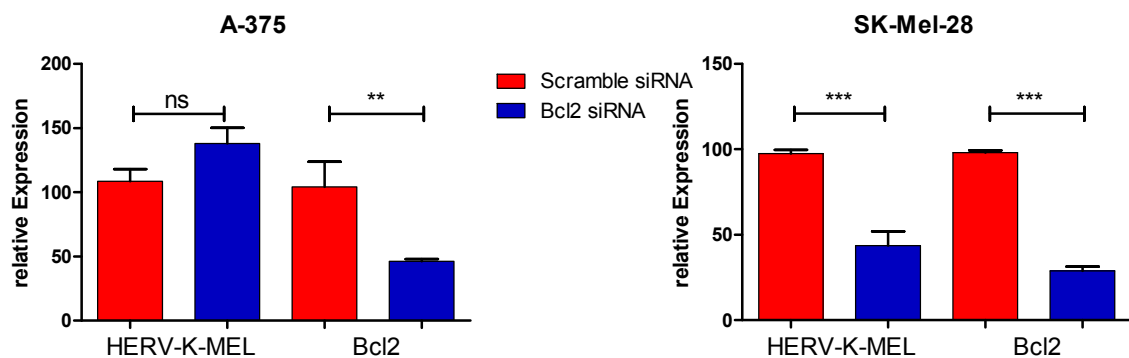


Abbildung 3-19: Relative Quantifizierung der Expression in den Melanomzelllinien nach *Bcl2*-Silencing mittels qRT-PCR. Gemessen wurde die Expression von *HERV-K-MEL* und *Bcl2* 48 h p.t. Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH*. Als Referenzwert diente die Expression in nichttransfizierten Zellen. Es erfolgte keine Unterscheidung der Transfektionsagenzien oder der Lage der siRNAs. Die Anzahl der Wiederholungen betrug für A-375: n=91; für SK-Mel-28: n=55 (jeweils \pm SEM; One-Way ANOVA; ns: nicht signifikant; **: p<0,01; ***: p<0,001).

Wie schon bei der Verwendung der *HERV-K-MEL* siRNAs zeigte sich auch bei Verwendung der *Bcl2*-siRNAs eine Abhängigkeit der Genregulation in der Melanomzelllinie SK-Mel-28. So führte ein Silencing von *Bcl2* auch zu einer signifikanten Reduktion von *HERV-K-MEL* (p<0,001). Bei Transfektion der zweiten Zelllinie A-375 konnte diese Korrelation nicht beobachtet werden. Daher wurden keine weiteren Untersuchungen der Zelllinie A-375 vorgenommen.

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten 99

eine Rolle spielt. Es ist eines der zahlreichen antiapoptotischen Proteine der Bcl2-Familie und wird mit dem Überleben von Krebszellen in Verbindung gebracht.

Bei BAD (Bcl2-antagonist of cell death) handelt es sich um ein Protein der Bcl2-Familie, das in der naiven, dephosphorylierten Form proapoptotisch, phosphoryliert jedoch antiapoptotisch wirkt. Die dephosphorylierte Form bildet mit BCL2 und BCL-XL ein Heterodimer, was eine Inaktivierung der beiden gebundenen Proteine und eine Induktion der BAX/BAK-getriggerten Apoptose zur Folge hat. Die Phosphorylierung von BAD durch die Proteinkinase B, die in einem Signalweg durch PI3-Kinase initiiert wird, führt zur Formierung eines BAD-(14-3-3)-Protein Heterodimer, so dass BCL2 nicht mehr gebunden werden und die BAX-induzierte Apoptose inhibieren kann (YANG *et al.*, 1995).

BAX (Bcl2-associated X protein) ist ebenfalls ein proapoptotisch wirkendes Mitglied der Bcl2-Familie. In gesunden Säugetierzellen kann der Großteil an BAX im Zytosol gefunden werden. Nach Initiierung des Apoptose-Signalweges kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins und einer Anlagerung in den Membranen verschiedener Zellorganellen, vornehmlich denen der äußeren Mitochondrienmembran. Es wird vermutet, dass es nach Interaktionen mit anderen Proteinen zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membran kommt, was zur Aktivierung von diversen Caspasen führt (OLTVAI *et al.*, 1993). Die Expression von BAX wird zudem durch das Tumorsuppressorprotein TP53 hochreguliert und ist an der durch dieses Protein vermittelten Apoptose beteiligt. Das TP53-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der als Teil der zellulären Stressantwort aktiviert wird und daraufhin eine Vielzahl an Zielgenen reguliert. Es ist ein Regulator des Zellzyklus und hat tumorsupprimierende Wirkung, da es durch die Inhibition genomischer Mutationen die Entstehung von Krebs verhindern kann (KERN *et al.*, 1991).

Die asparaginsäure-spezifische Protease Caspase 9 ist ebenfalls am intrinsischen Weg der Apoptose beteiligt. Sie wird während der Apoptose durch den JNK/SAPK-Signalweg und der damit verbundenen mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom c und Aktivierung von APAF-1 (Apoptosom) von der proenzymatischen Form in die aktive Form überführt. Nach der Initiation spaltet Caspase 9 die Procaspasen 3 und 7, die wiederum zur Spaltung

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten100

mehrerer zellulärer Proteine und somit zur Apoptose führen (EARNSHAW *et al.*, 1999).

Neben Caspase 9 wirkt auch Caspase 8 durch proteolytische Spaltung aktivierend auf die Procaspase 3. Bei der Caspase 8 handelt sich um ein Protein, das durch den FAS-induzierten Signalweg und andere apoptotische Stimuli aktiviert wird. Es besitzt N-terminal eine FADD-ähnliche Effektor-domäne, die darauf schließen lässt, dass es zu einer Interaktion mit dem Protein FADD kommt (COHEN, 1997). Somit handelt es sich hierbei um ein Protein, das im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Proteinen ausschließlich am extrinsischen Weg der Apoptose beteiligt ist.

Das letzte ausgewählte Protein ist NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), ein Proteinkomplex, der als Transkriptionsfaktor agiert. Es kann in fast jedem animalen Zelltyp gefunden werden und ist an den zellulären Antworten auf äußere Stimuli wie Stress, freie Radikale, UV-Bestrahlung, viralen und bakteriellen Antigenen sowie Cytokinen beteiligt. NF- κ B nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Immunantwort ein. Eine Fehlregulation dieses Proteins wird häufig in Zusammenhang mit Krebs, Autoimmunerkrankheiten und anderen Störungen des Immunsystems beschrieben (GILMORE, 2006).

Bevor die Expression dieser Gene in transfizierten Melanomzellen betrachtet wurde, wurde zunächst auch hier die endogene Expression in den verschiedenen Zelllinien bestimmt (Abbildung 3-21). Die Messdaten wurden gegen *GAPDH* normalisiert.

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten¹⁰¹

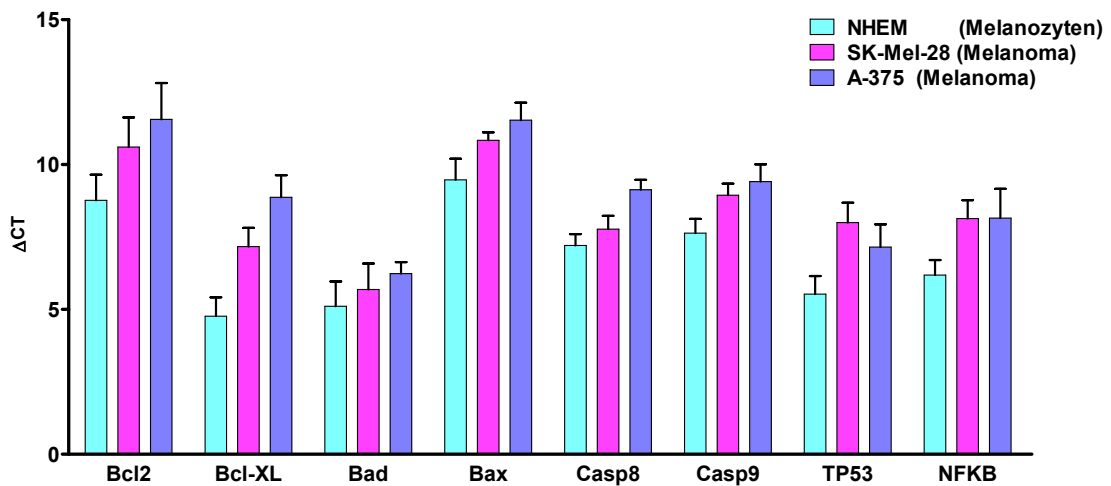


Abbildung 3-21: Expressionsanalyse ausgewählter Apoptosegene in den verschiedenen Zelllinien. Die Bestimmung der Expression erfolgte mittels qRT-PCR. Die Normalisierung wurde gegen *GAPDH* vorgenommen. $n=4$ (\pm SEM).

Wie anhand der endogenen Expressionsprofile der verschiedenen Zelllinien deutlich wird, sind sämtliche apoptoseassoziierten Gene in den Melanozyten hochreguliert. Dies widerspricht jedoch der Erwartung, wonach zumindest die antiapoptotischen Gene *Bcl2* und *Bcl-XL* geringer in den nicht transformierten Zellen vorliegen sollten. Für weiterführende Aussagen müssen jedoch zusätzliche Zelllinien untersucht werden.

.

3.2.3.8 Expression ausgewählter apoptoseassoziiierter Gene in SK-Mel-28 nach siRNA-Silencing

Nach Messung der endogenen Expression der ausgewählten Apoptosegene in den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurde untersucht, ob diese nach einer Transfektion mit siRNAs gegen *HERV-K-MEL* und *Bcl2* in SK-Mel-28 Zellen beeinflusst werden. Dazu wurden die RNAs mehrerer Transfektionsexperimente mit einer qRT-PCR untersucht (Abbildung 3-22). Die Messwerte wurden gegen *GAPDH* normalisiert.

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten102

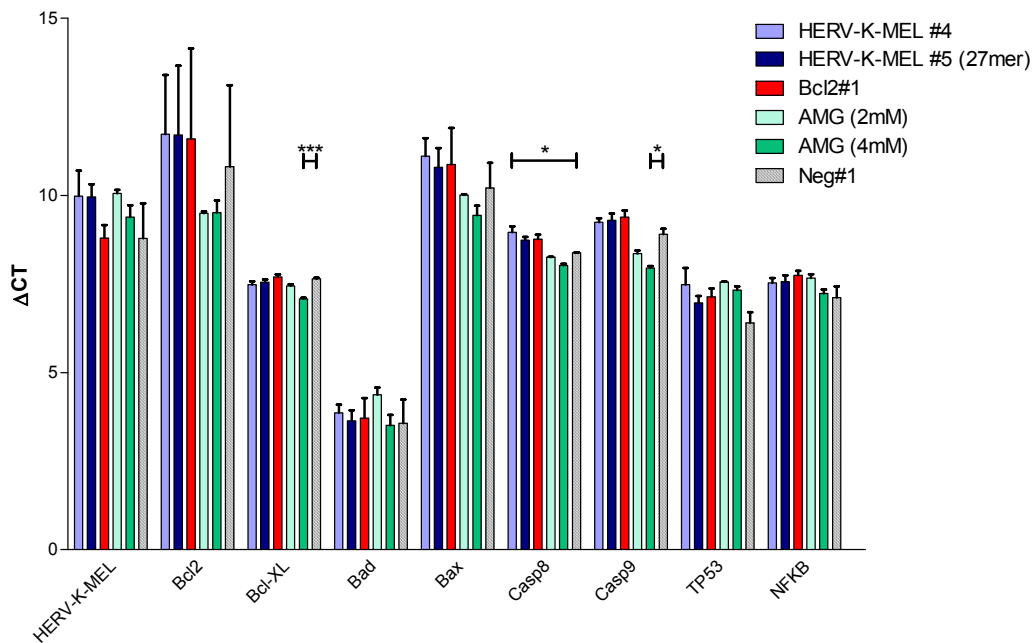


Abbildung 3-22: Expression ausgewählter Apoptosegene nach Silencing in SK-Mel-28. Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH*. n=3 (\pm SEM); Signifikanztest: One-Way ANOVA (ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

Bei der Verwendung von *HERV-K-MEL* siRNAs wurden sehr ähnlichen Expressionsmuster gefunden. Daher wurde in der folgenden Beschreibung nicht mehr nach siRNA Nr. 4 und 5 unterschieden, es sei denn, es wird explizit darauf verwiesen. Die aufgeführten Vergleiche der Expressionshöhen beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf die Ergebnisse der Transfektion mit einer nicht zielgerichteten siRNA (Neg#1).

Der Expressionsverlauf nach Transfektion mit *HERV-K-MEL* siRNA konnte die Ergebnisse der bisherigen Messungen bestätigen. Danach reguliert ein *HERV-K-MEL* Silencing nicht nur das Zielgen, sondern auch die *Bcl2*-Expression. Die Verwendung der gegen *Bcl2*-gerichteten siRNA (*Bcl2*#1) führte in den untersuchten Proben zwar zu einem Silencing des Zielgens, die *HERV-K-MEL* Expression veränderte sich im Vergleich zu den mit der Negativ-siRNA (Neg#1) transfizierten Zellen kaum. Jedoch konnte anhand der vorherigen Untersuchungen mit einem größeren Probenumfang eine signifikante Korrelation gezeigt werden (Abbildung 3-19). Die Behandlung der Zellen mit der apoptoseinduzierenden Chemikalie AMG führte zu einer Reduktion der *HERV-K-MEL* Expression, allerdings auch zu einer Erhöhung der *Bcl2*-Expression,

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten¹⁰³

was der Apoptose normalerweise entgegen wirken sollte. Bei der Untersuchung der *Bcl-XL*-Expression war dieser Effekt ebenfalls zu beobachten. Die Erhöhung von *Bcl-XL* ist bei Verwendung von 4 mM AMG sogar signifikant ($p < 0,001$), obwohl das Gen genau wie *Bcl2* aufgrund der Induktion der Apoptose vermindert transkribiert werden müsste. Mit diesen Ergebnissen korreliert die Beobachtung, dass es mit 2 mM AMG zu einer verminderten Expression des *Bcl2*-Antagonisten *Bad* kam. Jedoch konnte auch eine erhöhte Expression des proapoptotischen *Bcl2*-assoziierten *Bax* gemessen werden, was wiederum für die Induktion von Apoptose spricht.

Einen Einfluss der Transfektion auf *Bcl-XL* und *Bad* konnte man weder für die *HERV-K-MEL* noch für die *Bcl2*-spezifischen siRNAs beobachten. Die *Bax*-Expression hingegen wurde von diesen siRNAs inhibiert. Zudem kommt es bei der Verwendung der zielgerichteten siRNAs zu einer Verminderung der *Caspase 8* Expression, die für die *HERV-K-MEL* siRNA Nr. 4 sogar signifikant ist ($p < 0,05$). Der Einfluss der AMG-Behandlung auf die *Caspase 8* Expression hingegen war sehr gering. Jedoch konnte eine signifikante Hochregulation der *Caspase 9* unter der Gabe von 4 mM AMG beobachtet werden ($p < 0,05$). Die Transfektion spezifischer siRNAs führte zu einer Inhibition des Gens.

Bei der Analyse der *TP53*-Expression zeigte sich, dass sowohl die Transfektion als auch die Behandlung mit AMG zu einer Reduktion der Transkriptbildung führen. Auf die Expression von *NF- κ B* haben beide Methoden nur einen sehr geringen regulatorischen Einfluss.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Messungen ist in Tabelle 3-2 aufgeführt. Mit + ist dabei jeweils eine Expressionssteigerung, mit – eine Regulation angedeutet. Die Transfektionen von *Bcl2*- und *HERV-K-MEL* siRNAs verursachten in den untersuchten SK-Mel-28 Zellen nahezu gleiche Effekte. Es kann daher gefolgert werden, dass die *HERV-K-MEL* und *Bcl2*-siRNAs an gleichen Positionen des Apoptoseweges regulierend wirkten.

Eine AMG-Behandlung hingegen führt zu einem abweichenden Expressionsprofil, obwohl die Chemikalie laut SALVUCCI (2002) ein iNOS-Inhibitor ist, der *Bcl2* inhibiert und so Apoptose induziert. In der Diskussion wird versucht, die Zusammenhänge genauer aufzuklären.

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten104

Tabelle 3-2: Übersicht der Expressionsveränderungen ausgewählter apoptoseassoziiierter Gene nach Transfektion bzw. Behandlung mit AMG in SK-Mel-28. * zeigt die Signifikanz.

Gen	siRNA		AMG behandelt
	HERV-K-MEL	Bcl2	
Bcl2	-	-	+
Bcl-XL	±	±	+***
Bad	±	±	±/-
Bax	-	-	+
Caspase 8	-*	-	+
Caspase 9	-	-	+*
TP53	-	-	-
NF-κB	±	±	±

Zusammenfassend kann man aus den RNAi-Experimenten und Analysen schließen, dass ein *HERV-K-MEL* Silencing in den beiden untersuchten Melanomzelllinien einen mikroskopisch sichtbaren Einfluss auf die Wachstumsdichte der Zellen hatte. Die dabei auftretenden Effekte waren in gewissem Maße vergleichbar mit den Auswirkungen einer Zellbehandlung mit der apoptoseinduzierenden Chemikalie AMG. Zudem konnte in der humanen Melanomzelllinie SK-Mel-28 gezeigt werden, dass ein *HERV-K-MEL* Silencing zu einer signifikanten Reduktion der *Bcl2*-Expression führt. Umgekehrt hat auch ein *Bcl2*-Silencing eine signifikante Expressionsreduktion von *HERV-K-MEL* zur Folge.

Für die zweite verwendete humane Melanomzelllinie A-375 konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden. Ein *HERV-K-MEL* Silencing führt in diesen Zellen nicht zu einer signifikanten Reduktion der *Bcl2*-Expression. Auch ein gezieltes Silencing von *Bcl2* führte nicht zu einer Inhibition von *HERV-K-MEL*.

Die posttransfektionelle Analyse ausgewählter apoptoseassoziiierter Gene mittels qRT-PCR zeigte, dass eine Reduktion der *HERV-K-MEL* Expression zu vergleichbaren Expressionsmustern wie die einer spezifischen Inhibition von

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten105

Bcl2 führt. Die Verwendung der apoptoseinduzierenden Chemikalie AMG führte jedoch zu abweichenden Expressionsmustern, so dass angenommen werden kann, dass es hierbei zu einer Inhibition eines anderen Signalweges der Apoptose kommen muss.

3.2.3.9 Transduktion von Melanomzellen mit adenoviralen shRNA-Vektoren

Wie sich im Verlauf der Experimente herausstellte, hatte die lipid-basierte siRNA-Transfektion auch ohne den Einsatz von siRNAs einen Einfluss auf die transfizierten Melanomzellen (3.2.3.3; 3.2.3.4). Zudem war dieses System sehr störanfällig und wenig robust. Daher wurde nach Alternativen gesucht, um nach Möglichkeit eine zuverlässige Regulation der Genexpression zu erlangen. So wurde die Herstellung adenoviraler shRNA-Vektoren bei der Firma Sirion in Auftrag gegeben, die ein Silencing der Zielgene von etwa 70% in SK-Mel-28 erzielen sollten.

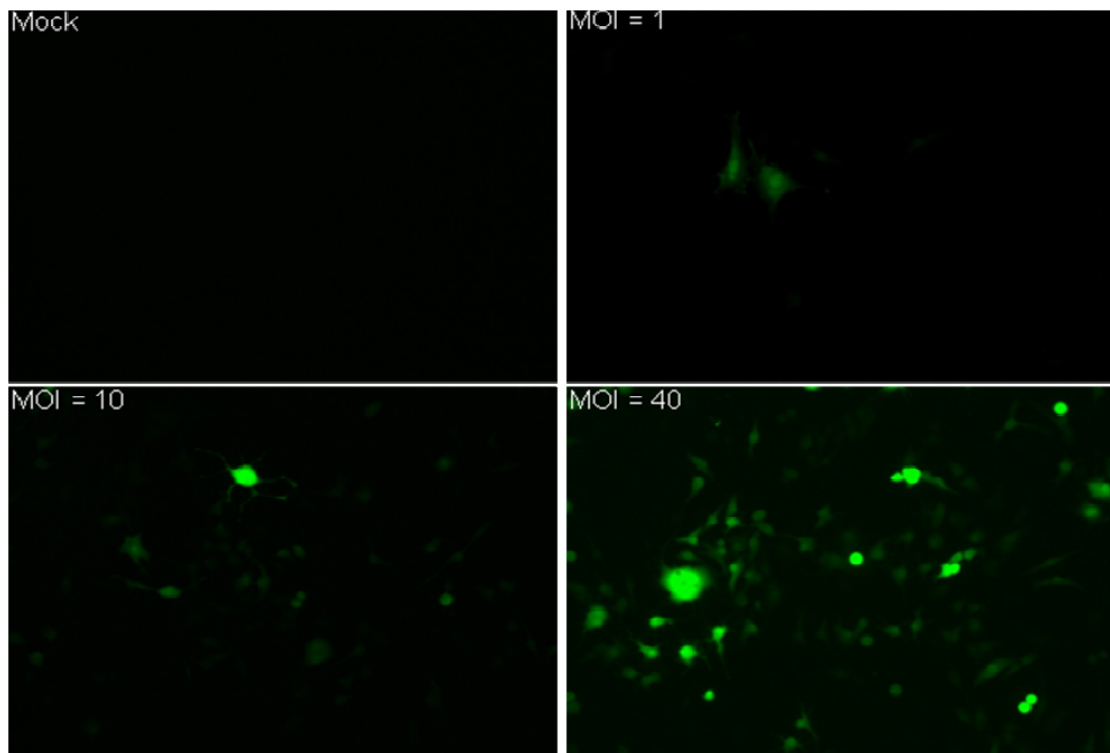


Abbildung 3-23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Transduktion von SK-Mel-28 mit Ad-EGFP mit unterschiedlichen MOIs 48 h p.t. Die Bilder wurden freundlicherweise von Rouven Heisler, Institut für Virologie, Uniklinikum Göttingen aufgenommen. 400fach vergrößert.

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten106

Die Transduktion wurde nach den Vorgaben von Sirion durchgeführt, wobei zunächst geprüft wurde, ob tatsächlich die empfohlene MOI (*Multiplicity Of Infection*) von 40 erforderlich war. Zur optischen Kontrolle der Transduktionseffizienz wurde ein mit EGFP-gekoppelter adenoviraler Vektor in SK-Mel-28 verwendet und die Zellen 48 h nach Transduktion im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet (Abbildung 3-23). Dabei zeigte sich, dass eine MOI von 1 oder 10 zu nur sehr wenigen transduzierten Zellen führt. Daher wurden zur Expressionsanalyse nur die mit einer MOI von 40 transduzierten Zellen eingesetzt. Die Proben wurden dabei nach dem bereits beschriebenen Ablauf aufgearbeitet. Die Expression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der Expression nach Transduktion des leeren Kontrollvektors Ad-PL verrechnet (Abbildung 3-24). Parallel zu SK-Mel-28 wurden A-375 Zellen transduziert.

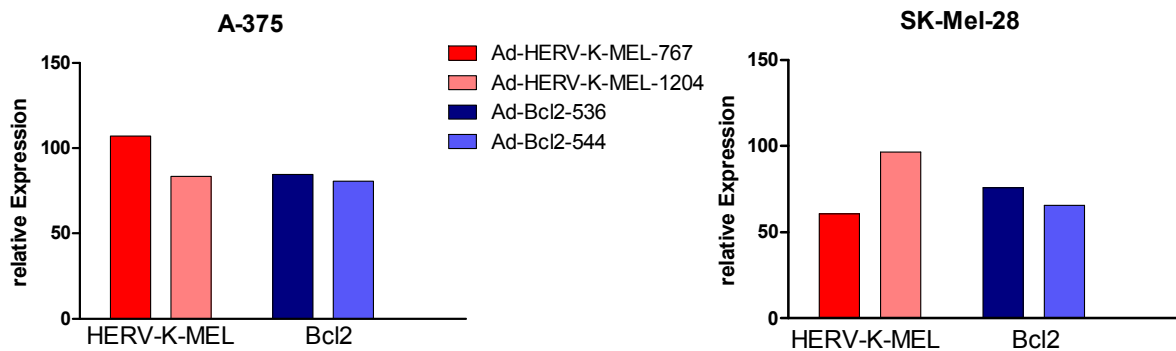


Abbildung 3-24: Verbleibende Expression nach Transduktion von SK-Mel-28 mit Adeno-shRNA-Viren bei einer MOI von 40. Die Analyse wurde 48 h p.t. vorgenommen. Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH*. Als Referenzwert diente die Expression nach Transduktion des Kontrollvektor Ad-PL. n=1.

Die Verwendung der Adeno-shRNA-Viren in den beiden Melanomzelllinien brachte in dem ersten Experiment Ergebnisse unterhalb der gewünschten Inhibition des jeweiligen Zielgens von 70%. So konnte in A-375 Zellen weder durch den Einsatz der gegen *HERV-K-MEL* noch der gegen *Bcl2*-gerichteten shRNAs eine signifikante Reduktion der Expression des Zielgens erreicht werden. In der Zelllinie SK-Mel-28 führte lediglich Ad-HERV-K-MEL-767 zu einem Silencing von etwa 40%.

Da dieses Experiment nicht erneut wiederholt wurde, handelt es sich bei den hier vorgestellten Daten lediglich um Tendenzen. Anhand der relativ geringen

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten¹⁰⁷

Effekte der Adenoviren auf das jeweilige Zielgen wäre an dieser Stelle vor weiteren Analysen zunächst eine Titration der Viren ähnlich wie bei der vorgestellten siRNA-Optimierung notwendig. Da die Viren jedoch erst unmittelbar vor Beendigung dieser Arbeit fertiggestellt wurden, konnte dies nicht mehr vorgenommen werden.

3.2.3.10 Herstellung eines Überexpressionsklon zur Transfektion von Melanozyten

Um die Auswirkung einer erhöhten *HERV-K-MEL* Expression in Melanozyten zu untersuchen, wurde versucht, einen Überexpressionsklon herzustellen, der das von SCHIAVETTI beschriebene *env*-Transkript enthält. Dafür wurde zunächst mittels PCR der gesamte *HERV-K-MEL*-Bereich aus dem Cosmid RP11-332P24 im Bereich 79081 bis 89946 amplifiziert. Die genaue Übersicht der Klonierplanung ist in Abbildung 3-25 dargestellt. Da das Cosmid die genomische *HERV-K-MEL* Sequenz enthält, musste der *gag/pol*-Bereich künstlich entfernt werden. Dazu wurden zwei PCRs durchgeführt, um das erste Exon (*downstream* der Spleißstelle) und das zweite Exon (*upstream* der Spleißstelle) zu amplifizieren und zusätzliche Schnittstellen für die Klonierung einzubringen. Die entstehenden Produkte wurden nach anschließendem Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in den pBSK-Vektor ligiert (Abbildung 3-25).

Der so erhaltene pBSK-*HERV-K-MEL*-Subklon sollte im Folgenden in einen retroviralen Vektor (pRevTre) umkloniert werden, um eine stabile Integration und Überexpression zu erzielen. Zusätzlich sollte der Klon mit EGFP versehen werden, womit eine mikroskopische Kontrolle der Transfektion des Plasmids in die Melanozyten möglich gewesen wäre. Leider scheiterte die Klonierung bereits bei der Transformation des Subklons in *DH5 α* -Bakterien. Es war trotz zahlreicher und langwieriger Versuche nicht möglich, positive Klone zu erhalten. Deshalb wurde ein Auftrag zur Klonierung an die Firma Geneart erteilt. Auch dieser Ansatz blieb ohne Erfolg, wobei die Gründe nach wie vor ungeklärt sind. Eine Untersuchung des Einflusses von *HERV-K-MEL env*-Überexpression in Melanozyten war somit nicht möglich.

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten108

Ausgangsmaterial: Cosmid RP11-332P24 (79081-89946)

...GAACAGGGACTTGAACAAAGAAGGTCTGCTGGAGCAGAAAAAGTGAAACTGACCAGA
 TGAATGAGAAACCCTGGGATGAGTCTGCC**TGCAGAGGATATAAG**- - - -
GAGATGGATAAACCGTGTGAGTGCCCTCAAGTTGTGTGCGACCATGGAATGGGAGACAG
 GA...

↑
Spleißstelle

Gewünschtes Produkt:

5' - ...CTGCC**TGCAGAGGATATAAGGAGAT**GGATAAACCGTGTGAGTGCCCTCA... -3'
 3' - ...GACGGACGTCTCCTATATTCCTCTACCTATTTGGCACACTCACGGGAGT... -5'
 Einführen einer *BsmBI*-Schnittstelle

ZK_1.PCR-Rev:

5' - CTGCC**TGCAGAGGATATAAG** **GAGA** **T** GAGACG AGTACC **AT** **CGAT** GG-
 3' *BsmBI* *ClaI*
 3' - GACGGACGTCTCCTATATTC CTCT A **CTCTGC** TCATGG **TAGC** **TA** CC-
 5'

←

ZK_1.PCR-For:

5' - GTCCG **C** **TCGAG** GCACACTTCACATCAGGGTTC - 3'
XhoI

ZK_2.PCR-For:

5' - GG **G** **GTAC** **C** CGTCTC **G** **GAGA** **T** GGATAAACCGTGTGAGTGCC -3'
KpnI *BsmBI*
 3' - CC **C** **CATG** **G** GCAGAG C CTCT ACCTATTTGGCACACTCACGG -5'

ZK_2.PCR-Rev:

5' - CTCC **AT** **CGAT** GGGGGCTCCTTGCTTCTAG -3'
ClaI

3.2 Analyse von HERV-K-MEL und seiner Funktion in Melanomzellen und Melanozyten109

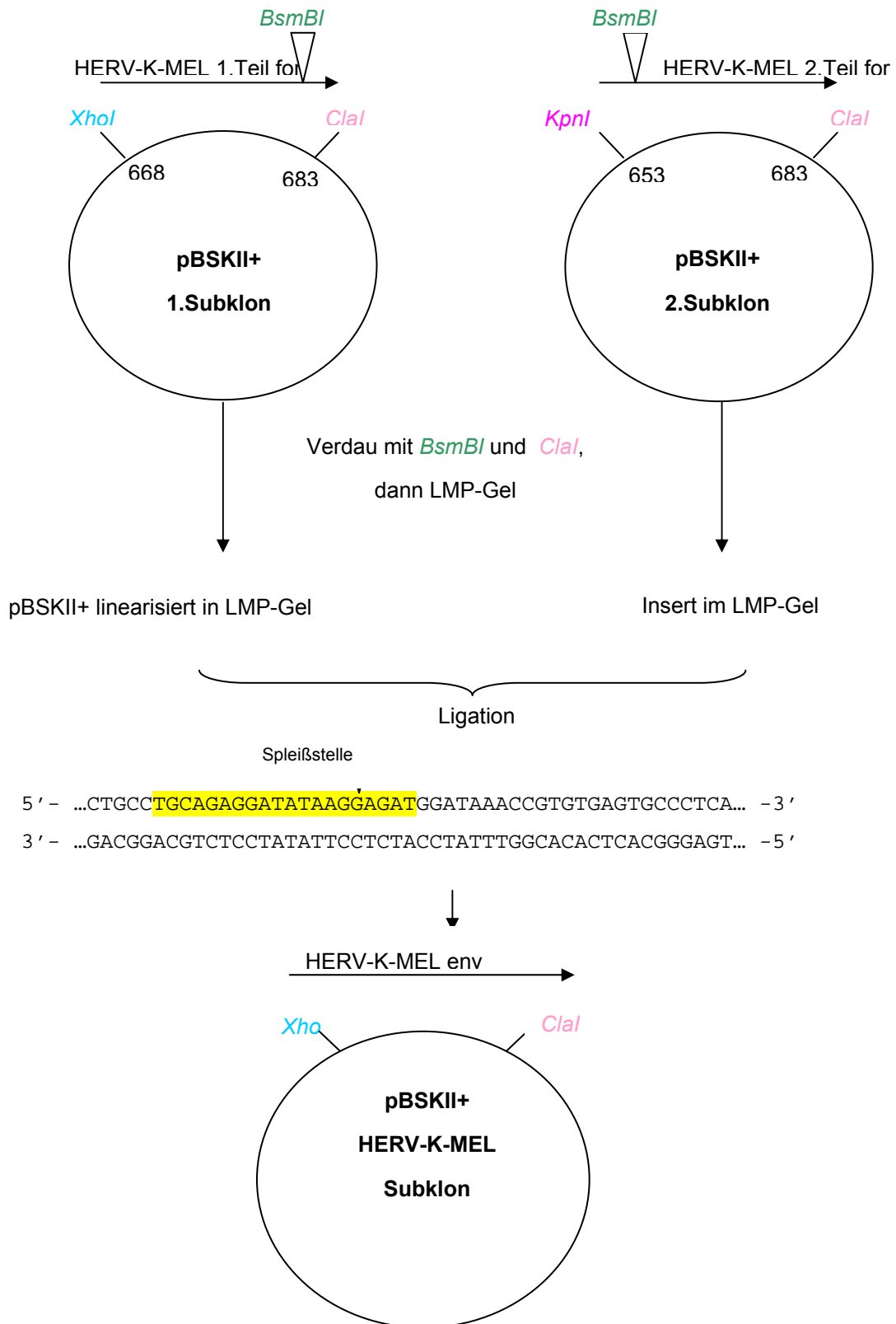


Abbildung 3-25: Klonierplanung für einen *HERV-K-MEL env*-Überexpressionsklon. Angegeben ist in Gelb jeweils der Bereich, in dem laut SCHIAVETTI das Spleißen erfolgt.

3.3 Die Rolle von HERV-K bei SIV-Infektion

Nach der Untersuchung der *HERV-K* Expression im Zusammenhang mit malignen Melanomen *in vitro* sollte in dieser Arbeit auch die Expression während einer Erkrankung *in vivo* analysiert werden. Da jedoch u.a. keine vergleichenden Analysen mit Werten vor und nach Erkrankung möglich sind, wurde die Untersuchung einer von Außen induzierten Infektionserkrankung bevorzugt. Zudem bietet sich bei einer Infektion die Möglichkeit, eine direkte Korrelation von Viruslast und *HERV-K* Expression zu untersuchen.

Im Jahr 2007 beschrieben CONTRERAS-GALINDO und Kollegen, dass 70% der mit HIV-1 infizierten Personen Antikörper gegen HERV-K (HML-2) aufweisen. Außerdem wurde beobachtet, dass es zu einer erhöhten *HERV-K pol*-Expression in PBMCs und teilweise in CD4+-Zellen bei HIV-1 Patienten kommt. Eine Infektion von PBMCs mit HIV-1 *in vitro* führte ebenfalls zu erhöhter RNA- und Proteinexpression. Außerdem konnte im Plasma von 95% der untersuchten HIV-1 infizierten Personen *HERV-K* RNAs nachgewiesen werden, die vornehmlich den HML-2 und HML-3 Familien zugeordnet werden konnten (CONTRERAS-GALINDO *et al.*, 2006a).

Da es bisher keine Veröffentlichungen über einen potenziellen Zusammenhang zwischen der *HERV-K* Expression und SIV-Infektionen *in vivo* gibt, wurden RNA-Isolate von Rhesus-Makaken (*Macaca mulatta*) genutzt, die im Rahmen von Impfstoffstudien am Deutschen Primatenzentrum (DPZ) mit SIV infiziert wurden. Außerdem wurde untersucht, ob es zu einer erhöhten Expression nach SIV-Infektion einer humanen T-Zelllinie kommt, da über eine Korrelation von *HERV-K* und SIV *in vitro* ebenfalls nichts bekannt ist und die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchung direkt verglichen werden können.

3.3.1 Adaption der humanen Primer an das Makaken-Genom

Da die von CONTRERAS-GALINDO entworfenen Primer spezifisch für das humane Genom sind, wurde zunächst betrachtet, ob eine Adaption der Primer an das Makaken-Genom nötig ist. Dazu wurde ein Sequenzvergleich eines typischen *HERV-K* (HML-2) Elements gegen das Affengenom vorgenommen. Als humane Ausgangssequenz diente dabei [NT_023736.16](#), das auf dem Chromosom 8

liegt. Anschließend erfolgte ein Abgleich dieser Nukleotidabfolge in der *NCBI*-Datenbank gegen *Macaca mulatta* (taxid:9544). Es ergaben sich dabei mehrere Treffer, wobei einige ausgewählt und in einen Sequenzvergleich eingesetzt wurden (siehe Anhang). Anhand dieser Vergleiche wurden die humanen Primer an die *Macaca mulatta*-Sequenz angepasst und für nachfolgende qRT-PCR in SIV-infizierten Makaken genutzt.

3.3.2 Expressionsanalyse von *HERV-K (HML-2)* bei SIV-infizierten Makaken

Zur Untersuchung der *HERV-K (HML-2)* Expression in mit SIV-infizierten Makaken wurde RNA verwendet, die von Bianka Mußil (DPZ) im Rahmen ihrer Doktorarbeit aus PBMCs isoliert wurde. Infizierte Makaken zeigen generell zwei unterschiedliche Viruslastverläufe (Abbildung 3-26). Typisch ist der Verlauf der Progressoren, bei denen die Viruslast nach der Peak-Virämie nur kurzzeitig wieder abfällt, bevor sie nach einigen Wochen erneut stark ansteigt und bis zur Ausprägung des Krankheitsbildes AIDS konstant hoch bleibt.

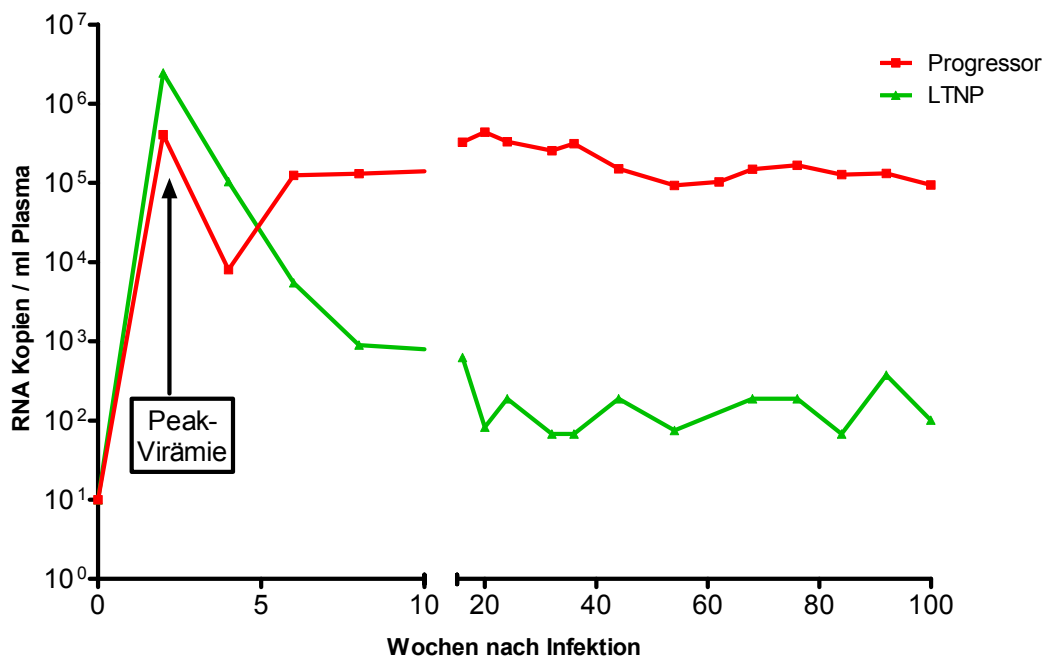


Abbildung 3-26: Typische Viruslastverläufe bei SIV-infizierten Makaken. Die Bestimmung der Viruslast erfolgte mittels qRT-PCR. Mit freundlicher Genehmigung von Tina Schultheiss (AG Stahl-Hennig, DPZ).

Anders ist der Verlauf der Viruslast bei den so genannten Virus-Controllern oder LTNPs (*Long Term Non-Progressors*). Bei diesen Tieren kommt es zwar ebenfalls zu einer Peak-Virämie nach Infektion und einem anschließenden Abfall der Viruslast, jedoch bleibt diese auch in der darauf folgenden Zeit sehr niedrig. Dieser Verlauf tritt jedoch selten auf, wird aber vom speziellen genetischen Hintergrund dieser Tiere begünstigt (SAUERMAN *et al.*, 2008). Die für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden zudem als LTNPs klassifiziert, wenn sie mehr als 150 Wochen nach Infektion keine Zeichen von AIDS zeigen und ihre Viruslast unter dem Wert von 10^4 RNA-Kopien pro ml Plasma bleibt.

Aus der Gruppe der Progressoren und LTNPs wurden RNA-Proben von Makaken ausgewählt, die in der Virusbelastung die typischen zuvor beschriebenen Verläufe zeigten. Somit konnte gewährleistet werden, dass die in der Analyse betrachteten Tiere den Gruppen exakt zugeordnet werden konnten. Daraufhin wurden unter Verwendung der Makaken-adaptierten HML-2-Primer (3.3.1) die RNAs einzelner Tiere auf die *HML-2* Expression mit einer qRT-PCR untersucht (Abbildung 3-27). Dabei wurde gegen *GAPDH* normalisiert.

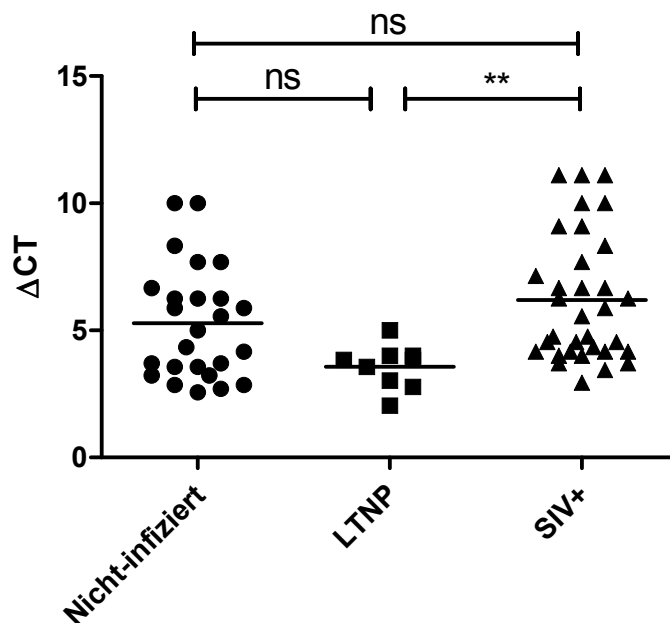


Abbildung 3-27: Quantifizierung der *HERV-K* (*HML-2*) Expression ausgewählter Tiere (*Macaca mulatta*) durch qRT-PCR. Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH*. Die RNAs wurde freundlicherweise von Bianka Mußil (AG Sopper, DPZ) zur Verfügung gestellt. Signifikanztest: ANOVA (ns: nicht signifikant; **: $p < 0,01$).

Wie aus der Abbildung 3-27 hervorgeht, kommt es nach SIV-Infektion in den Makaken nicht zu signifikanten Erhöhung der *HERV-K (HML-2)* Expression. Lediglich die Gruppe der LTNPs zeigt eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu den infizierten Tieren ($p < 0,01$), die allerdings nicht signifikant zu den nicht-infizierten ist. Leider war die Probenanzahl der LTNPs begrenzt, so dass hier keine weiteren Tiere untersucht werden konnten. Es lässt sich jedoch vermuten, dass es generell nicht zu einer Erhöhung der *HERV-K (HML-2)* Expression nach SIV-Infektion *in vivo* kommt.

3.3.3 Expressionsanalyse von *HERV-K (HML-2)* *in vitro*

Da die Untersuchung der *HERV-K (HML-2)* Expression *in vivo* keine Veränderungen nach SIV-Infektion zeigte, wurde die Expression *in vitro* betrachtet. Dazu wurden C8166-Zellen, eine humane T-Zelllinie, mit SIV infiziert. Die Infektion, RNA-Isolation und Virustiterbestimmung mit *gag*-spezifischen SIV-Primern wurde von der AG Motzkus am Deutschen Primatenzentrum durchgeführt. Die *HML-2* Expressionsmessung erfolgte mittels qRT-PCR mit den von CONTRERAS-GALINDO entwickelten humanen *HERV-K (HML-2)* *pol*-Primern, da es sich hier um eine humane Zelllinie handelt (Abbildung 3-28). Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH*, der $\Delta\Delta CT$ -Wert errechnet sich aus der Differenz der infizierten und der nicht-infizierten Probe des jeweiligen Tages nach Infektion (d.p.i.).

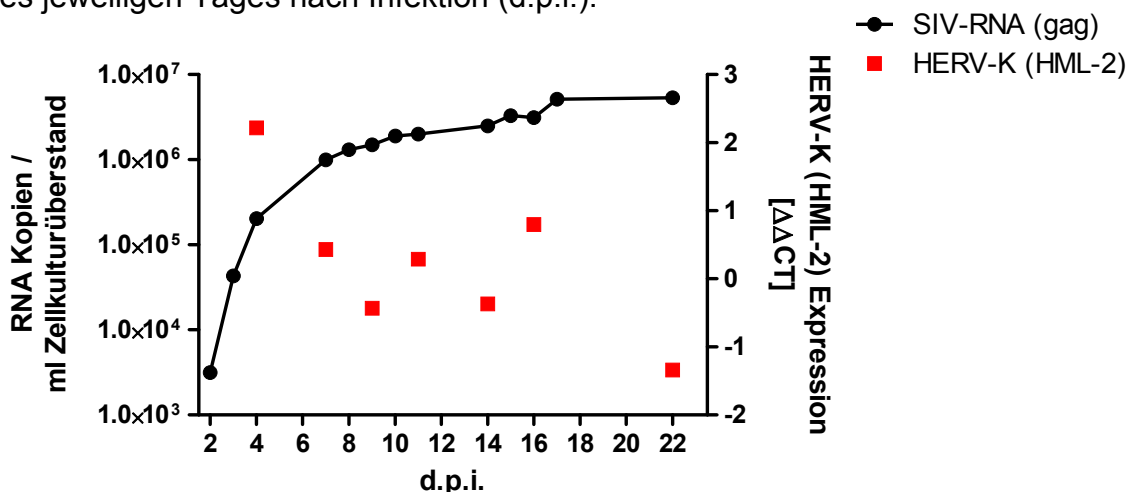


Abbildung 3-28: SIV-Viruslastverlauf und *HERV-K (HML-2)* Expression nach SIV-Infektion von C8166. Die Quantifizierung der *HML-2* Expression und der Viruslast erfolgte mittels qRT-PCR. Die Normalisierung wurde gegen *GAPDH* vorgenommen. Die RNAs und die Werte der Viruslast wurden freundlicherweise von der AG Motzkus (DPZ) zur Verfügung gestellt.

Wie aus Abbildung 3-28 ersichtlich wird, nimmt die Viruslast nach SIV-Infektion kontinuierlich zu. Die *HERV-K (HML-2)* Expression folgt nicht dem Verlauf der Viruslast und scheint vollkommen unabhängig von dieser zu sein. Es scheint somit keine Korrelation zwischen Viruslast und *HML-2* Expression im Verlauf der Infektion vorzuliegen. Zudem kann nicht gezeigt werden, dass eine SIV-Infektion von C8166-Zellen generell mit einer erhöhten *HERV-K (HML-2)* Expression *in vitro* einhergeht.

3.3.4 Expressionsanalyse diverser HERV-K Mitglieder *in vitro*

Zusätzlich zu der qRT-PCR-Bestimmung der Expression von *HERV-K (HML-2)* wurden die aus den mit SIV-infizierten C8166-Zellen gewonnenen RNAs in einen HERV-spezifischen Mikroarray eingesetzt und analysiert. Dieser basiert auf dem von SEIFARTH und Kollegen (2005) veröffentlichten Mikroarray und wurde im Labor von Frau Prof. Leib-Mösch in Neuherberg von Michelle Vincendeau durchgeführt. Die für den Array verwendeten Sonden liegen im *pol*-Bereich der HERVs. Das Ergebnis des Arrays ist in Abbildung 3-29 dargestellt. Zu sehen ist jeweils die nicht infizierte Kontrolle und die infizierte Probe. Die in der Abbildung aufgeführte Klasse II umfasst die Mitglieder der HERV-K Familie.

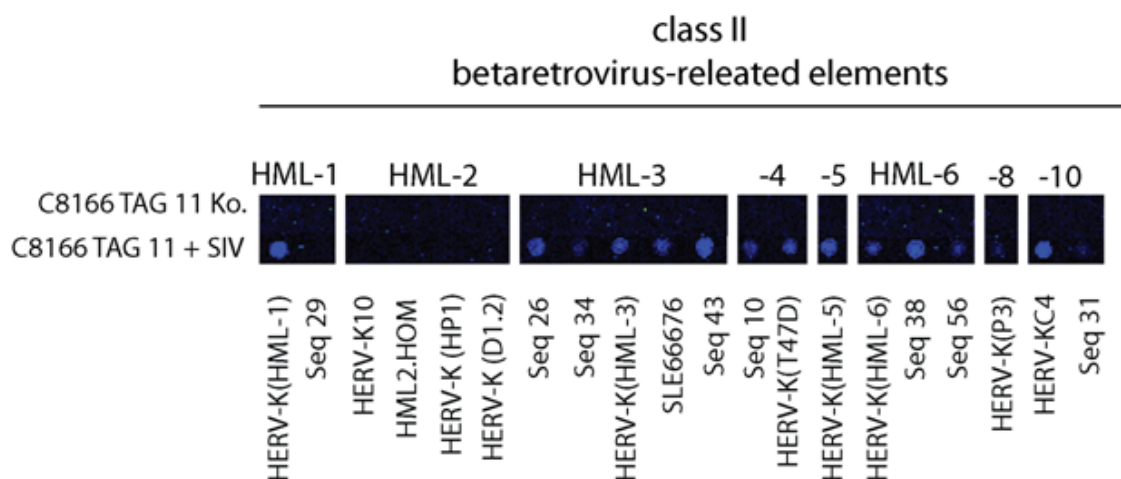


Abbildung 3-29: Ergebnisse eines HERV-spezifischen Mikroarrays. Eingesetzt wurden RNAs von Tag 11 nach Infektion der C8166-Zellen mit SIV. Mit freundlicher Genehmigung von Michelle Vincendeau und Prof. Leib-Mösch, Neuherberg.

Wie anhand des Mikroarrays zu erkennen ist, kommt es zu einigen Änderungen in der Expression einzelner HERV-K Sequenzen. Jedoch kam es nach SIV-Infektion nicht zu einer Erhöhung der *HML-2* Expression, was mit den Ergebnissen der qRT-PCR in 3.3.3 korreliert. Erstaunlich waren aber die starken Expressionssteigerungen der Familien *HML-3*, -4, -5, -6 und -10.

Die Ergebnisse des Arrays wurden daraufhin mittels qRT-PCR unter Verwendung der gleichen RNA-Proben wie im Array überprüft. Zunächst wurden lediglich die *HML-3* Elemente *Seq 34* und *SLE 66676* sowie *HML-2* unter Verwendung der von CONTRERAS-GALINDO entworfenen Primer (CONTRERAS-GALINDO *et al.*, 2007) für den Tag 11 und 16 nach Infektion analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH*. Die $\Delta\Delta CT$ -Werte ergeben sich aus der Differenz der Werte der infizierten und nicht-infizierten Probe. Dabei kam es zu den in Abbildung 3-30 aufgeführten Ergebnissen.

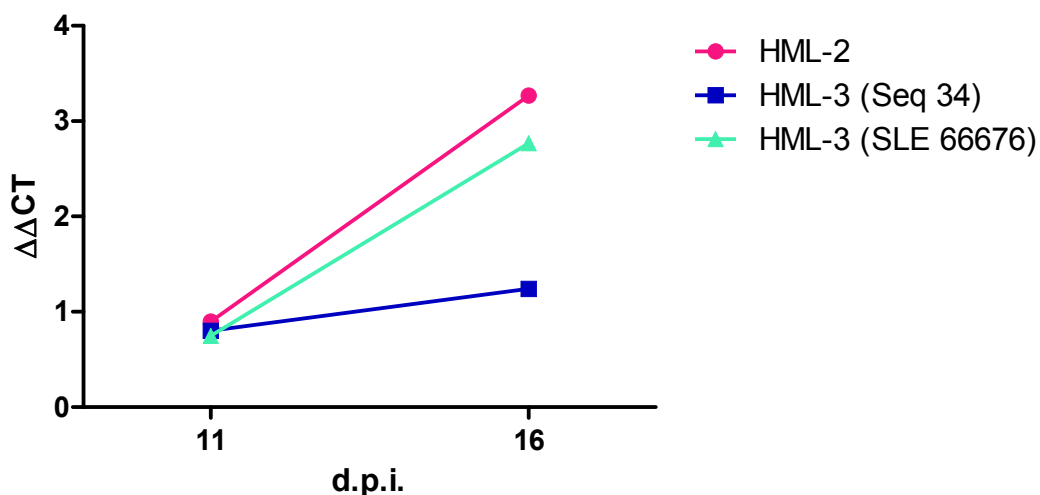


Abbildung 3-30: Relative Quantifizierung der Expression verschiedener HML-Mitglieder nach SIV-Infektion in C8166 mittels qRT-PCR. Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH*.

Es war am Tag 16 p.i. eine deutlichen Expressionssteigerung von *HML-2* und *HML-3* (*SLE 66676*) zu messen, wogegen die Expression von *HML-3* (*Seq 34*) nur leicht anstieg. Es scheint so, dass es im späten Verlauf der Infektion zu einer erhöhten Expression dieser Elemente kommt. In dem Mikroarray (Abbildung 3-29), der die Ergebnisse von Tag 11 zeigt, war dies für die *HML-2* Gruppe nicht zu beobachten. Jedoch muss hierbei bedacht werden, dass es sich bei den im Mikroarray eingesetzten Sonden um andere Bereiche der jeweiligen Sequenz handelt als die der Primer. Zwar wurde beim Design

versucht, einen der Primer auf oder in unmittelbarer Nähe der Sondensequenz zu positionieren. Da es sich hier aber um hochhomologe Bereiche handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sowohl bei der Hybridisierung der Proben an die Sonden des Mikroarrays als auch bei der Amplifikation in der qRT-PCR andere Mitglieder der jeweiligen Familien in den Messungen mit gemessen wurden.

Zur Überprüfung der erhöhenden Expressionsverläufe während der Infektion wurden RNA-Isolate eines weiteren SIV-Experiments in einer qRT-PCR untersucht (Abbildung 3-31). Es bot sich jedoch ein vollkommen anderes Expressionsprofil als in dem vorherigen Lauf. So konnte keine Tendenz einer erhöhten Expression der jeweiligen Elemente beobachtet werden.

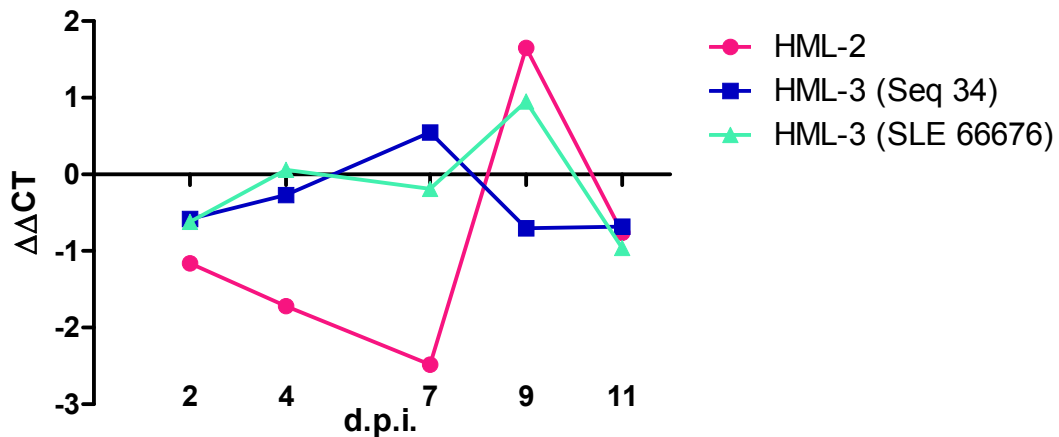


Abbildung 3-31: Relative Quantifizierung der Expression verschiedener HML-Mitglieder nach SIV-Infektion in C8166 mittels qRT-PCR in einer weiteren Versuchsreihe. Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH*.

Da bei der Viruslastbestimmung dieses Experiments ein kontinuierlicher Anstieg zu verzeichnen war, der dem Verlauf in Abbildung 3-28 ähnelte (nicht gezeigt), konnte aus diesen Beobachtungen geschlossen werden, dass keine Korrelation von SIV-Viruslast und Expression sowohl der untersuchten HML-2 als auch HML-3 Sequenzen vorlag. Allerdings wurden in diesem Experiment die RNA-Isolationen lediglich bis zum Tag 11 p.i. vorgenommen. Die Ergebnisse der Messungen aus Abbildung 3-30 zeigten jedoch, dass erst im späten Verlauf der Infektion eine erhöhte Expression der Elemente zu messen war. Daher sollten an dieser Stelle Analysen über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Zudem wären für klare Aussagen hinsichtlich der unterschiedlichen Expression

von HML-Familien nach SIV-Infektion *in vitro* die Analyse weiterer Experimente sowohl im Mikroarray als auch in der qRT-PCR nötig. Sowohl die Analyse der Expression im Zeitverlauf als auch die Überprüfung der Arraydaten wird gerade in einer Kooperation mit dem Labor von Frau Prof. Leib-Mösch durchgeführt. Weitere Ergebnisse sind daher noch nicht bekannt, werden aber nach Abschluss der Untersuchungen im Rahmen der Dissertation von Frau Michelle Vincendeau veröffentlicht.

4 DISKUSSION

4.1 Die Analyse der HERV-K (HML-6) Expression in Melanomzellen und Melanozyten mit einer 5'-RACE-PCR

Die Mitglieder der evolutionär sehr jungen HERV-K Familie sind im Gegensatz zu anderen HERVs weitgehend intakt und stellen die biologisch aktivste Familie dar. Die HERV-K (HML-6) Gruppe ist mit ca. 30-40 Kopien im haploiden Genom des Menschen vertreten. Außerdem findet man etwa 50 solitäre HML-6 LTRs im humanen Genom verteilt, die auch als LTR3-Elemente bezeichnet werden. Diese HERVs ist besonders interessant, da individuelle Mitglieder in Leber, Lunge und PBMCs unterschiedlich stark exprimiert werden (MEDSTRAND & BLOMBERG, 1993; ANDERSSON *et al.*, 1996) und eine Assoziation mit bestimmten Tumorarten postuliert wird.

In letzter Zeit gibt es ständig wachsende Hinweise auf eine Beteiligung der HERV-K (HML-6) Gruppe an der Entstehung von malignen Melanomen (BÜSCHER *et al.*, 2005; WEERARATNA *et al.*, 2009). Daher wurde in dieser Arbeit ein System zur spezifischen Amplifikation der HML-6 Transkripte mit einer 5'-RACE-PCR in Melanomzellen entwickelt, das sich die hohe Homologie der LTR3-Elemente zunutze macht. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der entstandenen Amplifikationsprodukte zeigte sich, dass jede der verwendeten Zelllinien ein ganz spezifisches, individuelles Bandenmuster und somit Expressionsprofil aufwies. Bei jeder Zelllinie waren auffällige Banden zu sehen, die in den anderen nicht oder zumindest nicht in dieser Stärke zu finden waren. Einige spezifische Transkriptbanden wurden aus einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten, gereinigt und nach Klonierung sequenziert. Die bioinformatische Analyse einzelner Sequenzabschnitte und der Abgleich mit öffentlichen Datenbanken ergab für nahezu alle Amplifikate einen Hinweis auf einer Expression in malignen Melanomen oder in melanozytenhaltigen Geweben.

Die Untersuchung eines aus dem Melanozytenisolat amplifizierten Transkripts (Bande 1) zeigte Übereinstimmungen mit einer Sequenzfolge, deren Expression

im Zusammenhang mit malignen Melanomen beschrieben wurde. Der Nachweis einer Expression in Melanozyten lässt darauf schließen, dass es bereits in den als Vorläufer bezeichneten Zellen zu einer Aktivierung einzelner LTR3-Elemente kommt, und nicht erst nach maligner Transformation der Zellen. Die Sequenzfolge eines weiteren analysierten Transkripts (Bande 2) wird laut Datenbank im menschlichen Augapfel exprimiert. Die Expression dort ist in diesem Zusammenhang interessant, da sich Melanozyten auch in der Aderhaut und der Regenbogenhaut des Auges finden. Eine erhöhte Transkriptbildung von HERV-K (HML-6) Mitgliedern in Augenmelanomen wurde u.a. von SCHIAVETTI für das im Folgenden untersuchte *HERV-K-MEL* beschrieben.

Ein weiteres untersuchtes Transkript (Bande 4) wies nach Analyse in der Datenbank keine chromosomale Übereinstimmung auf, sondern zeigte eine hohe Homologie zum mitochondrialen Genom. Dies könnte als ein Hinweis auf die Verbindung der *HERV-K (HML-6)* Expression und dem mitochondrialen, intrinsischen Apoptoseweges sein, die im zweiten Teil der Diskussion noch genauer betrachtet werden wird.

4.1.1 Transkriptanalysen mit spezifischen HML-6 Primern können Hinweise auf neue Melanommarker geben

Die Analyse der untersuchten Transkripte lieferte einen Beweis für die Funktionalität der entworfenen Primer und der Methode. Es wurde keine Quantifizierung oder umfassende Qualifizierung transkribierter LTR3 Elemente vorgenommen. Anhand der gewonnenen Ergebnisse lässt sich jedoch feststellen, dass die hier etablierte Methode eine schnelle Möglichkeit der Transkriptanalyse offeriert. Weitere Analysen über SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) oder Differential Display könnten mit dieser Methode verknüpft werden, so dass differenziell transkribierte HERV-K (HML-6) Mitglieder untersucht werden können. Zudem bietet eine Verbindung mit SAGE die Möglichkeit der Quantifizierung der Expression anhand der Häufigkeit des Auftretens eines individuellen Tags (VELCULESCU *et al.*, 1995). Hierbei handelt es sich um kurze Fragmente von etwa 26 Nukleotiden, die durch Spaltung des Transkripts mit einer spezifischen Restriktionsendonuklease vom Typ III entstehen. Inwieweit eine kurze Sequenzfolge in dem vorliegenden Fall zur

4.2 Die Expression von HERV-K-MEL beeinflusst das Wachstum von Melanomzelllinien¹²⁰

Analyse der LTR3 Transkripte ausreicht, ist nicht untersucht. Sollte sich die Analyse mit SAGE als funktionell erweisen, so wäre lediglich eine Sequenzierung weniger Klone nötig, um quantitative und qualitative Aussagen über transkribierte LTR3 Elemente machen zu können. Somit wäre es möglich, „genetische Fingerabdrücke“ unterschiedlicher Gewebe und Zelllinien herzustellen. Aber auch ohne die relativ zeit- und arbeitsintensive SAGE-Analyse ist es mit der vorgestellten 5'-RACE-PCR möglich, charakteristische Expressionsprofile über eine Gelelektrophorese visuell oder durch Sequenzierung zu untersuchen. Auf diese Weise könnten verschiedene Melanomzelllinien und Melanozytenisolate miteinander verglichen werden, so dass stark exprimierte und spezifische Amplifikate schnell und einfach analysierbar wären. Unter Umständen könnten so neue Tumormarker ausfindig gemacht oder zumindest die Anzahl potenzieller Kandidaten eingegrenzt werden. Sollten sich optisch bereits anhand von spezifischen Expressionsmustern durch Transformation bedingte Verschiebungen in der Transkription zeigen, so wäre auch ein diagnostischer Einsatz dieser Methode denkbar. Zudem kann die Methode auf weitere HERV-Familien, Gewebe und Zellen ausgeweitet werden. Initial ist es lediglich notwendig, eine möglichst umfassende Datenbank für die jeweils zu untersuchende HERV-Gruppe zu erstellen, anhand derer spezifische Primer entworfen werden können.

4.2 Die Expression von *HERV-K-MEL* beeinflusst das Wachstum von Melanomzelllinien

HERV-K-MEL, ein Mitglied der HML-6 Gruppe, wurde erstmals von SCHIAVETTI und Kollegen beschrieben. Es handelt sich dabei um ein Spleißprodukt eines vollständigen Provirus, das auf Chromosom 16 lokalisiert ist. Das dokumentierte Transkript besteht nach Spleißvorgang lediglich aus dem *env*-Bereich, der von den LTRs flankiert wird. Eine vermehrte Transkription konnte in Melanomisolaten nachgewiesen werden. Auch in Muttermalen, die häufig als Vorläufer maligner Melanome betrachtet werden, wurde eine erhöhte Expression gezeigt. In nicht-transformierten Melanozyten wurden hingegen keine bzw. eine sehr geringe Anzahl an Transkripten gemessen. Daher wurde

4.2 Die Expression von HERV-K-MEL beeinflusst das Wachstum von Melanomzelllinien¹²¹

von SCHIAVETTI postuliert, dass *HERV-K-MEL* als früher Marker für eine Transformation der Melanozyten in tumorösem Gewebe geeignet sein könnte (SCHIAVETTI *et al.*, 2002).

Zur weiteren Aufklärung der möglichen Rolle von *HERV-K-MEL* in der Tumorentstehung wurden RNAi-Experimente in Melanomzelllinien durchgeführt, in denen die Auswirkungen eines Silencings auf Zellwachstum und -Morphologie analysiert wurden. Zudem wurden Expressionsanalysen der Zellen vor und nach Transfektion erstellt. Bei der Bestimmung der endogenen Expression von *HERV-K-MEL* in den verwendeten Zelllinien konnte eine erhöhte Expression des Gens in beiden Melanomzelllinien gemessen werden, was die Beobachtung von SCHIAVETTI bestätigte. Die Transkriptbildung war in der Melanomzelllinie SK-Mel-28 etwa um das 4-fache, in der zweiten Melanomzelllinie A-375 sogar um das 8-fache gegenüber der Expression in der Referenzzelllinie NHEM erhöht. Somit konnte eine potenzielle Bedeutung von *HERV-K-MEL* im Transformationsprozess nicht ausgeschlossen werden und wurde daher im Folgenden weiter analysiert.

4.2.1 Die Messung von RNA-Interferenz ist in Melanomzellen trotz optimierter und konstanter Bedingungen schlecht reproduzierbar

Nach der Bestätigung der Funktionalität des Systems und der Messmethode der qRT-PCR wurde die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) eingesetzt, um eine spezifische Regulation des *HERV-K-MEL* Transkripts in Melanomzellen zu erzielen. Die sequenzspezifische Herabregulation eines Gens durch ein kurzes Stück doppelsträngiger, zu einem Abschnitt des Zielgens komplementärer RNA beruht auf dem natürlich vorkommenden, hochkonservierten System der Zellen zur Verteidigung gegen Viren und zur post-transkriptionellen Regulierung von zelleigenen Genen (SHARP, 2001). Vor dem Einsatz spezifischer siRNAs wurden Titrationen in den Melanomzellen zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wie Transfektionszeitpunkt, siRNA- und Agenzmenge vorgenommen. Die Messungen erfolgten dabei unter Zuhilfenahme verschiedener Methoden wie Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie. Es zeigte sich, dass eine individuelle Optimierung für

4.2 Die Expression von HERV-K-MEL beeinflusst das Wachstum von Melanomzelllinien¹²²

Zelllinien vor dem Einsatz der lipid-basierten siRNA-Transfektion erforderlich war. Zudem musste auf Einhaltung einer maximal tolerierten siRNA- und Agenzkonzentration geachtet werden. Eine weitere Erhöhung der Mengen führte zu zytotoxischen Effekten in den Zellen. Wurde dagegen zu wenig siRNA eingesetzt, so lagen die Effizienzen teilweise unter der Nachweisgrenze. Zudem wurde versucht, ein robustes Protokoll zu etablieren, das Ergebnisse mit möglichst geringen Abweichungen erzielte. Dennoch kam es im Verlauf der Messungen immer wieder zu starken Schwankungen in der Effizienz der Transfektion, obwohl auf die Einhaltung konstanter Bedingungen geachtet wurde. Dies erschwerte eine Reproduktion und die Auswertung der Messdaten. Außerdem waren in einigen Fällen Tendenzen erkennbar, die jedoch nicht signifikant bestätigt werden konnten. Die beschriebenen Experimente zur RNA-Interferenz wurden daher mehrfach wiederholt, gemittelt und statistisch ausgewertet.

4.2.2 siRNAs gegen unterschiedliche Positionen des *HERV-K-MEL* haben eine vergleichbare Silencingeffizienz

Für die RNA-Interferenz-Analyse zum Einfluss eines *HERV-K-MEL* Silencings wurden sechs verschiedene siRNAs gegen das Zielgen mit bioinformatischen Programmen entworfen. Das Design der siRNAs basierte dabei auf der von SCHIAVETTI publizierte Sequenz des *HERV-K-MEL env*-Transkripts. Neben den herkömmlichen 21mer-siRNAs wurden auch zwei 27mer-siRNAs verwendet, da diese aufgrund einer besseren Prozessierung im Dicer-Komplex zu einem bis zu 100-fach höheren Silencing führen können (KIM *et al.*, 2005). Dies konnte jedoch im Verlauf der Arbeit für die eingesetzten siRNAs nicht bestätigt werden. Erste Experimente zeigten, dass sämtliche verwendeten siRNAs zu einer Regulation der *HERV-K-MEL* Expression führten, die in der Stärke minimal variierte. Daraus kann geschlossen werden, dass das Silencing unabhängig von der Lage der siRNAs funktionell war. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das *HERV-K-MEL* Transkript tatsächlich in der von SCHIAVETTI beschriebenen Form gebildet wurde.

4.2.3 Das Silencing von *HERV-K-MEL* führt zu einer verminderten Wachstumsdichte der Melanomzellen

Bei der mikroskopischen Untersuchung von Zellkulturen der beiden Linien A-375 und SK-Mel-28 konnte beobachtet werden, dass es zu einer deutlichen Abnahme der Wachstumsdichte und vereinzelter Abrundung der mit *HERV-K-MEL* siRNA transfizierten Zellen kam. Zum Ausschluss eines potenziell durch das Transfektionsagens hervorgerufenen Effekts wurde eine Scrambled-siRNA eingesetzt, die aus den gleichen Nukleotiden wie die zielgerichtete siRNA besteht, deren Sequenzfolge jedoch verändert wurde. Es zeigte sich bei deren Verwendung keine Veränderung der Wachstumsdichte im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen, so dass von einem spezifischen, durch *HERV-K-MEL* Silencing induzierten Effekt ausgegangen wurde. Eine mikroskopische Zellzählung nach Trypanblau-Färbung konnte jedoch nicht zeigen, dass die geringere Konfluenz mit einer Abnahme der Zellzahl korreliert ist.

Während der gesamten Transfektionsexperimente konnte immer wieder mikroskopisch eine verminderte Wachstumsdichte festgestellt werden. Daher wurde durchflusszytometrisch auf eine potenzielle Apoptoseinduktion nach Silencing untersucht. Es traten jedoch aufgrund der alleinigen Behandlung der Zellen mit dem jeweiligen Transfektionsagens so deutliche Veränderungen der Zellgranularität und -größe auf, dass ein Vergleich der transfizierten und nicht transfizierten Zellen erschwert war. Zudem muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das eingesetzte Annexin V-Konjugat für die Zellfärbung nach Transfektion nicht geeignet war. Annexin V, welches ein calcium- und phospholipidbindendes Protein ist, bindet vornehmlich an Phosphatidylserin (PS), das in der Frühphase der Apoptose an der Zelloberfläche exponiert wird. Es kommt aufgrund des einsetzenden Zelltods zu einem Verlust des asymmetrischen Aufbaus der Zellmembran, woraufhin das in vitalen Zellen im inneren Teil der Plasmamembran lokalisierte PS an die Zelloberfläche gelangt. Die Bindung von Annexin V wird daraufhin möglich und kann, sofern es mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert vorliegt, durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Obwohl in dieser Arbeit die Behandlung der Zellen mit einem Annexin V-Konjugat nach Empfehlung des Herstellers erfolgte, war die Färbung der Zellen stets suboptimal. Der Versuch einer Optimierung durch die

4.2 Die Expression von HERV-K-MEL beeinflusst das Wachstum von Melanomzelllinien¹²⁴

Gabe unterschiedlicher Annexinmengen führte nicht zu verbesserten Resultaten. Auch die Verwendung eines mit einem anderen Fluorochrom gekoppelten Annexins brachte keine zufriedenstellenden Ergebnisse (nicht gezeigt). Es muss daher festgestellt werden, dass die Verwendung von Annexin V bei mit siRNA-transfizierten Melanomzellen nicht erfolgreich war. Inwieweit das Transfektionsagens oder die siRNA einen Einfluss auf die Exposition von PS an der Zelloberfläche haben könnte, kann nur vermutet werden. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass es sich bei dem beobachteten Effekt möglicherweise nicht um Apoptose handelte oder dieser nur sehr gering ausfällt, da Melanomzellen sich durch eine hohe Resistenz gegenüber äußeren Stimuli auszeichnen, die in herkömmlichen Zellen zu Apoptose führen. Diese These wurde insofern gestützt, als dass selbst die Verwendung der apoptoseinduzierenden Chemikalie AMG nur geringe Apoptoseeffekte in der Durchflusszytometrie hervorruft, obwohl mikroskopisch deutliche Unterschiede zu erkennen waren. Die gemessenen Effekte korrelieren mit den von SALVUCCI und Kollegen publizierten Werten für Apoptose in Melanomzellen nach AMG-Behandlung (SALVUCCI *et al.*, 2001), die selbst nach Optimierung nicht 14% überstiegen.

Über eine Impedanz-Messung wurden Effekte des *HERV-K-MEL* Silencings auf Melanomzellen in Echtzeit bestimmt. Trotz Optimierung und zahlreicher Wiederholungen unter gleichen Bedingungen kam es zu sehr heterogenen Ergebnissen (siehe auch 4.2.1). So konnte zwar gezeigt werden, dass eine Reduktion der *HERV-K-MEL* Expression durch die Verwendung spezifischer siRNAs zu einer Abnahme des Zellindex führt, jedoch traten in den Kontrollen in einigen Messungen vergleichbare Effekte auf. Schwierig für die Auswertung der Messdaten war zudem, dass keine differenzierte Analyse der Ursache der verminderten Impedanz möglich war. So kann es nicht nur aufgrund von Apoptose zu einem reduzierten Zellindex kommen, sondern auch durch morphologische Veränderungen. Unter Anderem könnten die Granularitätsveränderungen der Zellen nach Transfektion, die bereits durchflusszytometrisch beobachtet wurden, eine Erklärung dafür liefern, dass in der Impedanzmessung auch leer transfizierter Zellen eine Veränderung des Zellindex erfahren haben. Laut dem Gerätehersteller sei es möglich, zwischen

diesen Faktoren anhand der Messdaten zu differenzieren. Inwieweit eine Unterscheidung tatsächlich durchführbar sein soll, konnte auch auf mehrfache Nachfrage nicht zufriedenstellend beantwortet werden. Eine abschließende Bewertung des Experiments konnte daher nicht vorgenommen werden, so dass die Ursache der drastischen Zellindexreduktion nach siRNA-Transfektion unklar bleibt. Anhand der durchflusszytometrischen und impedanzbasierten Messungen lässt sich jedoch vermuten, dass die beobachteten Auswirkungen eines *HERV-K-MEL* Silencings auf die Konfluenz der Melanomzellen nicht zwingend Apoptose zur Ursache haben müssen.

4.2.4 Die Korrelation der *HERV-K-MEL* und *Bcl2*-Expression in der Melanomzelllinie SK-Mel-28

Da die zellulären Untersuchungen bis zu diesem Punkt keinen klaren Hinweis für einen Einfluss von *HERV-K-MEL* auf die Apoptose lieferten, wurde die Wirkung eines *HERV-K-MEL* Silencings molekularbiologisch analysiert. Dazu wurde die Genexpression für *Bcl2* nach siRNA-Transfektion quantifiziert. *Bcl2* ist ein antiapoptotisches Gen, das im intrinsischen, mitochondrialen Apoptoseweg gleich an mehreren Stellen regulierend wirkt. Das Protein BCL2 wird in normalen Melanozyten, gutartigen Muttermalen (Naevi) sowie in Melanomen und Melanom-Metastasen exprimiert (SAENZ-SANTAMARIA *et al.*, 1994; Plettenberg *et al.*, 1995; Cerroni *et al.*, 1995). BENIMETSKAYA und Kollegen untersuchten die Rolle von *Bcl2* in der humanen Melanomzelllinie 518A2 (BENIMETSKAYA *et al.*, 2006). Im Rahmen von RNAi-Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein *Bcl2*-Silencing *in vitro* nicht zu phänotypischen Veränderungen und zu keiner Chemosensibilisierung der Zellen führt. Eine genaue Funktion konnte dem BCL2 in diesem Zusammenhang nicht zugewiesen werden. Allerdings bewirkte die Verwendung des Anti-*Bcl2*-Oligomers G3139 eine signifikante Reduktion der Tumorgroße *in vivo*.

Bei der Analyse der *Bcl2*-Expression nach Silencing mit *HERV-K-MEL* spezifischen siRNAs konnte mehrfach eine Korrelation der beiden Gene beobachtet werden. In der Melanomzelllinie SK-Mel-28 führte das Silencing von *HERV-K-MEL* zu einer signifikanten Reduktion der *Bcl2*-Expression. Eine derartige Tendenz konnte für die zweite verwendete Zelllinie A-375 zwar auch

gemessen werden, doch die Veränderung war hier nicht signifikant. In einem zweiten Experiment wurde untersucht, ob die Verwendung von gegen *Bcl2*-gerichteten siRNAs umgekehrt zu einer Reduktion der *HERV-K-MEL* Expression führte. Mithilfe dieses Experiments konnten die zuvor gewonnenen Daten nach *HERV-K-MEL* Silencing bestätigt werden. So führte auch hier ein Silencing zu einem signifikanten Effekt auf *HERV-K-MEL* in SK-Mel-28, in A-375 Zellen war dies jedoch nicht zu beobachten. Anhand dieser Analysen konnte gezeigt werden, dass zwischen *HERV-K-MEL* und *Bcl2* in SK-Mel-28 eine Korrelation vorliegt.

Eine Untersuchung weiterer Melanomzelllinien zur Bestätigung dieser Beobachtungen ist notwendig. Zudem ist zu überlegen, ob parallel zu der siRNA-Transfektion den Melanomzellen ein chemotherapeutisches Agens zugesetzt werden sollte. So untersuchten WACHECK und Kollegen im Rahmen ihrer Studien die Auswirkung von gegen *Bcl2*-gerichteten siRNAs in der humanen Melanomzelllinie 607B (WACHECK *et al.*, 2003). Das siRNA-Silencing führte zu einer Sensibilisierung der Zellen gegen das chemotherapeutische Agens Cisplatin, so dass annähernd alle Melanomzellen apoptotisch wurden. Die Verwendung der siRNA alleine führte hingegen zu einem relativ geringen Anstieg apoptotischer Zellen *in vitro*, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt.

4.2.5 Die Nähe der siRNAs zum *env*-Anteil des HERV-K-MEL korreliert mit der Unterdrückung der *Bcl2*-Expression

Neben der allgemeinen und nicht nach einzelnen siRNAs differenzierten Analyse der *Bcl2*-Expression nach *HERV-K-MEL* Silencing wurden Proben der beiden Zelllinien SK-Mel-28 und A-375 im Hinblick auf die verwendeten siRNAs individuell betrachtet. Es zeigte sich auch hier, dass sämtliche siRNAs nicht nur zu einem *HERV-K-MEL* Silencing, sondern auch zu einer signifikanten *Bcl2*-Reduktion führten. Im Gegensatz zur *HERV-K-MEL* Expression, die unabhängig von der Lage der verwendeten siRNA war, zeigte sich ein Einfluss auf die *Bcl2*-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation der siRNA auf dem *HERV-K-MEL* Transkript. So verursachten die in der Nähe des *env*-Bereichs lokalisierten *HERV-K-MEL* siRNAs (Nr. 1, 3 und 5) eine deutlich geringere Regulation der

4.2 Die Expression von HERV-K-MEL beeinflusst das Wachstum von Melanomzelllinien¹²⁷

Bcl2-Expression als die weiter davon entfernten. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte durch Arbeiten zur Transmembran-Region (TM) des HERV-*env* gegeben werden. In mehreren Veröffentlichungen konnte bisher gezeigt werden, dass die Expression des retroviralen Envelope-Proteins immunsuppressiv wirkt (MANGENEY und HEIDMANN, 1998; BLAISE *et al.*, 2001). Hierbei scheint besonders die TM-Region des ENV eine entscheidende Rolle zu spielen. Auch für das ENV der humanen endogenen Retroviren der Familie H (HERV-H) wurde diese Eigenschaft beobachtet (MANGENEY *et al.*, 2001). In einer weiteren Studie konnte dargelegt werden, dass ein spezifisches, melanomassoziiertes ERV (MelARV) *in vivo* notwendig ist, um der durch regulatorische T-Zellen vermittelten Immunantwort zu entkommen und somit die Tumorprogression begünstigt wird (MANGENEY *et al.*, 2005). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Regulation von MelARV keinen Einfluss auf den Transformationsstatus der Melanomzellen hat, es aber zu einer Inhibition des Tumorwachstums und einer erhöhten Überlebensrate immunkompetenter Mäuse kommt. Die Ergebnisse der Untersuchungen von MANGENEY und Kollegen weisen darauf hin, dass MelARV nicht nur auf der genetischen Ebene durch insertionsinduzierte Mutationen wirkt, sondern auf der epigenetischen Ebene, indem Immunsuppression im Wirt begünstigt wird (POTHLICHET *et al.*, 2006). Es wurde außerdem vermutet, dass auch bei anderen endogenen Retroviren den *env*-kodierenden Genen eine immunsuppressive Wirkung zukommt. Zudem wurden in den Seren von Melanompatienten Antikörper gegen HERV-K-ENV Proteine gefunden, die gegen die Ektodomäne des TM-Teils von ENV gerichtet waren. Diese hohe Antikörper-Prävalenz, die unabhängig von Krankheitsstadium des Patienten war, korrelierte mit früheren Beobachtungen, dass melanomassoziierte retrovirale Proteine in allen untersuchten Melanomen und Metastasen auftraten (HUMER *et al.*, 2006; BÜSCHER *et al.*, 2005).

Inwieweit auch in der vorliegenden Arbeit die Korrelation zwischen *HERV-K-MEL* Silencing und Reduktion der *Bcl2*-Expression auf die TM-Region von *HERV-K-MEL* zurückgeführt werden kann, wurde nicht analysiert. Es wäre aber durchaus interessant zu untersuchen, ob ein *HERV-K-MEL* Silencing mit TM-nahen siRNAs *in vivo* ebenfalls immunsuppressiv wirkt. Da die hier

gewonnenen Ergebnisse eine Korrelation von *Bcl2* und *HERV-K-MEL* in der Melanomzelllinie SK-Mel-28 zeigten, kann zudem eine Transaktivierung oder ein sonstiger epigenetischer Zusammenhang der beiden Gene vorliegen. So wäre es denkbar, dass transdominante oder trans-wirkende Faktoren eine Rolle spielen oder sich die Gene auf einem Cistron befinden. Dies sind jedoch lediglich Vermutungen, die durch weitere Analysen bestätigt werden müssten.

4.2.6 Die Expressionsprofile in Melanozyten und Melanomzellen unterschieden sich nur geringfügig

Nachdem eine signifikante Korrelation von *HERV-K-MEL* und *Bcl2* beobachtet werden konnte, wurde auch die Expression anderer an der Apoptose beteiligter Gene untersucht (3.2.3.7). Sie umfassten sowohl Gene des intrinsischen als auch des extrinsischen Apoptoseweges. Der intrinsische Signalweg, auch bekannt als mitochondrialer Apoptoseweg, kann von einer Vielzahl von Signalen wie UV-Licht, zytotoxischen Chemikalien, zellulären Stress und der Entziehung von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden. Dies hat die Ausschüttung einer Vielzahl von Proteinen in das Zytoplasma nach Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran zur Folge (REED *et al.*, 2005), die daraufhin über eine Signalkaskade letztlich zum Zelltod führen (VON AHSEN *et al.*, 2000). Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran wird dabei von einigen *Bcl2*-Familienmitgliedern vermittelt. *Bcl2* selbst wirkt ebenfalls in diesem Signalweg (CHIPUK *et al.*, 2004). Der extrinsische Apoptoseweg funktioniert hingegen unabhängig von den Mitochondrien und wird durch Oberflächenrezeptoren der Zelle wie Fas oder TRAIL initiiert, was zu einer Aktivierung einer Caspase-Kaskade und schließlich zum Zelltod führt (WAJANT, 2002).

Vor der Expressionsanalyse der apoptoseassoziierten Gene nach Silencing wurde die endogene Expression in den Melanozyten mit den Melanomzelllinien verglichen. Entgegen der Erwartungen, dass es bei den Melanomzellen zu einem deutlichen Unterschied in der Expression der apoptoseassoziierten Gene im Vergleich zu den Melanozyten kommen müsste, war dies für einen Großteil der Gene nicht zu beobachten. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass es sich bei den verwendeten NHEM Zellen um keine naiven Melanozyten

handelte, sondern hier ebenfalls eine Transformation vorliegt, die der in den Melanomzellen ähneln könnte. Somit können die gemessenen Werte der NHEM Zellen in diesem Fall nicht als Referenz für nicht-transformierte Zellen dienen. Es wäre daher für exakte Expressionsprofile der apoptoseassoziierten Gene und vergleichende Analysen der verwendeten Zelllinien nötig, direkt aus Patienten gewonnene Melanozyten zu verwenden.

4.2.7 Das *HERV-K-MEL* Silencing führt zu einer verminderten Expression von *Bcl2* und *Caspase 8*

Die Analyse der Expression der ausgewählten apoptoseassoziierten Gene nach Silencing in der Melanomzelllinie SK-Mel-28 zeigte, dass es zu veränderten Expressionsprofilen nach Inhibition von *HERV-K-MEL* kam. Eine vereinfachte schematische Übersicht potenziell betroffener Apoptosewege ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

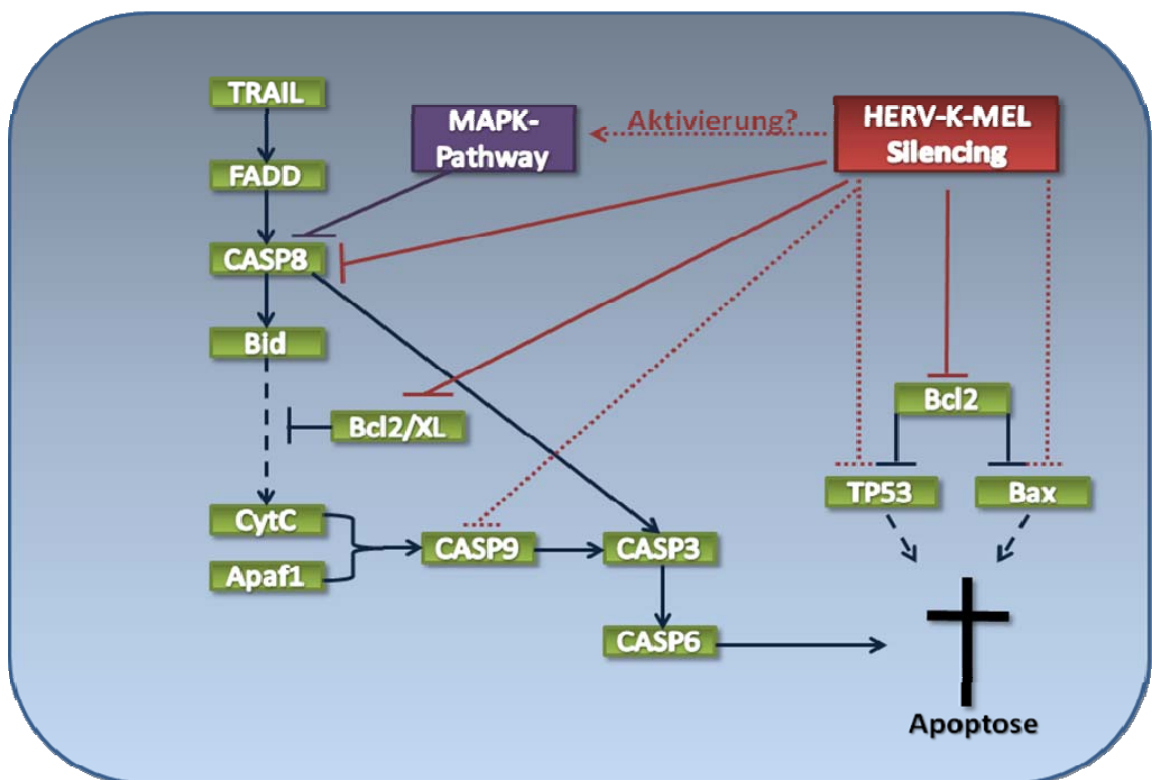


Abbildung 4-1: Schematische Übersicht des Apoptosesignalweges nach *HERV-K-MEL* Silencing in SK-Mel-28. Die Bestimmung der Expression erfolgte mittels qRT-PCR und Normalisierung gegen *GAPDH*. Die Verrechnung der Werte erfolgte gegen nicht transfizierte Zellen. Rote Linien kennzeichnen einen Einfluss von *HERV-K-MEL* auf das entsprechende Gen. Durchgezogene Linien deuten auf signifikante, gepunktete auf nicht-signifikante Beobachtungen hin.

Die mehrfach beobachtete und signifikant bestätigte Reduktion der *Bcl2*-Expression führt zu einer Verminderung der inhibitorischen Effekte und somit zu einer Induktion der Apoptose. Dementgegen steht jedoch die signifikant verminderte *Caspase 8* Transkription. Durch eine damit verbundene Störung des nachfolgenden Signalweges sollte ein verstärktes Überleben der Zellen erreicht werden. Ein Einfluss auf die nachfolgende Signalkaskade konnte indirekt bestätigt werden, da auch die *Caspase 9* Expression vermindert war. Es könnte sich hierbei aber auch um eine direkte Regulation durch *HERV-K-MEL* Silencing handeln. Zudem ist es möglich, dass *HERV-K-MEL* bereits oberhalb (*upstream*) der *Caspase 8* wirkt und es nach Silencing zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges oder einer Inhibition von *FADD* oder *TRAIL* kommen könnte. Neben diesem Zweig des Apoptoseweges ist auch die Beeinflussung weiterer Kaskaden wahrscheinlich. So zeigte sich eine Inhibition der *TP53*- und *Bax*-Expression, wobei diese nicht signifikant bestätigt werden konnte. Dies und die Regulation des *Caspase 8* abhängigen Weges sprechen gegen eine Induktion von Apoptose durch *HERV-K-MEL* Silencing und könnten erklären, warum zwar eine verminderte *Bcl2*-Expression, nicht jedoch Apoptose gemessen werden konnte. Eine Analyse weiterer Apoptosegene ist aber notwendig, um endgültige Aussagen treffen zu können. Zudem handelt es sich hier um Beobachtungen auf RNA-Ebene, die im Proteom geprüft werden müssten.

4.2.8 Die potenzielle Rolle von *HERV-K-MEL* in der Differenzierung von Melanomzellen

Neben dem in dieser Arbeit gezeigten Zusammenhang von *HERV-K-MEL* und an der Apoptose beteiligten Gene muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das *HERV-K-MEL* Silencing auf weiteren Ebenen zu einer Veränderung der Zellen führen kann. So konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie von SERAFINO und Kollegen darlegen, dass es in Melanomzellen zu Veränderungen in Folge von äußeren Stress-Stimuli kommt. Dabei konnte *in vitro* ein als Transition bezeichneter Übergang von einem adhärenen zu einem nicht-adhärenen und maligneren Phänotyp beobachtet werden. Die entstehenden nicht-adhärenen Zellen zeichneten sich durch ein erhöhtes

4.2 Die Expression von HERV-K-MEL beeinflusst das Wachstum von Melanomzelllinien¹³¹

Proliferationspotential und verstärkte Bildung von virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) aus. Zudem konnte eine erniedrigte Expression von HLA-Klasse I-Molekülen und verminderter Präsentation des Melanomdifferenzierungsantigens Melan-A/MART-1, das von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt wird, festgestellt werden. Es handelt sich bei der Transition um einen irreversiblen Vorgang auf genetischer und epigenetischer Ebene, der jedoch durch eine Regulation der *HERV-K* Expression mittels RNA-Interferenz verhindert werden konnte. Allerdings konnte gezeigt werden, dass nicht jede Zelllinie die Transition zu nicht-adhärenenten Zellen, die auch mit einer erhöhten *env*-Expression einhergeht, vollführen konnte. So bildete die Melanomzelllinie A-375, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, keine nicht-adhärenenten Zellen (SERAFINO *et al.*, 2009). Über SK-Mel-28 wurden diesbezüglich keine Angaben gemacht. Da von dieser Zelllinie jedoch bekannt ist, dass es zur Bildung von VLPs *in vitro* kommt, was wiederum als ein Zeichen einer Transition gewertet wird, kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen dazu befähigt sind. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse ist es durchaus denkbar, dass es sich bei den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen zu *HERV-K-MEL* in SK-Mel-28 ebenfalls um Effekte handeln könnte, die mit dem Vorgang der Transition und Differenzierung der Zellen assoziiert sind. An dieser Stelle wäre eine elektronenmikroskopische Untersuchung der VLP-Bildung vor und nach Transfektion angebracht. Zudem wäre in Betracht zu ziehen, die transfizierten Zellen mit gegen HLA-I und Melan-A/MART-1 gerichteten Antikörpern zu untersuchen. Da die Daten von SERAFINO und die weitere potenzielle Wirkung von *HERV-K-MEL* erst kurz vor Beendigung dieser Arbeit veröffentlicht wurden, konnte eine Analyse der aufgeführten Punkte nicht mehr durchgeführt werden.

4.2.9 Die Behandlung von SK-Mel-28 mit Aminoguanidin führt zu einer signifikant erhöhten Expression von *Bcl-XL* und *Caspase 9*

Eine weitere Beobachtung, die neben der Untersuchung des Einflusses von *HERV-K-MEL* auf Melanomzellen gemacht werden konnte, betrifft die Wirkung der apoptoseinduzierenden Chemikalie Aminoguanidin-Hemisulfat. AMG wurde

4.2 Die Expression von HERV-K-MEL beeinflusst das Wachstum von Melanomzelllinien 132

im Verlauf der Experimente als Positivkontrolle eingesetzt. Es handelt sich dabei um einen iNOS-Inhibitor (*Inducible NO Synthase*), der in der Lage ist, in Melanomzellen Apoptose zu induzieren. Die Inhibition der endogenen NO-Synthase hat dabei keinen Einfluss auf den Zellzyklus, führt aber zu apoptosebedingtem Zelltod. Auf Melanozyten hat die Gabe von AMG keine Auswirkungen. In der Arbeit SALVUCCI wurde unter anderem untersucht, welche Gene des Apoptoseweges von AMG beeinflusst werden.

Tabelle 4-1: Gegenüberstellung der Expressionsprofile ausgewählter Apoptosegene dieser Arbeit und von SALVUCCI (2001). *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; n.g.: nicht gemessen.

Gen	Vorliegende Arbeit	SALVUCCI
<i>Bcl2</i>	+	+
<i>Bcl-XL</i>	+***	+
<i>Bad</i>	±/-	-
<i>Bax</i>	+	+**
<i>Caspase 8</i>	+	n.g.
<i>Caspase 9</i>	+*	n.g.
<i>TP53</i>	-	±
<i>NF-κB</i>	±	±
<i>Bcl-W</i>	n.g.	-
<i>Caspase 1</i>	n.g.	+***
<i>Caspase 3</i>	n.g.	+***
<i>Caspase 6</i>	n.g.	+**
<i>Caspase 10</i>	n.g.	+
<i>c-myc</i>	n.g.	±
<i>Fas</i>	n.g.	±
<i>gadd45</i>	n.g.	+
<i>gadd45β</i>	n.g.	+*
<i>Mdm2</i>	n.g.	+***
<i>TRAIL</i>	n.g.	+*

So wurde eine signifikant erhöhte Expression von *Bax*, *Caspase 1*, *3* und *6* sowie *Gadd45β*, *Mdm2* und *TRAIL* gemessen. Nicht signifikant veränderte Transkriptmengen wurden für *Bad*, *Bcl2*, *Bcl-W*, *Bcl-XL*, *c-myc*, *Fas*, *gadd45*, *NF-κB* und *Caspase 10* gefunden. Zudem wurden mehrere Gene wie *Fas-L*, *Caspase 5* und *7* sowie *TP53* nicht durch AMG induziert (SALVUCCI *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde ebenfalls der Einfluss von AMG auf einzelne apoptoseassoziierte Gene in Melanomzellen analysiert. Eine

4.2 Die Expression von HERV-K-MEL beeinflusst das Wachstum von Melanomzelllinien¹³³

Gegenüberstellung der in dieser Arbeit und der von Salvucci gemessenen Expressionsprofile wurde in Tabelle 4-1 vorgenommen. Im direkten Vergleich der Expressionsprofile wird deutlich, dass die Tendenzen der Expressionsänderungen für die in beiden Arbeiten untersuchten Gene übereinstimmen. Neu ist jedoch die signifikante Erhöhung von *Bcl-XL* und *Caspase 9*, die in dieser Arbeit entdeckt wurde. Es wurde daher ein Schema entwickelt, welches einen kurzen Überblick über die Änderungen in den Apoptosewegen nach AMG-Behandlung von Melanomzellen geben soll (Abbildung 4-2), wobei die Erkenntnisse dieser Arbeit mit der von SALVUCCI kombiniert wurden.

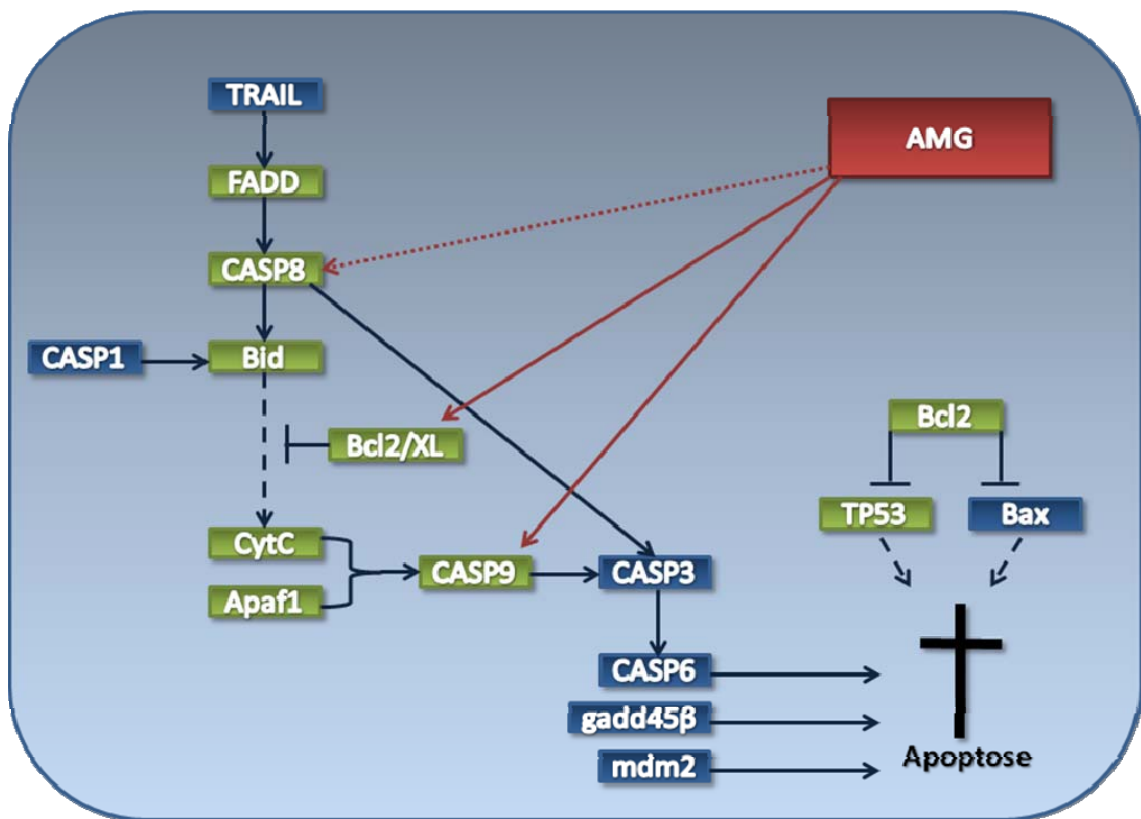


Abbildung 4-2: Schematische Übersicht des Apoptosewege nach AMG-Behandlung in SK-Mel-28. Die Bestimmung der Expression erfolgte mittels qRT-PCR und Normalisierung gegen *GAPDH*. Die Verrechnung der Werte erfolgte gegen nicht transfizierte Zellen. Rote Linien kennzeichnen einen Einfluss von AMG auf das entsprechende Gen. Durchgezogene Linien deuten auf signifikante, gepunktete auf nicht signifikante Beobachtungen hin. Blau hinterlegt sind die Gene, deren Expression laut SALVUCCI (2001) nach AMG-Behandlung signifikant beeinflusst wird.

Entgegen der Erwartungen führte eine AMG-Behandlung zu einer Erhöhung der *Bcl2*-Expression, obwohl es sich um ein antiapoptotisch wirkendes Gen handelt. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Bcl-XL*, welches ebenso wie *Bcl2* auf Proteinebene ein Heterodimer mit BAD bildet und so Apoptose induziert, signifikant erhöht exprimiert wurde. Die Erhöhung dieser beiden Gene wirkt normalerweise der Apoptose entgegen. Inwieweit die vermehrte *Bcl2* und *Bcl-XL* Transkriptbildung tatsächlich zu einer Inhibition des Signalweges führt, wurde weder in der vorliegenden noch in der Arbeit von SALVUCCI und Kollegen untersucht. Zudem konnte neben einer signifikant erhöhten Expression von *Caspase 9* in dieser Arbeit auch vermehrt *TRAIL*, *Caspase 1*, *3*, *6* und *8* sowie *gadd45 β* und *Bax* in der Analyse SALVUCCIS gemessen werden. Es könnte somit möglich sein, dass die Expressionssteigerungen der genannten Gene der vermehrten Transkription von *Bcl2* und *Bcl-XL* entgegenwirkten und zu einer Apoptoseinduktion führen. Jedoch ist hier genau wie bei der Analyse des Einflusses von *HERV-K-MEL* auf Melanomzellen eine Untersuchung der Proteinexpression notwendig, um die Vorgänge genauer aufzuklären.

4.3 Der Einfluss der SIV-Infektion auf die *HERV-K* Expression

Neben der in den ersten beiden Teilen der Arbeit beschriebenen Untersuchung des Einflusses einer erhöhten *HERV-K* Expression *in vitro*, die in Melanomzelllinien erfolgte, sollte die Relevanz der Expression im Gesamtorganismus analysiert werden. Jedoch ist die Entstehung von malignen Melanomen *in vivo* ein multifaktorieller Prozess, der einen Vergleich erkrankter Individuen untereinander erschwert. Außerdem war der Zugang zu humanem Patientenmaterial nur eingeschränkt möglich. Daher wurde ein alternatives System zur Untersuchung der *HERV-K* Expression in einem Organismus gesucht. Die Analyse einer Infektionskrankheit bietet dabei viele Vorteile. So ist es bei einer gezielten und kontrollierten Infektion möglich, Material eines Individuums vor und nach Erkrankung zu untersuchen. Zudem ist bei der Verwendung gleicher Virusmengen und Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen eine Vergleichbarkeit der Infizierten untereinander und

gegenüber Nicht-Infizierten gegeben. Zeitverlaufsanalysen und die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs der Viruslast und der *HERV*-Expression können ebenfalls sehr aufschlussreich sein.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen einer HIV-1 Infektion und einer *HERV*-Aktivierung besteht. So konnten von Leukozyten freigesetzte *HERV*-spezifische VLPs in HIV-1 Patienten mit akuter Appendizitis gefunden werden (ORENSTEIN, 2000). Außerdem wurden *HERV*-reaktive Antikörper in infizierten Personen nachgewiesen (LÖWER *et al.*, 1996; STEVENS *et al.*, 1999), wobei der *HERV*-K Familie auch hier eine besondere Rolle zuzukommen scheint. Virale Partikel von *HERV*-K sollen im zirkulierenden Blut zu finden sein, womit die Induktion spezifischer Antikörper erklärt wird (CONTRERAS-GALINDO *et al.*, 2006b). JOHNSTON und Kollegen fanden zudem eine Aktivierung von *HERV*-K und eine erhöhte Transkriptbildung in Verbindung mit der HIV-1 assoziierten Demenz (JOHNSTON *et al.*, 2001). CONTRERAS-GALINDO gelang es schließlich, in zahlreichen Studien eine Verbindung zwischen *HERV*-K (HML-2) und HIV-1 herzustellen. Die pathologischen Auswirkungen von *HERV*-K auf die HIV-1 Infektion sind jedoch nach wie vor unklar. Es wird jedoch vermutet, dass virale HIV-1 Proteine zu einer Transaktivierung des *HERV*-K Promotors und somit zu einer Produktion von *HERV*-K Partikeln führen können, die quantitativ abhängig von der eingebrachten HIV-1 Proteinmenge ist (CONTRERAS-GALINDO *et al.*, 2006a). Fraglich bleibt, ob die erhöhte Expression von *HERV*-K durch HIV-1 spezifische pathologische Beeinträchtigungen im Rahmen der HIV-1 Infektion verursacht werden, wie z.B. durch Immunsuppression, oder ob es zu einem direkten Einfluss durch die infektiösen HIV-1 Partikel oder viralen Proteine kommt (CONTRERAS-GALINDO *et al.*, 2007).

Trotz dieser Vielzahl an Untersuchungen zur Rolle von *HERVs*, insbesondere der *HERV*-K Familie bei HIV-1 Infektionen im Menschen, gibt es bisher keine publizierten Ergebnisse zur potentiellen Aktivierung von endogenen Retroviren nach SIV-Infektion *in vivo* oder *in vitro*. Daher wurde dieser Zusammenhang im letzten Teil der Arbeit analysiert.

4.3.1 Bei SIV-infizierten Makaken ist die *HML-2* Expression nicht erhöht

Da am Deutschen Primatenzentrum (DPZ) Impfstoffstudien mit SIV-infizierten Makaken durchgeführt werden, konnte Material dieser Tiere genutzt werden, um die *HERV*-Expression *in vivo* genauer zu charakterisieren. Dazu wurden *HERV-K* (*HML-2*) spezifische Primer, die zuvor von CONTRERAS-GALINDO und Kollegen (2007) zur Amplifikation und Expressionsbestimmung in der qRT-PCR genutzt wurden, an das Makakengenom angepasst. Zur Analyse der Expression wurden RNAs sowohl von infizierten als auch nicht-infizierten Tieren eingesetzt, die von Bianka Mußil im Rahmen ihrer Doktorarbeit am DPZ isoliert wurden. Zudem wurden einige LTNPs (*Long Term Non Progressors*) untersucht. Diese Tiere sind in der Lage, die Viruslast nach einer Infektion stabil zu kontrollieren und somit lange zu überleben, ohne AIDS zu entwickeln. Bei der Analyse der *HML-2* Expression mit der qRT-PCR zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der infizierten und nicht-infizierten Affen. Jedoch war eine signifikante Veränderung zwischen LTNPs und den SIV-infizierten Makaken zu beobachten. Die Probenanzahl der zur Verfügung stehenden Tiere war in diesem Fall jedoch sehr begrenzt, da nur selten der genetischen Hintergrund zu finden ist, der eine erfolgreiche Viruskontrolle begünstigt. Es wäre daher wichtig, weitere Makaken mit diesen Eigenschaften auf ihre *HML-2* Expression zu untersuchen. Es lässt sich aus den bislang erhobenen Daten schließen, dass die SIV-Infektion von Makaken *in vivo* nicht zu einer erhöhten *HML-2* Transkriptbildung führt. An dieser Stelle wäre es jedoch interessant, die CD8⁺-T-Zellantwort genauer zu betrachten. So untersuchten GARRISON und Kollegen die T-Zell-Antwort gegen *HERVs* im Verlauf einer HIV-1 Infektion. Es zeigte sich, dass die *HERVs* in HIV-1 positiven Menschen weitaus stärker produziert werden als in HIV-1 negativen (GARRISON *et al.*, 2007). Es wurde vermutet, dass nach einer Infektion einer permissiven Zelle die Integration im genomischen Kontext mit endogenen Retroviren stattfindet. In den infizierten Zellen kommt es zu einer Vielzahl von Änderungen des zellulären Umfelds, so dass die Virusproduktion gesteigert wird, was wiederum auch die endogenen Retroviren im Genom affektieren kann. Außerdem besitzen einige *HERVs* Sequenzen, die vom HIV-1 Rev erkannt

werden, welches ein nukleäres Exportprotein für *HERV*-Transkripte in HIV-1 infizierten Zellen liefert (YANG *et al.*, 1999). Zudem wurde eine HLA-Präsentation von *HERV*-Antigenen auf der Oberfläche von HIV-1 infizierten Zellen beschrieben, was eine CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen *HERVs* hervorruft. Aufgrund der sehr ähnlichen Epitope kommt es zu einer Kreuzreaktivität der T-Zell-Rezeptoren. Eine inverse Korrelation zwischen anti-*HERV* T-Zell-Antworten und der HIV-1 Viruslast im Plasma deuten darauf hin, dass die *HERV*-spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort eine Rolle für die HIV-1 Virämie spielt (GARRISON *et al.*, 2007). Eine Charakterisierung der T-Zell-Antwort für SIV wurde bislang noch nicht durchgeführt, wäre aber im direkten Vergleich mit den im Menschen für HIV-1 gesammelten Ergebnissen aufschlussreich. Zudem wäre eine Zeitverlaufsstudie der *HERV-K* Expression einzelner Individuen vor und nach SIV-Infektion in Betracht zu ziehen.

4.3.2 Bei einer SIV-infizierten humanen T-Zelllinie ist *HML-2* Expression nicht erhöht, wohl aber die von *HML-3*

Da die ersten Analysen der *HML-2* Expression *in vivo* auf keine Korrelation mit dem SIV-Status der Individuen schließen lassen, wurde die Auswirkung einer SIV-Infektion in der humanen T-Zelllinie C8166 analysiert. Die dabei untersuchten RNAs wurden im Verlauf von Experimenten der AG Motzkus am DPZ isoliert. Eine Korrelation der Viruslast und der *HERV-K* (*HML-2*) Expression war nicht zu beobachten. CONTRERAS-GALINDO beschrieb für HIV-1, dass eine Stimulation von PBMCs mit einem PMA/Ionomycin-Gemisch zu einer Aktivierung der Zellen und damit verbunden zu einer Erhöhung der extrazellulären Zytokinausschüttung führt. Daraufhin war eine stärkere *HERV-K* Expression im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen zu messen (CONTRERAS-GALINDO *et al.*, 2007). Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine zusätzliche Stimulation der Zellen auch bei einer SIV-Infektion in C8166-Zellen zu einer erhöhten *HML-2* Aktivierung führen würde.

In Kooperation mit dem Labor von Prof. Leib-Mösch in Neuherberg wurden die RNAs aus den nicht stimulierten SIV-infizierten C8166-Zellen auf einem *HERV*-spezifischen Mikroarray analysiert. Dieser Array basiert auf den von SEIFARTH und Kollegen (2005) veröffentlichten Sequenzen. Die ersten Daten der

Expressionsanalyse auf dem Mikroarray zeigten im Bezug auf die HERV-K Familie eine stark erhöhte Expression der Gruppen *HML-3*, *-4*, *-5*, *-6* und *-10* der SIV-infizierten Proben im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen. Auch im Array konnte unter Verwendung *HML-2* spezifischer Sonden keine Hybridisierung nachgewiesen werden, so dass die Ergebnisse der vorherigen qRT-PCR bestätigt werden konnten, wonach es nach SIV-Infektion *in vitro* nicht zu einer erhöhten Expression von *HML-2* kommt. Da aber eine verstärkte *HML-3* Transkription beobachtet werden konnte und die erhöhte Expression dieser Gruppe bereits von CONTRERAS-GALINDO (2006a) im Zusammenhang mit HIV-1 Infektion beschrieben wurde, wurden die Arraydaten für einige *HML-3* Sequenzen mittels qRT-PCR überprüft. Zudem wurden die *HML-2* Amplifikate erneut im Vergleich gemessen. Es zeigte sich, dass am Tag 11 p.i. nur geringe Expressionssteigerungen sowohl in der *HML-2* Gruppe als auch in den untersuchten Mitgliedern der *HML-3* Gruppe zu finden waren. Die Arraydaten des Tages 11 p.i. konnten mit den in dieser Arbeit verwendeten Primern nicht verifiziert werden. Allerdings zeigte sich am Tag 16 p.i. ein Anstieg der Transkriptbildung von bis zu 90% im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Abbildung 3-33). Die RNAs eines zweiten, unabhängigen Infektionsversuchs wurden ebenfalls im Hinblick auf die *HML-2* und *-3* Expression *in vitro* mittels qRT-PCR untersucht (Abbildung 3-34). Es zeigte sich keine einheitliche Tendenz der Transkriptbildung im Verlauf der Infektion, weshalb an dieser Stelle keine abschließenden Aussagen getroffen werden können. Außerdem wurde in dieser Arbeit nicht überprüft, ob es sich bei den in der qRT-PCR untersuchten Transkripte tatsächlich um die individuellen Mitglieder der *HML*-Gruppen handelte, die als Sonde auf den Mikroarray aufgetragen wurden. Eine mikroarraygestützte Analyse weiterer SIV-Infektionsversuche wird im Rahmen der Dissertation von Frau Michelle Vincendeau im Labor von Prof. Leib-Mösch durchgeführt. Sollten sich die bisherigen Ergebnisse verifizieren lassen, so hätte eine SIV- im Gegensatz zur HIV-1 Infektion keine Auswirkungen auf die *HML-2* Expression. Jedoch werden die *HML-3* Transkripte nach den Ergebnissen der ersten qRT-PCR und des Mikroarrays ebenso von der Virusinfektion beeinflusst wie es bereits für HIV-1 beschrieben wurde. Neben der Betrachtung der Expression dieser beiden *HML*-Gruppen sollten auch die

anderen Mitglieder der HERV-K Familie analysiert werden, da es nach ersten Erkenntnissen ebenfalls zu Expressionsänderungen nach SIV-Infektion kommt. Inwieweit zudem zu einer HERV-vermittelten Immunsuppression eine Rolle spielt, ist hierbei ein weiteres interessantes, zu untersuchendes Detail.

4.4 Abschließende Bewertung und Ausblick

Der Schwerpunkt der hier vorliegenden Arbeit lag auf der Charakterisierung und Untersuchung der HERV-K Familie *in vitro* und *in vivo*. Diese evolutionär recht junge Gruppe von Retroelementen wird häufig mit dem Auftreten verschiedener humaner Erkrankungen in Verbindung gebracht.

Die im ersten Teil der Arbeit entwickelte und etablierte Methode zur Amplifikation von *HERV-K (HML-6)* Transkripten in Melanozyten und Melanomzelllinien erlaubt eine rasche Identifizierung spezifisch exprimierter Mitglieder. Es zeigte sich in den Analysen einzelner Klone, dass in fast allen Fällen eine Expression der Sequenzen bereits in Verbindung mit malignen Melanomen beschrieben worden war. Eine Kombination dieser Methode mit herkömmlichen Expressionsanalysen wie z.B. SAGE ist möglich. Zudem kann auf diese Weise das Transkriptionsverhalten weiterer Melanomzelllinien untersucht werden, so dass zelllinienspezifische Expressionsmuster erzeugt werden könnten. Dies erlaubt unter Umständen eine schnelle diagnostische Analyse von Patientenproben zur Identifikation spezifischer Melanommarker. Desweiteren ist eine Anpassung der Methode für andere HERV-Familien, Gewebe und Zellen denkbar.

Der im zweiten Teil der Arbeit untersuchte Melanommarker *HERV-K-MEL* zeigte nach Silencing mittels RNA-Interferenz einen deutlichen Einfluss auf die Konfluenz der transfizierten Melanomzellen und eine signifikante Korrelation mit dem antiapoptotisch wirkenden *Bcl2* und der proapoptotischen *Caspase 8* im der Zelllinie SK-Mel-28. Eine Untersuchung weiterer apoptoseassoziiierter Gene wurde durchgeführt und ein Schema für die Zusammenhänge von *HERV-K-MEL* und dem Apoptoseweg entwickelt. Eine Überprüfung und Erweiterung dieser Analysen ist essentiell. So sollte unter anderem der PI3K-AKT-mTOR-

Weges genauer betrachtet werden, da diesem eine maßgebliche Rolle im Überleben und der Resistenz von Tumorzellen zukommt (MEIER *et al.*, 2009; BROGNARD *et al.*, 2001). Sollte *HERV-K-MEL* in diesen Signalweg eingreifen, könnte die Behandlung von malignen Melanomen verbessert werden. Außerdem sollte eine Expressionsstudie im Proteom durchgeführt werden.

Eine Analyse der Bildung von viralen Partikeln und HLA-I- und melanomspezifischer Antikörpern nach Silencing ist ebenfalls denkbar. Die Untersuchung der Bedeutung der TM-Region könnte Aufschluss über eine potentiell durch *HERV-K-MEL* vermittelte Immunsuppression geben.

Eine Verbindung der RNA-Interferenz mit chemotherapeutischen Agenzien *in vitro* und *in vivo* sollte in Betracht gezogen werden. Für weiterführende Untersuchungen wäre es jedoch wichtig, ein stabiles System für die RNA-Interferenz zur Verfügung zu haben. So führten die lipid-basierten siRNA-Transfektionen trotz gleichbleibender und zuvor optimierter Reaktionsbedingungen zu sehr unterschiedlichen Silencingeffizienzen. Es wurde daher nach Alternativen gesucht. Die Verwendung der Elektroporation (nicht gezeigt) war ungeeignet, da viele Zellen methodisch bedingt abstarben. Adenovirale shRNA-Vektoren, die in ersten Experimenten Verwendung fanden, liefern hier eine weitere Option. Im Gegensatz zu siRNAs können sie eine stabile Transduktion der Zellen initiieren und so unter Umständen sogar *in vivo* eingesetzt werden. So könnte untersucht werden, ob eine zielgerichtete Inhibition von *HERV-K-MEL*, z.B. über die Injektion von synthetischen siRNAs oder virale shRNA-Transduktion in das Zielgewebe, in Kombination mit klassischer Chemotherapie oder Strahlenbehandlung zu einer Regression von Tumoren *in vivo* führen kann. Hierbei könnte über einen gleichzeitigen Einsatz der RNA-Interferenz und Agenzien wie Cisplatin nachgedacht werden, die bei der Verwendung von *Bcl2*-inhibierenden siRNAs bereits zu einer Chemosensibilisierung der Melanomzellen geführt haben (WACHECK *et al.*, 2003). Es könnte zudem über eine Kombination des *HERV-K-MEL* Silencings mit der Gelbfieber-Vakzine nachgedacht werden, da in neuesten Studien gezeigt werden konnte, dass diese zu einer zehnfach verminderten Inzidenz von malignen Melanomen führt (MASTRANGELO *et al.*, 2009).

Eine Aufklärung der Rolle von *HERV-K-MEL* in Transitions- und Differenzierungsprozessen wie für andere *HERV-K* Mitglieder von SERAFINO (2009) gezeigt, steht bei malignen Melanomen aus.

Zudem sollte untersucht werden, ob die Korrelation von *HERV-K-MEL* und *Bcl2* auf die Zelllinie SK-Mel-28 beschränkt oder dies auch bei anderen Melanomzelllinien zu beobachten ist. Hierbei sollten vor allem Zelllinien in Betracht gezogen werden, bei denen ebenfalls eine Bildung von VLPs zu beobachten ist. Eine potenziell interessante Zelllinie ist M14, die als transitionskompetent beschrieben wurde (SERAFINO *et al.*, 2009).

Zudem wäre die Herstellung eines Überexpressionsklons von *HERV-K-MEL* in Melanozyten erstrebenswert. In Verbindung mit dem Einsatz von in zahlreichen Veröffentlichungen beschriebenen äußeren Stimuli könnte so untersucht werden, ob eine Induktion des Transformationsprozesses in Melanozyten möglich ist. Die Generierung eines Klons wurde in dieser Arbeit begonnen, war jedoch trotz intensiver Bemühungen letztlich erfolglos. Auch die Auftragssynthese durch die Firma Geneart scheiterte, so dass in weiteren Untersuchungen analysiert werden sollte, ob unter Umständen eine Verwendung von abgewandelten oder deletierten Mutanten sinnvoll wäre. In diesem Zusammenhang würde es sich anbieten, den Einfluss der TM-Domäne der *env*-Region genauer zu betrachten.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde der Zusammenhang der *HERV-K* Expression und einer SIV-Infektion *in vivo* untersucht, da sich Infektionserkrankungen besonders gut für vergleichende Analysen unter konstanten Bedingungen eignen. Hierbei wurde Material SIV-infizierter Makaken und entsprechender Kontrolltiere genutzt. Eine Korrelation der *HML-2* Expression mit dem SIV-Status konnte nicht beobachtet werden, obwohl diese für HIV-1 zahlreich beschrieben wurde. Die zudem untersuchte Gruppe der LTNPs wies jedoch eine signifikant erhöhte Transkription im Vergleich mit infizierten Tieren auf. Zur Verifizierung dieser Beobachtungen ist jedoch die Analyse weiterer Affen nötig. Ein Vergleich der Expression vor und nach Infektion am gleichen Tier würde die Aussagekraft der Expressionsanalysen zusätzlich erhöhen. Zudem sollten weitere *HML*-Gruppen und die CD8⁺-T-Zellantwort im Hinblick auf *HERV-*

spezifische Reaktionen betrachtet werden. Auch die Rolle von HERV-K bei einer verstärkten Immunsuppression ist zu analysieren.

In vitro erfolgte zum Vergleich mit den *in vivo* gewonnenen Ergebnissen eine Untersuchung der *HML-2* und *-3* Expression in einer humanen T-Zelllinie, die mit SIV infiziert wurde. Eine Expressionserhöhung von *HML-2* konnte weder mit der qRT-PCR noch über einen HERV-spezifischen Mikroarray beobachtet werden. Die Ergebnisse für *HML-3* waren teilweise widersprüchlich, deuten aber tendenziell auf eine erhöhte Expression von *HML-3* nach SIV-Infektion hin. Dennoch scheint die Untersuchung weiterer Infektionsversuche notwendig. Dies wird derzeit in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Leib-Mösch in Neuherberg durchgeführt. Eine abschließende Beurteilung wird in der Dissertation von Michelle Vincendeau erfolgen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse des humanen Genomprojekts zeigen, dass ca. 8% des gesamten menschlichen Erbguts aus retroviralen Sequenzen bestehen. Diese Proviren sind mit Ausnahme der HERV-K Familie aufgrund diverser Mutationen defekt und nicht mehr replikationskompetent. Die humanen endogenen Retroviren K (HERV-K) weisen hingegen als einzige Familie Proviren mit vollständigen offenen Leserahmen für retrovirale strukturelle und enzymatische Proteine auf. Diese evolutionär relativ jungen HERVs werden häufig mit dem Auftreten verschiedener Erkrankungen in Verbindung gebracht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein System zur Amplifikation der LTR-Regionen durch eine 5'-RACE-PCR entwickelt, das eine Analyse differenziell exprimierter *HERV-K HML*-Transkripte in Melanomzelllinien erlaubte. Die verwendeten Zelllinien wiesen jeweils ein spezifisches Expressionsmuster auf. Einzelne stark exprimierte Transkripte sind dabei potenziell neue Tumormarker. Die Relevanz dieser Ergebnisse muss in weiteren Untersuchungen verifiziert werden. Die entwickelte Methode lässt sich auch zur Analyse anderer Zellen, Gewebe und HERVs anpassen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Expression eines spezifischen HML-6 Mitglieds, des so genannten *HERV-K-MEL*, *in vitro* untersucht. Im Vergleich zu einem Melanozytenisolat konnte eine deutlich erhöhte Expression in Melanomzellen gemessen werden. Mithilfe der RNA-Interferenz wurde gezeigt, dass ein Silencing von *HERV-K-MEL* in der Melanomzelllinie SK-Mel-28 zu geringerer Wachstumsdichte und einer signifikant verminderten Expression der apoptoseassoziierten Gene *Bcl2* und *Caspase 8* führte. Eine damit verbundene Induktion von Apoptose konnte zwar nicht direkt nachgewiesen werden, wurde aber auch nicht widerlegt. Eine tiefer gehende Analyse der Apoptosewege und eine Proteomanalyse vor und nach RNA-Interferenz würden hier Klarheit schaffen.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die *HERV-K* Expression im Infektionsmodell *in vivo* untersucht. Da die Entstehung von Melanomen durch viele Faktoren beeinflusst wird und somit vergleichende Analysen schwer möglich sind, wurde die Untersuchung in einer Virusinfektion bevorzugt. Als Modell wurde hierfür die SIV-Infektion von Rhesus-Makaken (*Macaca mulatta*) genutzt, da für HIV-1

bereits in zahlreichen Arbeiten eine erhöhte Expression der HERV-K (HML-2) und (HML-3) Gruppe auf RNA- und Proteinebene beschrieben wurde. Veröffentlichungen bezüglich SIV und dem nahe verwandten HIV-2 gibt es in diesem Kontext bisher nicht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine SIV-Infektion von Rhesus-Makaken keine Auswirkungen auf die *HML-2* Transkription hat. Vergleichende Analysen einer SIV-infizierten humanen T-Zelllinie mittels Mikroarray und qRT-PCR konnten ebenfalls keine Zusammenhänge zwischen der *HML-2* Expression und der Infektion zeigen. Erste Ergebnisse deuten jedoch unter anderem auf eine verstärkte *HML-3* Expression *in vitro* hin, die von einem externen Kooperationspartner weiter untersucht werden wird.

Trotz zahlreicher Hinweise auf eine Beteiligung von HERV-K an verschiedenen Erkrankungen ist deren Rolle auf genetischer und epigenetischer Ebene nach wie vor weitestgehend ungeklärt. Mit dieser Arbeit konnte ein Beitrag zur Aufklärung sowie ein neuer Ansatz zum Verständnis der kausalen Zusammenhänge einer *HERV-K* Expression in Melanomzellen und bei SIV-Infektionen geleistet werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., et al.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Amundson, S.A., Myers, T.G., Scudiero, D., et al.** (2000). An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* **60**: 6101-6110.
- Andersen, M.H., Fensterle, J., Ugurel, S., et al.** (2004). Immunogenicity of constitutively active V599EBRaf. *Cancer Res* **64**: 5456-5460.
- Andersson, A.C., Svensson, A.C., Rolny, C., et al.** (1998). Expression of human endogenous retrovirus ERV3 (HERV-R) mRNA in normal and neoplastic tissues. *Int J Oncol* **12**: 309-313.
- Andersson, M.L., Lindeskog, M., Medstrand, P., et al.** (1999). Diversity of human endogenous retrovirus class II-like sequences. *J Gen Virol* **80 (Pt 1)**: 255-260.
- Andersson, M.L., Medstrand, P., Yin, H., et al.** (1996). Differential expression of human endogenous retroviral sequences similar to mouse mammary tumor virus in normal peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**: 833-840.
- Armbruester, V., Sauter, M., Krautkraemer, E., et al.** (2002). A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res* **8**: 1800-1807.
- Armstrong, B.K., and Kricger, A.** (1995). Skin cancer. *Dermatol Clin* **13**: 583-594.
- Baldo, M., Schiavon, M., Cicogna, P.A., et al.** (1992). Spontaneous regression of subcutaneous metastasis of cutaneous melanoma. *Plast Reconstr Surg* **90**: 1073-1076.
- Banerjea, A., Li, M.J., Bauer, G., et al.** (2003). Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages. *Mol Ther* **8**: 62-71.

- Bannert, N., and Kurth, R.** (2004). Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 Suppl 2**: 14572-14579.
- Barbulescu, M., Turner, G., Seaman, M.I., et al.** (1999). Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr Biol* **9**: 861-868.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., et al.** (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871.
- Bataille, V.** (2003). Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Cancer* **39**: 1341-1347.
- Baulcombe, D.C.** (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 109-113.
- Benimetskaya, L., Ayyanar, K., Kornblum, N., et al.** (2006). Bcl-2 protein in 518A2 melanoma cells in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res* **12**: 4940-4948.
- Berking, C.** (2005). [The role of ultraviolet irradiation in malignant melanoma]. *Hautarzt* **56**: 687-696; quiz 697.
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., et al.** (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* **11**: 50-55.
- Blaise, S., Mangeney, M., and Heidmann, T.** (2001). The envelope of Mason-Pfizer monkey virus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol* **82**: 1597-1600.
- Blond, J.L., Beseme, F., Duret, L., et al.** (1999). Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol* **73**: 1175-1185.
- Boden, D., Pusch, O., Lee, F., et al.** (2003). Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol* **77**: 11531-11535.
- Boeke, J., and Stoye, J.** (1997). Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements. In *Retroviruses*, J. M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, eds. (New York, Cold Spring Harbour Lab), pp. 343-346.

- Boller, K., Frank, H., Lower, J., et al.** (1983). Structural organization of unique retrovirus-like particles budding from human teratocarcinoma cell lines. *J Gen Virol* **64 (Pt 12)**: 2549-2559.
- Boller, K., Konig, H., Sauter, M., et al.** (1993). Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* **196**: 349-353.
- Brandt, S., Grunwald, T., Lucke, S., et al.** (2006). Functional replacement of the R region of simian immunodeficiency virus-based vectors by heterologous elements. *J Gen Virol* **87**: 2297-2307.
- Brognard, J., Clark, A.S., Ni, Y., et al.** (2001). Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* **61**: 3986-3997.
- Brown, D.A., Ren, W.Y., Khorlin, A., et al.** (1998). Aliphatic and alicyclic diols induce melanogenesis in cultured cells and guinea pig skin. *J Invest Dermatol* **110**: 428-437.
- Buscher, K., Trefzer, U., Hofmann, M., et al.** (2005). Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res* **65**: 4172-4180.
- Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., et al.** (1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8790-8794.
- Carey, T.E., Takahashi, T., Resnick, L.A., et al.** (1976). Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 3278-3282.
- Cerroni, L., Soyer, H.P., and Kerl, H.** (1995). bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* **17**: 7-11.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., et al.** (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**: 1010-1014.

- Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., et al.** (2001). An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* **61**: 5544-5551.
- Chudnovsky, Y., Khavari, P.A., and Adams, A.E.** (2005). Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* **115**: 813-824.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2172-2175.
- Coffin, J.M.** (1990). Retroviridae and their replication. In *Fields Virology*, B.N. Fields, and D.M. Knipe, eds. (New York, Raven Press), pp. 1437–1500.
- Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., et al.** (1996). Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *Embo J* **15**: 3153-3163.
- Cogoni, C., and Macino, G.** (2000). Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 638-643.
- Cohen, G.M.** (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326 (Pt 1)**: 1-16.
- Conrad, B., Weissmahr, R.N., Boni, J., et al.** (1997). A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* **90**: 303-313.
- Contreras-Galindo, R., Gonzalez, M., Almodovar-Camacho, S., et al.** (2006). A new Real-Time-RT-PCR for quantitation of human endogenous retroviruses type K (HERV-K) RNA load in plasma samples: increased HERV-K RNA titers in HIV-1 patients with HAART non-suppressive regimens. *J Virol Methods* **136**: 51-57.
- Contreras-Galindo, R., Kaplan, M.H., Markovitz, D.M., et al.** (2006). Detection of HERV-K(HML-2) viral RNA in plasma of HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**: 979-984.
- Contreras-Galindo, R., Lopez, P., Velez, R., et al.** (2007). HIV-1 infection increases the expression of human endogenous retroviruses type K (HERV-K) in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**: 116-122.

- Daelemans, D., Schols, D., Witvrouw, M., et al.** (2000). A second target for the peptoid Tat/transactivation response element inhibitor CGP64222: inhibition of human immunodeficiency virus replication by blocking CXC-chemokine receptor 4-mediated virus entry. *Mol Pharmacol* **57**: 116-124.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., et al.** (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**: 543-553.
- Das, A.T., Klaver, B., Klasens, B.I., et al.** (1997). A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is essential for replication. *J Virol* **71**: 2346-2356.
- de Fougères, A., Vornlocher, H.P., Maraganore, J., et al.** (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 443-453.
- de Vries, E., Bray, F.I., Coebergh, J.W., et al.** (2003). Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer* **107**: 119-126.
- de Vries, E., and Coebergh, J.W.** (2004). Cutaneous malignant melanoma in Europe. *Eur J Cancer* **40**: 2355-2366.
- Deininger, P.L., and Batzer, M.A.** (2002). Mammalian retroelements. *Genome Res* **12**: 1455-1465.
- Denner, J.** (1998). Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci* **862**: 75-86.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A.** (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 457-467.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H.** (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., et al.** (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498.

- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T.** (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**: 188-200.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., et al.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Franklin, G.C., Chretien, S., Hanson, I.M., et al.** (1988). Expression of human sequences related to those of mouse mammary tumor virus. *J Virol* **62**: 1203-1210.
- Furuichi, Y., Shatkin, A.J., Stavnezer, E., et al.** (1975). Blocked, methylated 5'-terminal sequence in avian sarcoma virus RNA. *Nature* **257**: 618-620.
- Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., et al.** (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 865-867.
- Garrison, K.E., Jones, R.B., Meiklejohn, D.A., et al.** (2007). T cell responses to human endogenous retroviruses in HIV-1 infection. *PLoS Pathog* **3**: e165.
- Georgiou, I., Noutsopoulos, D., Dimitriadou, E., et al.** (2009). Retrotransposon RNA expression and evidence for retrotransposition events in human oocytes. *Hum Mol Genet* **18**: 1221-1228.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., et al.** (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**: 1417-1423.
- Gil, J., and Esteban, M.** (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* **5**: 107-114.
- Gillespie, D., Takemoto, K., Robert, M., et al.** (1973). Polyadenylic acid in Visna virus RNA. *Science* **179**: 1328-1330.
- Gilmore, T.D.** (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**: 6680-6684.
- Golovkina, T.V., Chervonsky, A., Dudley, J.P., et al.** (1992). Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* **69**: 637-645.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., et al.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4645-4649.

- Grossman, D., McNiff, J.M., Li, F., et al.** (1999). Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* **113**: 1076-1081.
- Guntaka, R.V.** (1993). Transcription termination and polyadenylation in retroviruses. *Microbiol Rev* **57**: 511-521.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Herbst, H., Sauter, M., and Mueller-Lantzsch, N.** (1996). Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. *Am J Pathol* **149**: 1727-1735.
- Herlyn, M., Berking, C., Li, G., et al.** (2000). Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res* **10**: 303-312.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., et al.** (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7276-7280.
- Humer, J., Waltenberger, A., Grassauer, A., et al.** (2006). Identification of a melanoma marker derived from melanoma-associated endogenous retroviruses. *Cancer Res* **66**: 1658-1663.
- Hussein, M.R.** (2004). Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol* **57**: 797-801.
- Hussussian, C.J., Struewing, J.P., Goldstein, A.M., et al.** (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* **8**: 15-21.
- Jansen, B., Schlagbauer-Wadl, H., Brown, B.D., et al.** (1998). bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med* **4**: 232-234.
- Johansen, T., Holm, T., and Bjorklid, E.** (1989). Members of the RTVL-H family of human endogenous retrovirus-like elements are expressed in placenta. *Gene* **79**: 259-267.
- Johnston, J.B., Silva, C., Holden, J., et al.** (2001). Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implications for inflammatory brain diseases. *Ann Neurol* **50**: 434-442.

- Johnstone, R.W.** (2002). Deamidation of Bcl-X(L): a new twist in a genotoxic murder mystery. *Mol Cell* **10**: 695-697.
- Kang, M.H., and Reynolds, C.P.** (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* **15**: 1126-1132.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., et al.** (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* **252**: 1708-1711.
- Kiermer, V., Van Lint, C., Briclet, D., et al.** (1998). An interferon regulatory factor binding site in the U5 region of the bovine leukemia virus long terminal repeat stimulates Tax-independent gene expression. *J Virol* **72**: 5526-5534.
- Kim, D.H., Behlke, M.A., Rose, S.D., et al.** (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* **23**: 222-226.
- Kitagawa, Y., Hiraga, T., Yura, Y., et al.** (2005). Suppression by incadronate of invasion and growth of A-375 human melanoma in mandible in nude mice. *Oncol Rep* **13**: 211-216.
- Kitamura, Y., Ayukawa, T., Ishikawa, T., et al.** (1996). Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *J Virol* **70**: 3302-3306.
- Krone, B., Kolmel, K.F., Henz, B.M., et al.** (2005). Protection against melanoma by vaccination with Bacille Calmette-Guerin (BCG) and/or vaccinia: an epidemiology-based hypothesis on the nature of a melanoma risk factor and its immunological control. *Eur J Cancer* **41**: 104-117.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
- Larsson, E., Andersson, A.C., and Nilsson, B.O.** (1994). Expression of an endogenous retrovirus (ERV3 HERV-R) in human reproductive and embryonic tissues--evidence for a function for envelope gene products. *Ups J Med Sci* **99**: 113-120.
- Liang, P., and Pardee, A.B.** (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971.
- Lower, R., Boller, K., Hasenmaier, B., et al.** (1993). Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4480-4484.

- Lower, R., Lower, J., Frank, H., et al.** (1984). Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J Gen Virol* **65 (Pt 5)**: 887-898.
- Lower, R., Lower, J., and Kurth, R.** (1996). The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5177-5184.
- Lower, R., Tonjes, R.R., Korbmacher, C., et al.** (1995). Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J Virol* **69**: 141-149.
- Mahy, B.W.** (2007). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections* (10th Edition), V.M. Brian H. Mahy, ed. (ASM Press).
- Mangeney, M., de Parseval, N., Thomas, G., et al.** (2001). The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol* **82**: 2515-2518.
- Mangeney, M., and Heidmann, T.** (1998). Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14920-14925.
- Mangeney, M., Pothlichet, J., Renard, M., et al.** (2005). Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo. *Cancer Res* **65**: 2588-2591.
- Mariani-Costantini, R., Horn, T.M., and Callahan, R.** (1989). Ancestry of a human endogenous retrovirus family. *J Virol* **63**: 4982-4985.
- Mastrangelo, G., Krone, B., Fadda, E., et al.** (2009). Does yellow fever 17D vaccine protect against melanoma? *Vaccine* **27**: 588-591.
- McClay, E.F., Jones, J.A., Winski, P.J., et al.** (1996). Determinants of tamoxifen sensitivity control the nature of the synergistic interaction between tamoxifen and cisplatin. *Cancer Res* **56**: 3993-3997.
- Medstrand, P., and Blomberg, J.** (1993). Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues. *J Virol* **67**: 6778-6787.
- Medstrand, P., and Mager, D.L.** (1998). Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family. *J Virol* **72**: 9782-9787.

- Medstrand, P., Mager, D.L., Yin, H., et al.** (1997). Structure and genomic organization of a novel human endogenous retrovirus family: HERV-K (HML-6). *J Gen Virol* **78 (Pt 7)**: 1731-1744.
- Medstrand, P., van de Lagemaat, L.N., and Mager, D.L.** (2002). Retroelement distributions in the human genome: variations associated with age and proximity to genes. *Genome Res* **12**: 1483-1495.
- Meier, F., Guenova, E., Clasen, S., et al.** (2009). Significant response after treatment with the mTOR inhibitor sirolimus in combination with carboplatin and paclitaxel in metastatic melanoma patients. *J Am Acad Dermatol* **60**: 863-868.
- Mi, S., Lee, X., Li, X., et al.** (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* **403**: 785-789.
- Modrow S, Falke D, and U, T.** (2003). *Molekulare Virologie* (Berlin, Spektrum Akademischer Verlag).
- Morrissey, D.V., Lockridge, J.A., Shaw, L., et al.** (2005). Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* **23**: 1002-1007.
- Moyes, D.L., Martin, A., Sawcer, S., et al.** (2005). The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. *Genomics* **86**: 337-341.
- Mueller-Lantzsch, N., Sauter, M., Weiskircher, A., et al.** (1993). Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**: 343-350.
- Muster, T., Waltenberger, A., Grassauer, A., et al.** (2003). An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res* **63**: 8735-8741.
- Nelson, P.N., Hooley, P., Roden, D., et al.** (2004). Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? *Clin Exp Immunol* **138**: 1-9.
- Ogasawara, H., Naito, T., Kaneko, H., et al.** (2001). Quantitative analyses of messenger RNA of human endogenous retrovirus in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **28**: 533-538.

- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J.** (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**: 609-619.
- Ono, M., Yasunaga, T., Miyata, T., et al.** (1986). Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* **60**: 589-598.
- Orenstein, J.M.** (2000). Human endogenous retroviral expression by leukocytes. *Ultrastruct Pathol* **24**: 123-124.
- Oroszlan, S., and Luftig, R.B.** (1990). Retroviral proteinases. *Curr Top Microbiol Immunol* **157**: 153-185.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., et al.** (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**: 948-958.
- Palavalli, L.H., Prickett, T.D., Wunderlich, J.R., et al.** (2009). Analysis of the matrix metalloproteinase family reveals that MMP8 is often mutated in melanoma. *Nat Genet* **41**: 518-520.
- Palliser, D., Chowdhury, D., Wang, Q.Y., et al.** (2006). An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* **439**: 89-94.
- Perron, H., and Seigneurin, J.M.** (1999). Human retroviral sequences associated with extracellular particles in autoimmune diseases: epiphenomenon or possible role in aetiopathogenesis? *Microbes Infect* **1**: 309-322.
- Petitclerc, E., Stromblad, S., von Schalscha, T.L., et al.** (1999). Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res* **59**: 2724-2730.
- Plettenberg, A., Ballaun, C., Pammer, J., et al.** (1995). Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *Am J Pathol* **146**: 651-659.
- Polsky, D., and Cordon-Cardo, C.** (2003). Oncogenes in melanoma. *Oncogene* **22**: 3087-3091.
- Ponferrada, V.G., Mauck, B.S., and Wooley, D.P.** (2003). The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus. *Arch Virol* **148**: 659-675.

- Pothlichet, J., Mangeney, M., and Heidmann, T.** (2006). Mobility and integration sites of a murine C57BL/6 melanoma endogenous retrovirus involved in tumor progression in vivo. *Int J Cancer* **119**: 1869-1877.
- Rabbi, M.F., Saifuddin, M., Gu, D.S., et al.** (1997). U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat contains TRE-like cAMP-responsive elements that bind both AP-1 and CREB/ATF proteins. *Virology* **233**: 235-245.
- Reed, J.C., and Pellecchia, M.** (2005). Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* **106**: 408-418.
- Saenz-Santamaria, M.C., Reed, J.A., McNutt, N.S., et al.** (1994). Immunohistochemical expression of BCL-2 in melanomas and intradermal nevi. *J Cutan Pathol* **21**: 393-397.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., et al.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Salvucci, O., Carsana, M., Bersani, I., et al.** (2001). Antiapoptotic role of endogenous nitric oxide in human melanoma cells. *Cancer Res* **61**: 318-326.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sauermann, U., Siddiqui, R., Suh, Y.S., et al.** (2008). Mhc class I haplotypes associated with survival time in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected rhesus macaques. *Genes Immun* **9**: 69-80.
- Sauter, M., Schommer, S., Kremmer, E., et al.** (1995). Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J Virol* **69**: 414-421.
- Schadendorf, D., Fichtner, I., Makki, A., et al.** (1996). Metastatic potential of human melanoma cells in nude mice--characterisation of phenotype, cytokine secretion and tumour-associated antigens. *Br J Cancer* **74**: 194-199.
- Schiavetti, F., Thonnard, J., Colau, D., et al.** (2002). A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* **62**: 5510-5516.

- Schommer, S., Sauter, M., Krausslich, H.G., et al.** (1996). Characterization of the human endogenous retrovirus K proteinase. *J Gen Virol* **77 (Pt 2)**: 375-379.
- Seifarth, W., Baust, C., Murr, A., et al.** (1998). Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles. *J Virol* **72**: 8384-8391.
- Seifarth, W., Frank, O., Zeilfelder, U., et al.** (2005). Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray. *J Virol* **79**: 341-352.
- Serafino, A., Balestrieri, E., Pierimarchi, P., et al.** (2009). The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Exp Cell Res* **315**: 849-862.
- Serrone, L., and Hersey, P.** (1999). The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. *Melanoma Res* **9**: 51-58.
- Sharp, P.A.** (2001). RNA interference--2001. *Genes Dev* **15**: 485-490.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., et al.** (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**: 465-476.
- Simpson, G.R., Patience, C., Lower, R., et al.** (1996). Endogenous D-type (HERV-K) related sequences are packaged into retroviral particles in the placenta and possess open reading frames for reverse transcriptase. *Virology* **222**: 451-456.
- Song, E., Zhu, P., Lee, S.K., et al.** (2005). Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* **23**: 709-717.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., et al.** (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **432**: 173-178.
- Stauffer, Y., Theiler, G., Sperisen, P., et al.** (2004). Digital expression profiles of human endogenous retroviral families in normal and cancerous tissues. *Cancer Immun* **4**: 2.
- Steinhuber, S., Brack, M., Hunsmann, G., et al.** (1995). Distribution of human endogenous retrovirus HERV-K genomes in humans and different primates. *Hum Genet* **96**: 188-192.

- Stevens, R.W., Baltch, A.L., Smith, R.P., et al.** (1999). Antibody to human endogenous retrovirus peptide in urine of human immunodeficiency virus type 1-positive patients. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**: 783-786.
- Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L., et al.** (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* **348**: 331-333.
- Sugimoto, J., Matsuura, N., Kinjo, Y., et al.** (2001). Transcriptionally active HERV-K genes: identification, isolation, and chromosomal mapping. *Genomics* **72**: 137-144.
- Tang, G.** (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* **30**: 106-114.
- Thakker, D.R., Natt, F., Husken, D., et al.** (2004). Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain by using nonviral RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17270-17275.
- Todaro, G.J., Sherr, C.J., Benveniste, R.E., et al.** (1974). Type C viruses of baboons: isolation from normal cell cultures. *Cell* **2**: 55-61.
- Tonjes, R.R., Lower, R., Boller, K., et al.** (1996). HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **13 Suppl 1**: S261-267.
- Trinklein, N.D., Karaoz, U., Wu, J., et al.** (2007). Integrated analysis of experimental data sets reveals many novel promoters in 1% of the human genome. *Genome Res* **17**: 720-731.
- Turner, G., Barbulescu, M., Su, M., et al.** (2001). Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* **11**: 1531-1535.
- Tuschl, T.** (2004).
- Van Belle, P.A., Elenitsas, R., Satyamoorthy, K., et al.** (1999). Progression-related expression of beta3 integrin in melanomas and nevi. *Hum Pathol* **30**: 562-567.
- Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M.** (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**: 440-442.

- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., et al.** (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* **270**: 484-487.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., et al.** (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351.
- Vogetseder, W., Dumfahrt, A., Mayersbach, P., et al.** (1993). Antibodies in human sera recognizing a recombinant outer membrane protein encoded by the envelope gene of the human endogenous retrovirus K. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**: 687-694.
- Vogt, V.** (1997). Retroviral Virions and Genomes. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, eds. (New York, Cold Spring Harbour Lab), pp. pp 27-70.
- Voisset, C., Weiss, R.A., and Griffiths, D.J.** (2008). Human RNA "rumor" viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 157-196, table of contents.
- von Ahsen, O., Renken, C., Perkins, G., et al.** (2000). Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* **150**: 1027-1036.
- Wacheck, V., Losert, D., Gunsberg, P., et al.** (2003). Small interfering RNA targeting bcl-2 sensitizes malignant melanoma. *Oligonucleotides* **13**: 393-400.
- Wajant, H.** (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**: 1635-1636.
- Wang-Johanning, F., Frost, A.R., Jian, B., et al.** (2003). Detecting the expression of human endogenous retrovirus E envelope transcripts in human prostate adenocarcinoma. *Cancer* **98**: 187-197.
- Wang-Johanning, F., Frost, A.R., Jian, B., et al.** (2003). Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene* **22**: 1528-1535.
- Wang-Johanning, F., Frost, A.R., Johanning, G.L., et al.** (2001). Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res* **7**: 1553-1560.
- Wang-Johanning, F., Liu, J., Rycaj, K., et al.** (2007). Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int J Cancer* **120**: 81-90.

- Weeraratna, A.T.** (2003). Serial analysis of gene expression (SAGE): advances, analysis and applications to pigment cell research. *Pigment Cell Res* **16**: 183-189.
- Weinstock, M.A.** (1998). Issues in the epidemiology of melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* **12**: 681-698.
- Whiteman, D.C., Whiteman, C.A., and Green, A.C.** (2001). Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control* **12**: 69-82.
- WHO** (2007). Incidence of melanoma in people aged under 55 years.
- WHO** (2009). Frequently asked questions relating to skin cancers.
- Wilkinson, A., Mager, D., and Leong, J.** (1994). Endogenous human retroviruses. In *The Retroviridae*, L. J.A, ed. (New York, Plenum Press), pp. 465-535.
- Williams, B.R.** (1997). Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem Soc Trans* **25**: 509-513.
- Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., et al.** (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* **270**: 41-49.
- Xiao, C., Lachance, B., Sunahara, G., et al.** (2002). Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing: concentration and time response function approach. *Anal Chem* **74**: 5748-5753.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., et al.** (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**: 285-291.
- Yang, J., Bogerd, H.P., Peng, S., et al.** (1999). An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13404-13408.
- Yoshino, T., Shiina, H., Urakami, S., et al.** (2006). Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* **12**: 6116-6124.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., et al.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**: 25-33.

Zimmermann, T.S., Lee, A.C., Akinc, A., et al. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* **441**: 111-114.

Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., et al. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* **12**: 97-99.

7 ANHANG

7.1 Datenbankerstellung für die HERV-K (HML-6) spezifische Amplifikation

7.1.1 Suchsequenz für HERV-K (HML-6) LTRs

Basis: UCSC (Humane Genome Browser; <http://genome.ucsc.edu/>)

Name: LTR3

Family: ERVK

Class: LTR

SW Score: 3175

Divergence: 9.2%

Deletions: 1.9%

Insertions: 0.0%

Begin in repeat: 0

End in repeat: 432

Left in repeat: 2

Position: chr19:11832377-11832799

Band: 19p13.2

Genomic Size: **423**

Strand: -

>hg17_rmsk_LTR3 range=chr19:11832327-11832849 5'pad=50 3'pad=50 revComp=TRUE

strand=- repeatMasking=lower

AGAAGCAATGAGGCCGAACCGTGTGTAGTGCCTAAGGCCTACCTAAGG

[gtgggagccaaagactgagggctgtgaccaactcagcattccactggaggttatgatcatcacagtaaactgttatcatcaatgca](#)

[gaatgtgggcaaaactcgtgtctgcacctgccccagaaggtaactgaggacaatcaccctggcgctgtgctgcttgaggttatctact](#)

[gggacatctggagcctattgtcaaagaatgcagtcagtcaggcctgctctaaatcaagcagctgacctacaaccaccccttctatct](#)

[ccttaatacaataatacgaagggcactagaagctcaggccctgttcactagaagcaaggtgccccgaccccttcttccaaacat](#)

[attctttgtcttcttattcccgcgtctcctcttcttctcagtagtaggggtcatggca](#)

[Aagcggcggccgtgaacagggacttgaggatgtgaacgaagaagcttgc](#)

7.1.2 Blastergebnisse der UCSC-Datenbank

Retrosearch ID	Acc.-Nummer	NT-Nummer	Chromosom	Bemerkungen
4	AL713966	NT_007592	6p21.32	
6	AL713966	NT_007592	6p21.32	
5562	AL158847.22	NT_019273	1p13.3	
14274	AC025032	NT_005612	3q25.32	gehört zu MER4BI, besitzt aber auch ein LTR3
18110	AC092674	NT_016354	4q21.1	
20418	AC138832	NT_006713	5q13.2	
31865	AL512324	NT_033985	10q11/21	
33749	AP002793	NT_033903	11q12.3	
37164	AC003029.5	NT_009775	12q24.12	
37164	AC003029	NT_009775	12q24.12	
39913	AL157789	NT_026437	14q24.2	
43938	AC008812.7	NT_077812	19p13.2	
44020	AC123912.1	NT_011295	19p13.11	
44045	AC073539	NT_11295	19p12	
44188	AC011460.3	NT_011109	19q13.41	
44260	AC008567.5	NT_011295	19p13.2	
44276	AC020951	NT_011295	19p13.2	
44553	AC005946	NT_011109	19q13.41	
44557	AC010332.7	NT_011109	19q13.41	
	AL139288	NT_004559	1q42.13	
	AC020914	NT_011109	19q13.41	
	AC011460	NT_011109	19q13.41	
	AC011460	NT_011109	19q13.41	
	AC011468	NT_011109	19q13.41	
	U95741, U95743	NT_010393	16p13.12	
	AC036111	NT_033903	11q11	
	AC003973	NT_11295	19p12	
	AL035698	NT_025741	6q24.3	
	AL445587	NT_008470	9q33.2	
	AC128685	NT_005612	3q26.1	
	AC048344.44	NT_009714	12p11.21	
	AC025886	NT_011295.	19p13.11	
	AC090014.10	NT_029419	12q14.1	
	AC092103	NT_022184	2p15	
	AL136419.3	NT_026437	14q11.2	
	AL136295.3	NT_026437	14q11.2	
	AL136419.3	NT_026437	14q11.2	
	AC064870.5	NT_022135	2q14.1	
	AP000640.5	NT_033903	11q12.1	
	AL356285.9	NT_024524	13q12.1	
	AC011468.8	NT_011109	19q13.41	
	AP000744.4	NT_033927	11q13.4	
	AL159987.19	NT_011630	Xp11.21	
	AC020708.6	NT_016354	4q32.1	
	AL356858.19	NT_079573	Xp21.1	
	AC008750.9	NT_011109	19q13.41	
	AC020914.9	NT_011109	19q13.41	
	AC011460.3	NT_011109	19q13.41	

AC011460.3	NT_011109	19q13.41	
AC011460.3	NT_011109	19q13.41	
AC011460.3	NT_011109	19q13.41	
AC011468.8	NT_011109	19q13.41	
AC011468.8	NT_011109	19q13.41	
AC011468.8	NT_011109	19q13.41	
AC011468.8	NT_011109	19q13.41	
AC010320.10	NT_011109	19q13.41	
AC010320.10	NT_011109	19q13.41	
AC010320.10	NT_011109	19q13.41	
AL160191	NT_026437	14q24.2	
AC108162	NT_016354	4q32.2	
AC068722, AC073897	NT_010194	15q21.1	

7.1.3 Vergleich der LTR3-Sequenzen

	10	20	30	40	50	60	70	80
Primer U3_66rev				CAA	CTCAGCATT	CACTGRAGGC	TRYATC	
4	---	TGTAGAG	AGCCAGAGG	---CTGAGAA	TCATGACCAA	CTCAGAATTT	CCACTGAGGC	AATATGATCA AACAGCAAA
6 5'LTR	---	TGTAGAG	AGCCAGAGT	---CCGAGAA	TCATGACCAA	CTCAGCATT	CCACTGCGGC	AATATGATCA AACAGCAAA
6 3'LTR	---	TATAGAG	AGCCAGAGG	---CTGGAGAA	TTGTACCAA	TTGAGCATT	CCACAGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
5562	---	TGTTGGG	AACCGAAAAG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGAAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
14274 (MER4B)	---	TGTTGGG	AGCTGAAAAG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TGTATGATCA AACAGCAAA
18810 5'LTR	---	TGTAGAG	AGCTGAAAG	---CCTGTGGG	TAGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTG-AGGT	TATATGATCA AACAGCAAA
18810 3'LTR	---	TGTAGAG	AGCCGAAAG	---CCTGTGTG	TCATGACCAA	CTCAGCATT	CACTG-AGGC	TGTATGATCA AACAGCAAA
20418 5'LTR	---	TGTTGGG	AGCCGAAAAG	GCCAAAGGGA	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TACATGATCA AACAGCAAA
20418 3'LTR	---	TGTTGGG	AGCCGAAAAG	GCCAAAGGGA	TGTTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TACATGATCA AACAGCAAA
31865 5'LTR	---	TGTTGGG	AGCCGAAAAG	GCCAAAGGGA	TGTTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TACATGATCA AACAGCAAA
31865 3'LTR	---	TGTTGGG	AGCCGAAAAG	GCCAAAGGGA	TGTTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TACATGATCA AACAGCAAA
33749 5'LTR	---	TGTAGAG	AGCTGAAAG	---TCCATGGA	TCATGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
33749 3'LTR	---	TGTAGAG	AGCTGAAAG	---CCTGTGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
37164 5'LTR	---	TAGAG	AGCTGAAATG	---CCCGTGGG	TCGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTG-AGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
37164 3'LTR	---	TGTAGAG	AGCTGAAATG	---CCCATGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTG-AGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
37164 5'LTR	---	TAGAG	AGCTGAAATG	---CCCGTGGG	TCGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTG-AGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
37164 3'LTR	---	TGTAGAG	AGCTGAAATG	---CCCATGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTG-AGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
39913 5'LTR	---	AGGG	AGCCAAA-G	GCCC-ATGGG	ACGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTG-AGTC	TATATGATCA AACAGCAAA
39913 3'LTR	---	TATACAGAG	AGCCAAA-G	GCCC-ATGGG	ACGTGACCAA	C----ATTC	CACTG-AGTC	TATACGATCA AACAGCAAA
43928 5'LTR	---	TGTTGGGAGC	CGAAAAGGC	---CAAAGGGA	TCGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAAGC	TGTATGATCA AACAGCAAA
43928 5'LTR	---	TGTTAGG	AGCCAAAAG	---CCTGACGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATTC	CACTGGAGGC	TATACGATTA AAGAGCAAA
44020	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44045	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44188 5'LTR3	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44188 5'LTR3	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44260 5'LTR	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44260 5'LTR	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44276 5'LTR	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44276 3'LTR	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44553 5'LTR	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44553 5'LTR	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44553 3'LTR	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44557 3'LTR	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
44557 3'LTR	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AL139288	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC020914 LTR	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC020914 LTR	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011460.1	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011460.2	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011468	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
U95741, U9574	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC036111	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC003973	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AL035698	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AL445587	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC128685	---	TGTAGAG	AGCCGAAAAG	---CCTGTGGG	TCATGACCAA	CTCAGTATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC048344.44	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC025886	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC090014.10	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC092103	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGTG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AL136419.3.1	---	TGTAGAG	AGCCGAAAAG	---CCTGAGGG	TCGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAAGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AL136295.3	---	TGTAGAG	AGCCGAAAAG	---CCTGAGGG	TCGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAAGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AL136419.3.2	---	TGTAGAG	AGCCGAAAAG	---CCTGAGGG	TCGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAAGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC064870.5	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AP000640.5.3	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AP000640.5.5	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AL356285.9	---	TGTTGGGAGC	CGAAAAGAC	---CAAAGGGA	TCGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011468.8	---	TGTAGAG	AGCCGAAAAG	---CCTGAGGG	TCATGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAAGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AP000744.4.5	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AP000744.4.3	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AL159987.19	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC020708.6	---	TGTAGAG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AL356858.19	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC008750.9	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC020914.9.5	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC020914.9.3	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011460.3	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011460.3.5	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011460.3.5	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011460.3.5	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011460.3.3	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011460.3.5	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011468.8.3	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011468.8.3	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011468.8.5	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC011468.8.3	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC010320.10	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC010320.10	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC010320.10	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AL160191	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC108162	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA
AC068722, AC	---	TGTTGGG	AGCTGAAATG	---CCTGAGGG	TTGTGACCAA	CTCAGCATT	CACTGGAGGC	TATATGATCA AACAGCAAA

	90	100	110	120	130	140	150	160
4	TGTTTATCAT	GAATACAGAG	CAGGGGCAAA	CTCTCCT-CT	GTGCTGGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
6 5'LTR	TGTTTATCAT	GAGTACAGAA	TAGGGGCAAA	CTCTCCT-CT	GTGCTGGCCA	CCAGACGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TAACTCC
6 3'LTR	TGTTTATCAT	GAATACAGAA	TGTGGGCAAA	CTCGCTT-CT	GTGCCGGCCG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
5562	TGTTTATCAT	GAATACAGAA	TGTGAGCAAA	CTTGCAAT-CT	GTGCCCTGCC	CCAGAAGGTT	TGCTGAGAGT	AA-TCACTCC
14274 (MER4B)	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	--CACAT-CT	GCACCTGCTG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
18810 5'LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGAA	TGTGGGCAAT	CTCA-CTTCT	GCTCCTGCAG	ACAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
18810 3'LTR	TGTTTATCCT	GAATGCAGAA	CATGGGCAAT	CTCG-CTTCT	GCTCCTGCTG	ACGGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
20418 5'LTR	TGTTTATCAT	GAATACAGAA	TGTGGGCAAA	CTCACTT-CT	GTGCCCTGCC	--CAGAAAGTT	TGCTGAGGGC	CA-TCGCTCC
20418 3'LTR	TGTTTATCAT	GAATACAGAA	TGTGGGCAAA	CTCGCTT-CT	GTGCCCTGCC	--AGAAGGTT	TGCTGAGGGC	CA-TCGCTCC
31865 5'LTR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
31865 3'LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACAT-CT	GCACCTGCTG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
33749 5'LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTTGTA-CT	GCACCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
33749 3'LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCGCTA-CT	GCACCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
37164 5'LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTTGCTT-CT	GCTCCAGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
37164 5'LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTTGCTT-CT	GCTCCAGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
37164 3'LTR	TGTTTATCAT	AAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTCACTT-CT	GCTTCAGCCG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
39913 5'LTR	TGTTTATCAT	GAATACAGAA	TGTGGGCAAA	CTCACGA-CC	CGCCCTGCC	--CAGAAGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
39913 3'LTR	TGTTTATCAT	GAATACAGAA	TGTGGGCAAA	CTCATGA-CT	GTGCCCTGCC	--CAGAAGTT	TGCTGAGGGC	AA-TTGCTTC
43928 5'LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCA-CTGCT	CGCCCTGCC	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
43928 5'LTR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
44020	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACAT-CT	GTGCCCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AG-TCACTCC
44045	TGTTTATCAT	GAGTGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTTGCTT-CT	GCTCCTGCCA	CCAGAAGGTT	TACTGAGGAC	AG-TCACTCC
44188 5'LTR3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
44188 5'LTR3	TGTTTATCAT	GAATACAGGA	TGTGAGCAAA	CTCAGGA-CT	GCTCCTGCCA	ACATAAGGTT	TGCTGGAGGC	AA-TCACTCC
44260 5'LTR	TGTTTATCAT	AAATGCAGCA	TGTGGGCAAA	CTCACAT-CT	CGCCCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCGCTCC
44260 5'LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACAT-CT	GTGCCCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
44276 5'LTR	TGTTTATCAT	CAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTCGTGT-CT	GCACCTGCCG	CCAGAAGGTT	TACTGAGGAC	AA-TCAC--C
44276 3'LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTCACAT-CT	GCTTCTGCTG	CCAGAAGGTT	TACTGAGGAC	AA-TCACTCC
44553 5'LTR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
44553 5'LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACGA-CT	ACTCCACTG	CCAGAGGTT	TGCTGAGGGC	GAGTCGCCTC
44553 3'LTR	TGTTTATCAT	GAATACAGGA	TGTGAGCAAA	CTCACGA-CT	GTGCCCTGCC	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCGCTTC
44557 3'LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCATGA-CT	CGCCCTGCC	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCATTC
44557 3'LTR	T---	ATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACGA-CT	CGCCCTGACA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGTT
ALL39288	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCGCAT-CT	GTGCCCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	C--TCATTC
AC020914 LTR	TGTTTATCAT	GAATACAGGA	TGTGAGCAAA	CTCACGA-CT	GCACCTGCCG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	GG-TCACTCC
AC020914 LTR	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACAA-TT	ACTCCACTG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	CA-TTGCTTC
AC011460_1	TGTTTATCAT	GAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTCGTAT-CT	GCACCTGCCA	CCAGAAAGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
AC011460_2	TGTTTATCAT	GAGTACAGAA	TGTGGGCAAA	CTCGCTT-CT	GTACCTGCC	CAGCTTTGCT	GAGGGCCACC	AT-TCCTGG
AC011468	--TTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCATGA-CT	GCTTCCGCTG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TGCTTC
U95741,U9574	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGAGGGTAAA	CTCACAT-CT	CGCCCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
AC036111	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACAT-CT	GTGCCCTGCC	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AG-TCACTCC
AC003973	AGTTTATCAT	GAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTTGCTT-CT	GCTCCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AG-TCACTCC
AL035698	TGTTTATCAT	GAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTCGCAT-CT	GTACCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AG-TCACTCC
AL445587	TGCTGATCAT	GAGTGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACAT-CT	GCACCTGCCG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
AC128685	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCGCAA-CT	GCACCTGCC	CCAGGAAGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
AC048344_44	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACAT-CT	GCACCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
AC025886	TGTTTATCAT	GAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	TTGCTT-CT	GCTCCTGCC	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AG-TCACCC
AC090014_10	TCPTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTAGGCAAA	CTTGCTT-CT	CGCCCGGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
AC092103	TGTTTATCAT	GAATACAGGA	TGTGAGCAAA	CTCACAT-CT	CGCCTGCTG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
ALL36419_3_1	TGTTTATCAT	GATTGCAAAA	TGTGGGCAAA	CTCGCTT-CT	GCACCTGCCA	CCAGGAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TTACTCC
ALL36295_3	TGTTTATCAT	GAATGCAGAA	CGTGTACAAA	CTCACTT-CT	GCACCTGCTG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
ALL36419_3_2	TGTTTATCAT	GAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTCACTT-CT	CGCCCTGCTA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TGACTCC
AC064870.5	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	ATCACAT-CT	GCCCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGTGC	TG-TCACTCC
AP000640.5_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AP000640.5_5	TATTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCA-TGACT	GTGCCCTGCTG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGTGC	AA-TCACTCC
AL356285.9	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCAGGACT	GTGCCCTGCC	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
AC011468.8	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCA--CATC	TGCCCTGCCG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGTGC	AA-TTACTCC
AP000744.4_5	TGTTTATCAT	GAATACAGAA	TGTGGGCAAA	CTCGCAC-CT	GCACCTGCTA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AG-TCACTCC
AP000744.4_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AL159987.19	TGC-----	-----	-----	-----	--ACCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGA	AG-TCACTCC
AC020708.6	T--TTATCAT	GAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTTGCGA-CT	GCACCTGCTG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AG-TTACTCC
AL356858.19	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACAT-CT	GCACCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AG-TCACTTC
AC008750.9	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACAT-CT	GCACCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AG-TCACTTC
AC020914.9_5	TGTTTATCAT	GAATACAGGA	TGTGAGCAAA	CTCACGA-CT	GCACCTGCCG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	GG-TCACTTC
AC020914.9_3	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACAA-TT	ACTCCACTG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	CA-TTGCTTC
AC011460.3	TGTTTATCAT	GAATGCAGAA	TGTGGGCAAA	CTCGTAT-CT	GCACCTGCCA	CCAGAAAGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTGC
AC011460.3_5	TGTTT-TCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTGACAAAT	GATCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGAG	AG-TCACACC
AC011460.3_5	TGTTTATCAT	AAATGCAGGA	TATGGGCAAA	CTCACGA-CT	GTGCCCTGCTG	ACAGAAAGTT	TGCTGGGGC	TA-TCATTC
AC011460.3_3	TGTTTATCAT	GAGTACAGAA	TGTGGGCAAA	CTCGCTT-CT	GTACCTGCC	CAGCTTTGCT	GAGGGCCACC	AT-TCCTGG
AC011460.3_5	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGAGCAAA	CTCACCA-TT	GCTCCTGCCG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCACTCC
AC011468.8_3	--TTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCATGA-CT	GCTTCCGCTG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TCGCTTC
AC011468.8_3	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCATGA-CT	GCTCCTGCTG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	AA-TTACTTC
AC011468.8_5	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCA--CATC	TGCCCTGCCG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGTGC	AA-TCACTCC
AC011468.8_3	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACGA-CT	CGCCCTGCCG	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGC	CG-TTACTCC
AC010320.10	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCACA	CTCAC-A-CT	GC--CCTGCCA	CCAAAAGGTT	TGCTGAGGGC	C--TCACTCC
AC010320.10	TGTTTATCAT	GATTACAGGA	CGTGAAGAAA	CTCATGA-CT	GCACCTGCCA	CCAGGAGGTT	TGCTGAGGGC	CA-TCACTCC
AC010320.10	TGTTTATCAA	GAATGCAGGA	TATGGGCAAA	CTCACAC-TT	--CCCTGCCA	CCAAAAGGTT	TGCTGAGGGA	CA-TGTCTCC
ALL60191	AACAGCAAA	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCACAGCTG	CCAGAAGGTT	TGCTGGGTTG	AA-TCACTCC
AC108162	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCATGC--T	GTGCCCTGCCA	CCAGAAGGTT	TGCTGAGGGT	GG-TCAGTCC
AC068722, AC	TGTTTATCAT	GAATGCAGGA	TGTGGGCAAA	CTCA-CATCT	GCACCTGCCA	CCAGAGGTT	TGCAGAGTGC	AA-TCACTCC

		170	180	190	200	210	220	230	240
Primer U3_218A-rev				TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGG			
Primer U3_218A-rev				TTGAAGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTGG			
4	CT-----	-----GGC	GCTGAGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTAGAATC	TATTGTTCAA	GGAAATGCAGT	
6 5'LTR	AT-----	-----GGT	GCCGGGTCC	TTAAGGTTAT	CTGCTGGGAC	ATCTAGAGCC	TATTGTTCGA	GGAAATGCAGT	
6 3'LTR	CT-----	-----GGT	GCCGGGTCC	TTGAGGTTAT	GCCTGGGAC	ATCTAGAGCC	TATTGTTTGA	GGAAATGCAGT	
5562	CT-----	-----GGT	GCCGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCAA	ATAATGCAGT	
14274 (MER4B)	CT-----	-----GGC	ACCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTGGGGCC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGT	
18810 5'LTR	CT-----	-----GGC	ACTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATGTGGAGAT	TACTGTTCAA	AGATTGCTGT	
18810 3'LTR	CT-----	-----GGT	GCCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGAC	TACTGTTCAA	AGAATGCCAT	
20418 5'LTR	CT-----	-----GGC	CCCG-GCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	GTCTAGAGCC	TATTGTTCGA	GGAAATGCAGT	
20418 3'LTR	CT-----	-----GGC	CCCG-GCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTAGAGCC	TATTGTTCGA	GGAAATGCAGT	
31865 5'LTR	CT-----	-----GGC	ACCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTGCTGGAAC	ATCTGGAGCC	TGCTGTTCTA	AGAAAGCAGT	
31865 3'LTR	CTGGTGCTGT	GCTCCTGGGT	GCCATGCTCC	TTAAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTAGAGCC	TACTGTTCTA	AGAAGGCAGT	
33749 5'LTR	GT-----	-----GGC	ACCATGCTCC	TTGATGTTAC	CTACTGGGAC	ATCTAGAGCC	TACTGTTTGA	AGAATGCAGT	
33749 3'LTR	CT-----	-----GGT	GCCATGCTCC	TTGATGTTAT	CTACTTTGAC	ATCTAGAGCC	TACTGTTTGA	AGAATGCAGT	
37164 5'LTR	CC-----	-----GGC	ACTGTATGCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCCAGAGCC	TACTGTTCAA	ATAATGCAGT	
37164 5'LTR	CT-----	-----GGC	GCCATGCTCT	TTGAGGTTAT	CTACTGAGAC	ATCTAGAGCC	TACTGTTCAA	AGAATGCAAT	
37164 5'LTR	CC-----	-----GGC	CCCATATGCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCCAGAGCC	TACTGTTCAA	ATAATGCAGT	
37164 3'LTR	CT-----	-----GGC	GCCATGCTCT	TTGAGGTTAT	CTACTGAGAC	ATCTAGAGCC	TACTGTTCAA	AGAATGCAAT	
39913 5'LTR	CT-----	-----GGC	GCCAAGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTAGAG--	-----	---AATGCAGT	
39913 3'LTR	CT-----	-----GAC	GCCAAGCTCC	TTGAGGTTAT	CTATTGGGAC	ATCCAGAG--	-----	---AATGCAGT	
43928 5'LTR	CT-----	-----GGC	ACCACGCTCA	CTGGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTAGAGCC	TATTGCTCGA	AGAATGCAGC	
43928 5'LTR	CT-----	-----GGC	ACTGTGCTCC	TTGCAGTTGT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGTC	TACTGTTCAA	AGAAAGCATT	
44020	CT-----	-----GGT	GCCATGCTCC	TTGGAGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGAG	TACTGTTCAA	AGAATACAGT	
44045	CT-----	-----GGC	GCC-----	---G---TTAT	CTACTGGCAG	ATCTAGAG--	-----	---AATGCAGT	
44188 5'LTR3	CT-----	-----GGC	ACC-----	---GAGTTAT	CTACTGGCAG	ATCTAGAG--	-----	---AATGCAGT	
44188 5'LTR3	CT-----	-----GGT	GCTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAT	ATCTGGAGCC	TACTGTTCAA	AGAAAGCAGT	
44260 5'LTR	CT-----	-----GGC	ACTGTGCAAC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAT	ATCTGGAGCC	TACTGTTCAA	GGAAAGCAGT	
44260 5'LTR	CT-----	-----GGC	GCTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTGGAGCC	TATTGTTCAA	AGAATGCAGT	
44276 5'LTR	CT-----	-----GGT	GCTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTGGAGCC	TATTGTTTGA	AAAATGCAGT	
44276 3'LTR	CT-----	-----GGT	GCTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTGGAGCC	TATTGTTTGA	AAAATGCAGT	
44553 5'LTR	CT-----	-----GGT	GCCGAGCTCC	TTG-----	-----	-----	-----	-----	
44553 5'LTR	CT-----	-----GAC	GCC-----	---AAGCTCTT	TGAAGTTATC	TACTGGAAC-	---ATCTAG	AGAATGCAGT	
44557 3'LTR	CT-----	-----GGC	ACTGTGCTCA	CTGAGATTAT	CTACTGGGAC	ATCTAGAGCC	TATTGTTCAA	AGAATGCAGT	
44557 3'LTR	CT-----	-----GGT	GCCATGCTCA	TTGAAATTAT	CTACTGGGAC	ATCTACAGTC	TATTGTTCAA	AGAATGCAGT	
AL139288	CT-----	-----GGC	TCTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGT	
AC020914 LTR	CT-----	-----GGC	GCCG-GCTCC	TTGAAGTTAT	CTTCTGGGAC	ATCTAGGGCC	TACTGTTCAA	GAATACAGT	
AC020914 LTR	CT-----	-----GGC	GCCGAGCTCC	TTGAAGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTAG--	-----	---AGAATGCAGT	
AC011460_1	CT-----	-----GGC	ACCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGT	
AC011460_2	CG-----	-----CTG	GGCT---CC	TGAGGCTAT	CTATGGGAC	ATCTAGAGCC	TATTGCTCAA	GGAAATGCAGT	
AC011468	CT-----	-----GGT	GCTGAGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTAGAG--	-----	---AATGCCAT	
U95741,U9574	CT-----	-----GGC	ACCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCTA	AGAAAGCAGC	
AC036111	CT-----	-----GGC	ACCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCTA	AGAAAGCAGT	
AC003973	CT-----	-----GGT	GCCATGCTCC	TTGAAGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGAG	TGCTGTTCAA	GAATACAGT	
AL035698	CT-----	-----GGC	ACCGTGTCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGT	
AL445587	CT-----	-----GGC	GCCGTGCTCC	TTGAGATTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGTC	TACTGTTCTA	AGAAGGCAGT	
AC128685	CT-----	-----GGT	GCTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGAC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGT	
AC048344_44	CT-----	-----GGC	GCCGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCAA	AGAAAGCAGT	
AC025886	CT-----	-----GGT	GCCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGCAGAG	TACTGTTTAA	AGAATACAGT	
AC090014_10	CT-----	-----GGC	GCTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTGCTGGAAC	ATCTGGAGAC	TACTGCTCAG	AGAATGCAGT	
AC092103	CT-----	-----GGC	GCTGAGCTCC	TTGAGGTTAT	CTAATGGAAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCTA	AGAAAGCAGT	
AL136419_3_1	CT-----	-----GGT	GCTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	CTCTGGAGAC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGT	
AL136295_3	CT-----	-----GGT	GCTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTGCTGGAAC	ATCTGGAGAC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGT	
AL136419_3_2	CT-----	-----GGT	GCTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACAGGAAAC	ATCTGGAGAC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGT	
AC064870_5	CT-----	-----GGC	ACCACACTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTGGAGCC	T-CTGTTCAA	AGAATGTAGT	
AP000640_5_3	CT-----	-----GGC	ACTGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGAC	TACTGTTCTA	AGAATGCAGC	
AP000640_5_5	CT-----	-----GGT	GCTGTGCTCA	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTAGAGCT	TATTGTTTGA	AGAATGCAGT	
AL356285_9	CT-----	-----GGC	ACCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGAAAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCTA	AGAATGCAGT	
AP000744_4_5	CT-----	-----GGT	GCCGTGCTCC	TTGAGGTTAT	CTATGGGAC	ATCTGGAGCC	TAGTCTTCAA	AGAATGTAGT	
AP000744_4_3	CT-----	-----GGT	GCCGTGCTCC	TTGAAGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGA	
AL159987_19	CT-----	-----GGT	GTCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAT	ACCTGGAGAC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGT	
AC020708_6	CT-----	-----GGT	GCCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAG--	-----	---AAAGTAGT	
AC008750_9	CT-----	-----GGT	GCCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAG--	-----	---AAAGTAGT	
AC020914_9_5	CT-----	-----GGC	CCCG-GCTCC	TTGAAGTTAT	CTTCTGGGAC	ATCTAGGGCC	TACTGTTCAA	GGAAATACAGT	
AC020914_9_3	CT-----	-----GGC	GCCGAGCTCC	TTGAAGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTAG--	-----	---AGAATGCAGT	
AC011460_3	CT-----	-----GGC	ACCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGT	
AC011460_3_5	CCA-----	-----GGC	AGAGTGTTCC	TTGTGTTT--	-----	-----	-----	-----	
AC011460_3_5	CT-----	-----GGC	GCT-----	---GAGTTAT	CTGCTGGGAC	ATCTAGAGCC	TGTTGTTTGA	GGAAATGCAAT	
AC011460_3_5	CG-----	-----CTG	GGCT---CC	TGAGGCTAT	CTATAGGAAAC	ATCTAGAGCC	TGTTGTTTAA	AGAAATGCAAT	
AC011460_3_3	CT-----	-----GGT	GCTGAGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGCAAC	ATTTAGAG--	-----	---AATGTAGT	
AC011468_8_3	CT-----	-----GGT	GCTGAGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGGAC	ATCTAGAG--	-----	---AATGCCAT	
AC011468_8_3	CT-----	-----GGT	GCC-----	---AGGTTAT	CTACTGCCAT	ATCTAGAGCC	TGTTGTTTGA	GGAAATGCAGT	
AC011468_8_5	CT-----	-----GGC	ACCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGAAAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCAA	AGAATGCAGT	
AC011468_8_3	CT-----	-----GGC	GCCGGGCTCC	TTGAAGTTAT	CTACTGGGAA	ATCTAGAGCT	TATTGTTTGA	AGGATGCAGT	
AC010320_10	CT-----	-----GGC	ACCGGGCTCC	TTGAAGTTAT	CTATTGAGAA	ATCTAGCACC	TATTGTTTGA	AGAATGCAGT	
AC010320_10	CT-----	-----GGT	GCCGGGCTCC	TTGAAGTTAT	CTACTGGGAA	ATCTAGCACC	TATGTTTGA	AGGATGCAGT	
AC010320_10	CT-----	-----TGC	ACCGGGCTCC	TTGAAGTTAT	CTAATGAGAA	ATCTAGCACC	TATTATTCAA	AGGATGCAGT	
AL160191	CT-----	-----GGC	GCCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTGCTGGAAC	ATCTGGAGAC	TACTGTTCTA	AGAATGCAGT	
AC108162	CT-----	-----GGC	GCCGGGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGAGAC	ATCTAGAGCC	TATTGTTTGA	GGAAATGCAGT	
AC068722, AC	CT-----	-----GGT	GCCATGCTCC	TTGAGGTTAT	CTACTGGAAC	ATCTGGAGCC	TACTGTTCTA	AGAATGCAGT	

	250	260	270	280	290	300	310	320
Primer U5_297-for							CCTTCTCCCT	ATCTCTTTTA
4	CTTGGAAGGC	-TGCTCTGGA	GCAA-GCAGC	AGACCGACAA	CGA-----	--C--CC--	CCTTCTTGT	ATCTCTTCT-
6 5'LTR	CTTGCAAGGC	-TGCTCTGGA	GCAA-GCAGC	AGACCGACAA	CCA-----	--C--TCC-	-CTTCTTGT	ATCTCTTTT-
6 3'LTR	CTTGCAAGCC	-TGCTCTGGA	TCAA-GCCAC	AGACTGA--A	ACA-----	-C---CCC-	-C-----	-----
5562	CATGCAGACC	-TGCACTAAG	TCAA-GCAGC	TGACC-ACAA	CCA-----	--TCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
14274 (MER4BI)	CATGCAGGCC	-TGCCCTAAG	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
18810 5'LTR	TGTGCAAGCC	-TGCTCTAAG	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
18810 3'LTR	CGTGCAAGCT	-TGCTCTAAG	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CGA-----	--TCCCCT--	-TTCTCCCT	ATCTCCTTTA
20418 5'LTR	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	CTGAG-CAGC	TGACCTCTTC	TT-----	--CCACACC--	-CCTTCTCACT	ATCTCTTTTG
20418 3'LTR	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	CTGAG-CAGC	TGACCTCTTC	TT-----	--CCACACC--	-CCTTCTCACT	ATCTCTTTTG
31865 5'LTR	CATACAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGACCAACAA	CCA-----	--CTCCCT--	-C-TTC-CT	ATCTCCTTTA
31865 3'LTR	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGACCAACAA	CTG-----	--CCCCCT--	-G-CTCCAT	ATCTCCTTTA
33749 5'LTR	CTTGCAAGCC	-TGCTGTAAG	TCAA-GCTGC	TGACCAACAA	CCA-----	--CACCCC--	-CTTCTCGGT	ATCTCCTTTA
33749 3'LTR	CTTGCAAG--							
37164 5'LTR	CTTGCAAGCC	-TGCTGTAAG	TCAA-GCTGC	TGACCAACAA	CCA-----	--CCCCCAC	CCTTCTCCCT	ATCTCCTTTA
37164 5'LTR	CTTGCAAGCC	-TGCTGTAAG	TCAA-GCTGC	TGACCAACAA	CCA-----	--CCCCCAC	CCTTCTCCCT	ATCTCCTTTA
37164 5'LTR	CTTGCAAGCC	-TGCTGTAAG	TCAA-GCTGC	TGACCAACAA	CCA-----	--CCCCCAC	CCTTCTCCCT	ATCTCCTTTA
37164 3'LTR	CTTGCAAGCC	-TGCTGTAAG	TCAA-GCTGC	TGACCAACAA	CCA-----	--CCCCCAC	CCTTCTCCCT	ATCTCCTTTA
39913 5'LTR	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	C-GAG-CAGC	TGACCCCTTC	TT-----	--CCACCCC--	-CCTTCTCACT	ATCTCTTTTG
39913 3'LTR	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	CTGAG-CAGC	TGACCCCTTC	TT-----	--CCACTTC--	-CCTTCAACT	ATCTCTTTTG
43928 5'LTR	CTTGCAAGCC	-TGCTGTAAG	TCAA-GCCC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCG--	-C---CCCC	ATCTCCTTTA
43928 5'LTR	-----							
44020	CGTGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGATTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATTTCTTTA
44045	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGACC-ACAA	CCT-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATTTCTTTA
44188 5'LTR3	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	CTGAG-CAGC	TGACCCCTTC	TT-----	--CCACTC-C	-CCTTCTCACT	ATCTCTTTTG
44188 5'LTR3	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	CTGAG-CAGC	TGACCCCTTC	TT-----	--CCACTC-C	-CCTTCTCACT	ATCTCTTTTG
44260 5'LTR	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAAC	TGACTGACAA	TCA-----	--CCCCCT--	-C-CTCCCT	ATTTCTTTA
44260 5'LTR	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAAC	TGACTGACAA	TCA-----	--CCCCCT--	-C-CTCCCT	ATTTCTTTA
44276 5'LTR	CATGCAGGCC	-TGCTCTAAA	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CT--	ATTTCTTTA
44276 3'LTR	CATGCAGGCC	-TGCTCTAAA	TCAA-GTAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCTCT	ATTTCTTTA
44553 5'LTR	-----							
44553 5'LTR	-----							
44553 3'LTR	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	CCAAC-CAAC	TGACCTCTTC	TTCCAC--	-----CC-C	CCTTCTCACT	ATCGCTTTTC
44557 3'LTR	CTTGCAAGCC	-TGCTGTAAG	TCAA-GCCC	TGACCGACAA	TCA-----	--CCCCCAC	CTTCTCC--	-CTCTTTTA
44557 3'LTR	CTTGCAAGCC	-TGCTGTAAG	TCAA-GCCC	TGACCGACAA	CCA-----	--CCCCCAC	CTTCTCC--	-CTCTTTTA
44557 3'LTR	CTTGCAAGCC	-TGCTGTAAG	TCAA-GCCC	TGACCGACAA	CCA-----	--CCCCCAC	CTTCTCC--	-CTCTTTTA
AL139288	CATGCAGGCC	-TGCACTAAG	TCAA-GCAGC	TGACC-ACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-ATCCCT	ATCTCCTTTA
AC020914 LTR	CTTGCAAGCC	-TACTCTAGA	TGGAG-CAGC	TGACCTCTTC	TT-----	--CCACCCC-T	-CCTTCTCGGT	ATCTCTTTTG
AC020914 LTR	CTTGCAAGCC	-TACTCTAGA	TGGAG-CAGC	TGACCTCTTC	TT-----	--CCACCCC-T	-CCTTCTCGGT	ATCTCTTTTG
AC011460_1	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGACCGACAA	CCA-----	--CCCCCG--	-C-TCCT-T	ATTTCTTTA
AC011460_2	CTCACAAAGCC	-TGCTGTGAA	CCAAA-AGGC	CGACTGACAA	TTACTCGACA	ATCACCCC-C	CCTTCTCTCT	ATCTCTTTTG
AC011468	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	CTGAG-TAGC	TGACCCCTTC	TT-----	--CCACCCG--	-CCTTCTCACT	ATCTCTTTTG
U95741,U9574	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCTCT	ATCTCCTTTA
AC036111	CACGCAAGAC	-AGCACTAAA	TCAA-ACAAC	TGACCGACAA	TCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AC003973	CATGCAGGCC	-TTCATTAAG	TCAA-GCAGC	TGACC-ACAA	CCT-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AL035698	CATGCAGGCC	-TGTACTAAG	TCAA-GCAGC	TGACCGACAG	CCA-----	--CCCC-T--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AL445587	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGACCAACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-A-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AC128685	CATGCAGGCC	-TGCACTGAG	TCAA-GCAGC	TGACC-ACAA	TCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AC048344_44	TATGCAGGCC	-TGCACTAAG	TGAA-ACAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-C-CTCATT	ATTTCTTTA
AC025886	CATGCAGGCC	-TGTACTAAG	TCAA-GCAGC	TGACC-ACAA	CCT-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AC090014_10	CATGCAGGCC	-TGCACTAAG	TCAA-GCAGC	TGAAAC-ACGA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AC092103	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-C-CTCCCA	ATTTCTTTA
AL136419_3_1	CATACAAAGCC	-TACACTAAG	TCAA-GCAGC	TTACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AL136295_3	CATGCAGGCC	-TGCACTAAG	CCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCACTT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AL136419_3_2	CATGCAGGCC	-TGCACTAAG	CCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CTA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AC064870_5	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AP000640_5_3	-----							
AP000640_5_5	CTTGCAAGCC	-TGCACTGAG	TCAA-GCTGC	TGACCGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCA	ATCTCCTTTA
AL356285_9	CTTGCAAGCC	-AGCTGTAAG	TCAA-GCTGC	TGACCAACAA	CTG-----	--CCTCTT--	-----CCT	ATCTCCTTTA
AC011468_8	CGTGCAGGCC	-TGCACTAAG	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-C---CTCCCT	ATCTCCTTTA
AP000744_4_5	CATGCAGGCC	-ATGTACTAAG	TCAA-GCAGC	TGACCGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AP000744_4_3	-----							
AL159987_19	CATGCAGGCC	-TGCACTAAG	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AC020708_6	CCTGCAGGCC	-TGCACTAAG	TCAA-GCAGC	TGACC-ACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA
AL356858_19	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATTTCTTTA
AC008750_9	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-T-CTCCCT	ATTTCTTTA
AC020914_9_5	CTTGCAAGCC	-TACTCTAGA	TGGAG-CAGC	TGACCTCTTC	TT-----	--CCACCCC-T	-CCTTCTCGGT	ATCTCTTTTG
AC020914_9_3	CTTGCAAGCC	-TACTCTAGA	TGGAG-CAGC	TGACCTCTTC	TT-----	--CCACCCC-T	-CCTTCTCGGT	ATCTCTTTTG
AC011460_3	CATGCAGGCC	-TGCACTAAA	TCAA-GCAGC	TGACCGACAA	CCA-----	--CCCCCG--	-C-TCCT-T	ATTTCTTTA
AC011460_3_5	-----							
AC011460_3_5	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	CCAAC-CAAC	TGACCCCTTC	TTCCAC--	-----AC-C	CCTTCTCACT	ATCCCTTTTG
AC011460_3_5	TATGTGTACC	-TCTAATGAA	TCAAAGCAGC	TGACCAACCC	TTA-----	--CCTCTT--	-C---TCCCCT	ATTTGATCTA
AC011460_3_3	CTCACAAAGCC	-TGCTGTGAA	CCAAA-AGGC	CGACTGACAA	TTACTCGACA	ATCACCCC-C	CCTTCTCTCT	ATCTCTTTTG
AC011460_3_5	CTTGCAAGCC	-TCTCTGGA	CTGAG-CAGC	TGACCCCTTC	TT-----	--CCACTGCAC	CCCCCAACT	ATCTCTTTTG
AC011468_8_3	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	CTGAG-TAGC	TGACCCCTTC	TT-----	--CCACCCG--	-CCTTCTCACT	ATCTCTTTTG
AC011468_8_3	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	CTGAG-TAGC	TGACCCCTTC	TT-----	--CCACCCG--	-CCTTCTCACT	ATCTCTTTTG
AC011468_8_5	CGTGCAGGCC	-TGCACTAAG	TCAA-GCAGC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCCCCT--	-C---TCCCCT	ATCTCCTTTA
AC011468_8_3	CTTGCAAGCC	-TGCTGTGAT	CCAAA-CGCG	CGACTGA--G	TTACC-AACA	ATCACCCCCA	CTT-CTGGT	ATCTCCTTTA
AC010320_10	CTTGCAAGCC	-TGCTGTCAA	TCAA-CTGC	TGACCGA--	-----CA	ACCCCCCACC	GCT-CTGGT	ATCTCTTTTG
AC010320_10	CTCTCAAGCC	-TGCTGTGAA	CCAAAATTGC	CGACTGACAA	TTACCCAATA	ATCATCTCTCT	CTTTCTGGT	ATCTCTTTA
AC010320_10	CTTGCAAGCC	-TGCTGTGAA	CCAAA-CGCG	TGACTGACAA	TTACTCGACA	ATCACCCCTGC	CTTTCTGGT	ATCTCTTTTG
AL160191	CATGCAGGCC	-TGCGCCGAG	TCAA-GCAGC	CTACTGACAA	CCA-----	--CCTCTT--	-C---TCCCCT	ATTTCTTTT
AC108162	CTTGCAAGCC	-TACTCTGGA	CCCA-GCAGC	TGATT-TCTT	CTT-----	--CCACTCC	CTTTCTAGCT	ATCTCCTTTA
AC068722, AC	TGTGCAAGCC	-TGCACTGAG	TCAA-GCAAC	TGACTGACAA	CCA-----	--CCTCACT--	-T-CTCCCT	ATCTCCTTTA

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....|

410 420 430 440 450 460 470 480

Primer U5_459-for

TCGATT CRYCCYCCTT TGTTAC

4	-C-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTT-----	TTGTCTTT-A	TTCCACATT	CATCCTCCTC	TGTTCACTCC
6 5'LTR	-C-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTT-----	TTGTCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
6 3'LTR	-CGCCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTCTGTCTT	TTGTCTTT-A	TTCCACATT	CATCCTCCTT	TGTTCACTCC
5562	-TCCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTCTGTCTT	TTGTCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
14274 (MER4B)	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTCTGTCTT	TTGTCTTT-A	TTCCACATT	CATCCTCCTT	TGTTCACTCC
18810 5'LTR	-CCCC-CAAC	ACTTTATTC	AAA-TATATT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CATCCTCCTT	TGTTCACTCC
18810 3'LTR	-CCCTCAAC	TCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	TGTC--CTT	TGTTCACTCC
20418 5'LTR	-TCCCCTGA-	CCCTTCTTCC	AAA-CATATT	CTTTTGTCTC	TTGT-CTTTA	TTCCACATT	CATCCTCCTT	TGTTCACTCC
20418 3'LTR	-TCCCCTGA-	CCCTTCTTCC	AAA-CATATT	CTTTTGTCTC	TTGT-CTTTA	TTCCACATT	CATCCTCCTT	TGTTCACTCC
31865 5'LTR	--CCCCGAC	CCCTTCTTCC	AAA-CATACT	GTTTGTCT	TTGTCTTT-G	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
31865 3'LTR	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-CATACT	GTTTGTCT	TTGTCTTT-A	TTCCACATT	CATCCTCCTT	TGTTCACTCC
33749 5'LTR	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTCTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CATCCTCCTT	TGTTCACTCC
33749 3'LTR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
37164 5'LTR	-CCCC-GAC	CATGCTTCC	AAA-TATGCT	TTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
37164 5'LTR	-CCCCGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
37164 5'LTR	-CCCC-GAC	CATGCTTCC	AAA-TATGCT	TTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
37164 3'LTR	-CCCCGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
39913 5'LTR	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
39913 3'LTR	-CTTCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
43928 5'LTR	CCC-CCGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CATCCTCCTT	TGTTCACTCC
43928 5'LTR	-CCCC-GAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CATCCTCCTT	TGTTCACTCC
44020	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
44045	-TCCGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
44188 5'LTR3	-CCCC-GAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
44188 5'LTR3	-TCCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
44260 5'LTR	-CCCC-AAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
44260 5'LTR	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
44276 5'LTR	-CCCC-GAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
44276 3'LTR	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
44553 5'LTR	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
44553 5'LTR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
44553 3'LTR	-CCCCGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
44557 3'LTR	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
44557 3'LTR	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AL139288	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC020914 LTR	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC020914 LTR	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011460_1	-CCCC-GAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011460_2	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011468	-TCCCTGAT	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
U95741,U9574	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC036111	-CTCCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC003973	-GCCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AL035698	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AL445587	-CACCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC128685	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC048344_44	-ACCCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC025886	-CCCTGAT	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC090014_10	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC092103	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AL136419_3_1	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AL136295_3	-CCTCTGAT	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AL136419_3_2	-CCTCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC064870_5	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AP000640_5_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AP000640_5_5	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AL356285_9	TCCTCCCAAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011468_8	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AP000744_4_5	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AP000744_4_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AL159987_19	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC020708_6	-CCCC-GAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AL356858_19	-CCCC-GAC	TCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC008750_9	-CCCC-GAC	TCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC020914_9_5	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC020914_9_3	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011460_3	-CCCC-GAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011460_3_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC011460_3_5	-TCCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011460_3_5	-TCCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011460_3_5	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011468_8_3	-TCCCTGAT	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011468_8_3	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011468_8_5	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC011468_8_3	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC010320_10	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC010320_10	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC010320_10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC010320_10	-TCCCTGAT	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC1160191	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC108162	-CCCCGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC
AC068722, AC	-CCCTGAC	CCCTTCTTCC	AAA-TATACT	CTTTTGTCT	TTATCTTT-A	TTCCACATT	CGTCCCTCCT	TGTTCACTCC

	490	500	510	520	530	540
4	AACAGGGTCC	ATGGCA	----	-----	-----	-----
6 5'LTR	AACAGTGTCC	ATGGCA	----	-----	-----	-----
6 3'LTR	AACAGGGACT	GTGGCA	----	-----	-----	-----
5562	AGCAAGGTCC	ACAGCA	----	-----	-----	-----
14274 (MER4B)	ACCAGGGTCT	GCGGCA	----	-----	-----	-----
18810 5'LTR	AACAGGGATT	G-GATCTGCA	TCA	-----	-----	-----
18810 3'LTR	AACAGGGATT	G-GGTCTGGG	TCA	-----	-----	-----
20418 5'LTR	ACCAGGGATC	CTGGCAGGCT	GCA-AGTGGT	GCC-TC-GAA	CAGCAACAGA	ATCTGGTGCT TTACA
20418 3'LTR	ACCATGGATC	CTGGCAGACT	ACA-AGTGGC	GCC-TC-GAA	CAGCGACAGA	ATTAGGTGCT CTACA
31865 5'LTR	ACCAGGGTGT	GCGGCA	----	-----	-----	-----
31865 3'LTR	ACCAGGGTCT	GCAGCA	----	-----	-----	-----
33749 5'LTR	AACAGGGACT	GGGGC	----	-----	-----	-----
33749 3'LTR	-----	-----	-----	-----	-----	-----
37164 5'LTR	ACCAAGGTCC	AT	-----	-----	-----	-----
37164 5'LTR	AACAGGG	----	-----	-----	-----	-----
37164 5'LTR	ACCAAGGTCC	ATTCA	----	-----	-----	-----
37164 3'LTR	AACAGGG	----	-----	-----	-----	-----
39913 5'LTR	CCC-TAGGTC	CATGTGGGTT	ACATAGTGGC	GCCGCA-GAA	CAGGGAC	----
39913 3'LTR	CCC-TAGGTC	CTTGCAGGTT	ACA-AATGG	-----	-----	-----
43928 5'LTR	AACAGGGATG	G-AATCCGTG	GCA	-----	-----	-----
43928 5'LTR	AACAGGGATC	AAGTCCAGTG	ACAGT	-----	-----	-----
44020	AGGCTCCATG	ACAA	----	-----	-----	-----
44045	AATAAGGTCT	GCAGCA	----	-----	-----	-----
44188 5'LTR3	ACC-TAGGTC	CGTGCAGGTT	ACA-AATGGC	AAC-CA-GAA	CAGGGAC	----
44188 5'LTR3	-CA-TGGGTC	CATG	-----	-----	-----	-----
44260 5'LTR	ACCAGGGTCT	GTGGCA	----	-----	-----	-----
44260 5'LTR	TCTGGGGTCT	GTGGCA	----	-----	-----	-----
44276 5'LTR	AGTAGGGTTC	ATGGCA	----	-----	-----	-----
44276 3'LTR	AGTAGGGTCC	GTGTA	----	-----	-----	-----
44553 5'LTR	ACCAGGGATC	ATGGCACGTT	ACATAGTGGT	GCCCC--GAA	CAGCGACAGA	ATCAGGGGCT CTACA
44553 5'LTR	-----	-----	-----	-----	-----	-----
44553 3'LTR	ACCAGGGATC	ATGGCACGTT	ACATAGTGGC	GCCCC--GAA	CAGCCACAGA	ATCGGGTGCT CGATA
44557 3'LTR	CCCAAGGTCC	ATG	-----	-----	-----	-----
44557 3'LTR	CCCAAGGTCT	GTG	-----	-----	-----	-----
ALL39288	ACCAAGGCCCC	ATAGCA	----	-----	-----	-----
AC020914 LTR	CCC-AAGTTC	CGTGCAGTTT	ACA-AGCGGT	GCCCC--GAA	CAGTGACAGG	ATTGGGCAGT CTACA
AC020914 LTR	CCC-TAGGTC	CATGAGGATT	ACATAGTGGC	ACC-CC-GAA	CAGCGACA-A	ATTGAGTGCT CAACA
AC011460_1	AGTAGGGTCC	GTGGCA	----	-----	-----	-----
AC011460_2	ACCAGGAATC	ATGGTCAGTT	ACA-ACTGGC	GCCCC--AAA	CAGCGACAGA	ATCGGGCAGT CTACA
AC011468	CCC-TAGGTC	CTTGTGGGTT	ACGTAGTGGC	GCCCCA--AA	CAGTGACAGG	ATCGGGCGCT CTACA
U95741,U9574	ACCAGGGTCT	GCAACA	----	-----	-----	-----
AC036111	ACCAGGGTCT	GTGGCA	----	-----	-----	-----
AC003973	AATAAGGTCT	GCAGCA	----	-----	-----	-----
AL035698	ACCAGGATCT	GTGGCA	----	-----	-----	-----
AL445587	ACCAGGGTCC	ATGGCA	----	-----	-----	-----
AC128685	AATAGGGTCT	GCAGCA	----	-----	-----	-----
AC048344.44	ACCAGGGTCC	GTGGCA	----	-----	-----	-----
AC025886	AATAAAGTCC	ACAGCA	----	-----	-----	-----
AC090014.10	ACCAAGGCCCC	GCG	----	-----	-----	-----
AC092103	ACCAGGGTCT	GTGGCA	----	-----	-----	-----
ALL136419.3_1	ACCAAGGACT	GTGGCA	----	-----	-----	-----
ALL136295.3	ATGAAGGACT	GCGGCA	----	-----	-----	-----
ALL136419.3_2	ACCAAGGACT	GTGGCA	----	-----	-----	-----
AC064870.5	ACCAGCGTCC	GCGG	----	-----	-----	-----
AP000640.5_3	AACAGGG	----	-----	-----	-----	-----
AP000640.5_5	AACAGGG	----	-----	-----	-----	-----
AL356285.9	AACAGGG	----	-----	-----	-----	-----
AC011468.8	AC	-----	-----	-----	-----	-----
AP000744.4_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AP000744.4_3	ACCAGGGTCC	GTGGCA	----	-----	-----	-----
AL159987.19	AGCAAGGTCT	GCAGCA	----	-----	-----	-----
AC020708.6	AGCAAGGTCC	GCGGCA	----	-----	-----	-----
AL356858.19	ACCAGGGTCC	GTGGCA	----	-----	-----	-----
AC008750.9	ACCAGGGTCC	GTGGCA	----	-----	-----	-----
AC020914.9_5	CCC-AAGTTC	CGTGCAGTTT	ACA-AGCGGT	GCCCC--GAA	CAGTGACAGG	ATTGGGCAGT CTACA
AC020914.9_3	CCC-TAGGTC	CATGAGGATT	ACATAGTGGC	ACC-CC-GAA	CAGCGACA-A	ATTGAGTGCT CAACA
AC011460.3	AGTAGGGTCC	GTGGCA	----	-----	-----	-----
AC011460.3_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC011460.3_5	ACCAGGGATT	GTGGCAGGTT	ACATAGTGGC	CCCCCCCCAA	CAGTGACAGA	ATCGAGTGCT CCACA
AC011460.3_5	CATAGGAAC	--AGACTGTA	ACAG	-----	-----	-----
AC011460.3_3	ACCAGGAATC	ATGGTCAGTT	ACA-ACTGGC	GCCCC--AAA	CAGCGACAGA	ATCGGGCAGT CTACA
AC011460.3_5	CCC-TAGGTC	TGTGCGGTTT	ACA-AGTGGC	GCC-CA--AA	CAGGGACAGA	ATTGGGTGCT CTACA
AC011468.8_3	CCC-TAGGTC	CTTGTGGGTT	ACGTAGTGGC	GCCCCA--AA	CAGTGACAGG	ATCGGGCGCT CTACA
AC011468.8_3	TCC-TAGGTC	CATGTGGGTT	ACATAGTGGC	ACC-CT-GAA	CAGCGACAGA	ATCAGGTGCT CTACA
AC011468.8_5	AC	-----	-----	-----	-----	-----
AC011468.8_3	ACCAGGG	----	-----	-----	-----	-----
AC010320.10	CCCTAGGTCC	GTGC	-----	-----	-----	-----
AC010320.10	ACCAGGGATC	GTGGCAGGTT	ACATGGT	-----	-----	-----
AC010320.10	CCC-TAGGTC	CATGTGGGTT	ACA-AGTGGC	GCC-T--GAA	CAGGGACAGA	ATTGGGTGCT
ALL60191	AACAGGGATT	G-GGACCGTG	ACA	-----	-----	-----
AC108162	ACCAGGGATC	GAGGATGTA	ACAAGTGGCA	TCCAGACA	GGGACTCCAA	GGTTGTCAAC A----
AC068722, AC	AACAGGG	----	-----	-----	-----	-----

7.1.4 Vergleich der Sequenzierungen mit der *NCBI*-Datenbank

Bande 1: U3-NHEM (~210 bp im präparativen Gel)

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 10      20      30      40      50      60      70      80
TCCCTTTGGC CTTTTGGCT CCCAACATCC CGCGTACTCT GCGTTGATAC CACTGCTGCG GTACTCTGCG TTGATACCAC TGCT

```

```

 ref|NT\_011387.8|Hs20\_11544 D Homo sapiens chromosome 20 genomic contig,
reference assembly
Length=26259569

```

```

Score = 58.0 bits (29), Expect = 2e-07
Identities = 29/29 (100%), Gaps = 0/29 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

```

Query 1          TCCCTTTGGCCTTTTTGGCTCCCAACATC 29
                |||
Sbjct 25315239  TCCCTTTGGCCTTTTTGGCTCCCAACATC 25315267

```

```

 gb|EL585123.1| 09R_G22.2 Novel Promoters 5' RACE-PCR Homo sapiens cDNA
5', mRNA sequence. → Trinklein et al., 2007
Length=94

```

```

Score = 91.5 bits (100), Expect = 2e-16
Identities = 54/55 (98%), Gaps = 1/55 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

```

Query 31  CGCGTACTCTGCGTTGATACCACTGCT-CGCGTACTCTGCGTTGATACCACTGCT 84
                |||
Sbjct 39  CGCGTACTCTGCGTTGATACCACTGCTTCGCGTACTCTGCGTTGATACCACTGCT 93

```

```

 emb|AJ293392.1| UE Homo sapiens mRNA differentially expressed in
malignant melanoma, clone MM K2
Length=557

```

```

Score = 80.6 bits (88), Expect = 3e-13
Identities = 52/56 (92%), Gaps = 2/56 (3%)
Strand=Plus/Plus

```

```

Query 31  CGCGTACTCTGCGTTGATACCACTGCT--CGCGTACTCTGCGTTGATACCACTGCT 84
                |||
Sbjct 180 CGCGTACTCTGCGTTGTTACCACTGCTTTTCGCGTACTCTGCGTTGTTACCACTGCT 235

```

Bande 2: U3-SK-Mel-28 (~120 bp im präparativen Gel)

```

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
.....|
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
AGCAGTGGTA TCAACGCAGA GTACGCAGGT GTTGGGAGCC GAAGGCCCAT GGGATGTGAC CAACTCAGCA TTCCACTGGA GGCTGCATGA
TCT

```

```

> ref|NT\_007299.12|Hs6\_7456 D Homo sapiens chromosome 6 genomic contig,
reference assembly
Length=33500716

```

```

Score = 30.2 bits (15), Expect = 51
Identities = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

```

Query 1      AGCAGTGGTATCAAC 15
          |||
Sbjct 8573748 AGCAGTGGTATCAAC 8573762

```

```

> ref|NT\_025741.14|Hs6\_25897 D Homo sapiens chromosome 6 genomic contig,
reference assembly
Length=61645385

```

```

Score = 28.2 bits (14), Expect = 201
Identities = 14/14 (100%), Gaps = 0/14 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

```

Query 16      GCAGAGTACGCAGG 29
          |||
Sbjct 56155043 GCAGAGTACGCAGG 56155056

```

```

> gb|EL585072.1| 09R_E17.2 Novel Promoters 5' RACE-PCR Homo sapiens cDNA
5', mRNA sequence. → Trinklein et al., 2007
Length=73

```

```

Score = 58.0 bits (29), Expect = 1e-06
Identities = 29/29 (100%), Gaps = 0/29 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

```

Query 1      AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCAGG 29
          |||
Sbjct 2      AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCAGG 30

```

```

> gb|AA400141.1| E zu69d03.s1 Soares_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone
IMAGE:743237
3' similar to contains LTR3.b3 LTR3 repetitive element; mRNA sequence
Length=411

```

```

Score = 84.2 bits (92), Expect = 4e-14
Identities = 51/54 (94%), Gaps = 0/54 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

```

Query 39      CCGAAGGCCCATGGGATGTGACCAACTCAGCATTCCACTGGAGGCTGCATGATC 92
          |||
Sbjct 347     CCGAAGGCCCATGGGACGTGACCAACTCAGCATTCCACTGGAGGCTATATGATC 294

```


```

> gb|EL953732.1| human_008085 human eyeball cDNA Library Homo sapiens cDNA
5',
mRNA sequence.
Length=582

```



```

>  gb|BE328009.1 hu31f08.x1 NCI_CGAP_Mel15 Homo sapiens cDNA clone
IMAGE:3171687
3' similar to contains LTR3.t2 LTR3 repetitive element ;,
mRNA sequence.
Length=438

Score = 71.6 bits (78), Expect = 3e-10
Identities = 55/63 (87%), Gaps = 3/63 (4%)
Strand=Plus/Minus

Query 33  TGGGAGCCGAA--GGCCCATGGGAT-GTGACCAACTCAGCATTCCACTGGAGGCTGCATG 89
          |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 425  TGGGAGCCAAAAAGGCCGAAGGGATCGTGACCAACTCAGCATTCCACTGGAGGCTATATG 366

Query 90  ATC 92
          |||
Sbjct 365  ATC 363

```



Bande 3: U3-A-375 (~110 bp im präparativen Gel)

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10      20      30      40      50      60      70      80      90
AGCAGTGGTA TCAACGCAGA GTACGCGGGC GAGAGAGAAA AAAGAAAGGA CTGTAGAGAG CCAAAGCCA AAGGGTCAAC CAACTCAGCA
TCCACTGAAG GCTGCATGAT CTT

```

```

>  ref|NT\_004487.18|Hs1\_4644  Homo sapiens chromosome 1 genomic contig,
reference assembly
Length=56413061

```

```

Score = 32.2 bits (16), Expect = 26
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 4          AGTGGTATCAACGCAG 19
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 33828263  AGTGGTATCAACGCAG 33828248

```


```

Score = 30.2 bits (15), Expect = 102
Identities = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 23          ACGCGGGCGAGAGAG 37
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 6896863  ACGCGGGCGAGAGAG 6896877

```

```

>  gb|EL582426.1 01R_B02.1 Novel Promoters 5' RACE-PCR Homo sapiens cDNA
5', mRNA sequence.
Length=118

```

```

Score = 63.9 bits (32), Expect = 4e-08
Identities = 32/32 (100%), Gaps = 0/32 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1          AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGCGA 32
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 117  AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGCGA 86

```




```

Query 141 CTTTAATCGTTGAACAAACGATCCTTTAATAGCGGCTGCACCATCGGGATGTCCTGATCC 200
          |||
Sbjct 427 CTTTAATCGTTGAACAAACGAACCTTTAATAGCGGCTGCACCATCGGGATGTCCTGATCC 368

Query 201 AACATCGAGGTCGTAAACCCTATTGTTGATATGGACTCTAGAATAGGATTGCGCTGTTAT 260
          |||
Sbjct 367 AACATCGAGGTCGTAAACCCTATTGTTGATATGGACTCTAGAATAGGATTGCGCTGTTAT 308

Query 261 CCCTAGGGTAACTTGTTCGGTTGGTCAAGTTATTGGATCAATTGAGTA 308
          |||
Sbjct 307 CCCTAGGGTAACTTGTTCGGTTGGTCAAGTTATTGGATCAATTGAGTA 260

```



>  [ref|NT_005612.15|Hs3_5769](#) Fehler! Hyperlink-Referenz ungültig. Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, reference assembly
Length=100530253

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.002
Identities = 25/26 (96%), Gaps = 0/26 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 301          ATTGAGTAAAAGAGATAGGAAGAAGG 326
          |||
Sbjct 64834290 ATTGAGTAAAAGAGATAGGGAGAAGG 64834315

```

>  [ref|NT_007995.14|Hs8_8152](#)  Homo sapiens chromosome 8 genomic contig, reference assembly
Length=14159284

this subject sequence by: Sort alignments for

E value [Score](#)

[Percent identity](#) [Query start](#)

[position](#) [Subject start position](#)

Features in this part of subject sequence:
[a disintegrin and metalloprotease domain 32](#)

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.002
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 327          CTGAACAAAGGAGGACGAATGC 347
          |||
Sbjct 9346056 CTGAACAAAGGAGGACGAATGC 9346077

```




Bande 6: U5-A-375_2 (~100 bp im präparativen Gel)

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 10    20    30    40    50    60    70    80    90
GCATTCGTCC CCCTTTGTTT AGTCCAACAG GGATTGGGTC CACGTCAGCT TTC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 100   110
GAAGATGTCC TAGA

```

```

>  ref|NT\_010966.13|Hs18\_11123  Homo sapiens chromosome 18 genomic contig,
reference assembly
Length=33548238

```

Features in this part of subject sequence:
[myosin VB](#)


Score = 80.6 bits (88), Expect = 7e-14
Identities = 49/52 (94%), Gaps = 0/52 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 2          cattcgtccccctttgttcagtccaacagggattgGGTCCACGTCAGCTTTC 53
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 28896612  CATTCAATCCCCTTTTGTTCAGTCCAACAGGGATTGGGTCCACATCAGCTTTC
28896663

```

```

>  gb|U60268.1|HSU60268 Human endogenous retrovirus HERV-K(HML6) clone
HML6.17, 5'LTR
and downstream sequence
Length=558

```



Score = 48.2 bits (52), Expect = 0.002
Identities = 29/31 (93%), Gaps = 0/31 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 4          TTCGTCCCCCTTTGTTCAGTCCAACAGGGAT 34
                ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 328        TTCATCCCCCTTTGTTCAGTCCACCAGGGAT 358

```

```

>  gb|EL585000.1|  09R_B17.2 Novel Promoters 5' RACE-PCR Homo sapiens cDNA
5', mRNA
sequence.
Length=565

```

Score = 44.6 bits (48), Expect = 0.026
Identities = 29/31 (93%), Gaps = 1/31 (3%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 2          CCCGGCGTACTCT-CGTTGATACCTCTGCTT 31
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 535        CCCGGCGTACTCTGCGTTGATACCACTGCTT 565

```

7.2 Datenbankerstellung für makakenspezifische HML-2 Primer

Alignment: HERV-K (HML-2) vs. *Macaca mulatta*

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                6360      6370      6380      6390      6400
HML-2 (human)  GTTAGAAAAG GGCATATTTG AGCCTTCGTT CTCACCTGG AATTCTCCTG
HML-2 human-For ----- -TCCCCTGG AATACTCCTG
AC189025.2 (mac)-----T CTCGCCCTGG AATTCTCCTG
AC189966.3 (mac)-----T CTCTCTTAG AATTCTCTAG
HML-2 mac-For ----- -TCCCCTGG AATTCTCCTG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                6410      6420      6430      6440      6450
HML-2 (human)  TGTTTGTAAAT TCAGAAGAAA TCAGGCAAAT GCGGTATGTT AACTGACTTA
HML-2 human-For TTTTYGT-----
AC189025.2 (mac)TGTTTGTAAAT TCAGAAAAAA TCCGGCAGAT GCGGTGTGTT AACTGACTTA
AC189966.3 (mac)TGTTTGTAAAT TCAGAAAAAA TCCGGCAGAT GCGGCATGCT GACTGACTTA
HML-2 mac-For  TGTTTGT-----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                6460      6470      6480      6490      6500
HML-2 (human)  AGGGCTGTAA ACGCCGTAAT TCAACCCATG GGGCCTCTCC AACCCGGGTT
AC189025.2 (mac)AGAGCCATAA ATGCCATAAT TCAACCCACG GGGCCTCTTC AACCCGGATT
AC189966.3 (mac)AGAGCCGTTA ATGGGGTAAT TCAACCCATG GGGGCTCTCC AACCCCGTCT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                6510      6520      6530      6540      6550
HML-2 (human)  GCCCTCTCCA GCCATGATCC CAAAAGATTG GCCTTTAATT ATAATTGATC
AC189025.2 (mac)GCCCTGCCA GCCATGATTC CAAAAGACTG GCCTTTAATT ATAATTGATC
AC189966.3 (mac)GCCCTCTCCG GCCATGATTC CAAAAGACTG GCCTTTAATT AAAATTGCTC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                6560      6570      6580      6590      6600
HML-2 (human)  TAAAGGATTG CTTTTTT-AC CATCCCTCTG GCAGAGCAGG ATTGCGAAAA
AC189025.2 (mac)TGAAAGATT TTTTTTTTAC CATTCTCTG GCAGAGCAGG ATTGTGAAAA
AC189966.3 (mac)TGAAGGATCG CTTTTTT-AT CATTCTCTG GCAAAACAGG ATTTTGAAAA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                6610      6620      6630      6640      6650
HML-2 (human)  ATTTGCCTTT ACTATACCAG CCATAAATAA TAAAGAACCA GCCACCAGGT
AC189025.2 (mac)ATCTGCCTTT AGTATACCAG CCACAAATAA TAAAGAACAA GCCACCAGGT
AC189966.3 (mac)ATTTGCCTTT ACTATACCAG CCATAAATAA TAAAGAACCA GCCACCAGGT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                6660      6670      6680      6690      6700
HML-2 (human)  TTCAGTGGAA AGTGTTACCT CAGGGAATGC TTAATAGTCC AACTATTTGT
HML-2 human-Rev ~-CARTGGAA AGTTTTACCA CAAGGAATG-
AC189025.2 (mac)TTCAGTGGAA AGTGTACCT CAGGGAATGC T-----
AC189966.3 (mac)TTTAGTGGAA AGTCTGCCT CAGGGAATGC T-----
HML-2 mac-Rev  --CARTGGAA AGTKTTACCT CAGGGAATG-

```

ABBILDUNGS-, GLEICHUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen

Abbildung 1-1: Aufbau eines Retroviruspartikels.....	1
Abbildung 1-2: Genomorganisation der RNA von Retroviren und einer integrierten Provirus-DNA.....	1
Abbildung 1-3: Zusammensetzung des humanen Genoms	1
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des proviralen Aufbaus und der entstehenden Transkripte von HERV-K.....	1
Abbildung 1-5: Struktur von HERV-K-MEL DNA, das gespleißte Transkript und die Sequenz von cDNA 104.	1
Abbildung 1-6: Expression der HERV-K-MEL Gens in normalen und Tumorgeweben.....	1
Abbildung 1-7: Vereinfachter schematischer Ablauf des RNAi-Mechanismus in Bezug auf siRNAs in Säugetieren.	25
Abbildung 2-1: Vektorkarte des pJET1.2-Vektors.	35
Abbildung 2-2: Prinzip des <i>SybrGreen</i> -Assays und der <i>TaqMan</i> -PCR.	1
Abbildung 2-3: Das Prinzip der SMART-Technologie.	1
Abbildung 2-4: Lage der siRNAs gegen <i>HERV-K-MEL</i> auf dem von <i>SCHIAVETTI</i> propagiertem <i>env</i> -Transkript	1
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Impedanz-Messung mittels Xcelligence System	64
Abbildung 3-1: Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zelllinien.	69
Abbildung 3-2: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate aus der 5'-RACE-PCR.....	1
Abbildung 3-3: Lokalisation der Primer zur Amplifikation von HERV-K-MEL in der qRT-PCR.....	1
Abbildung 3-4: Endogene Expression von <i>HERV-K-MEL</i> in Melanozyten (NHEM) und Melanomzelllinien (SK-Mel-28 und A-375) mittels qRT-PCR.....	1
Abbildung 3-5: Mikroskopische Bestimmung der Transfektionseffizienzen mit Cy3-markierter siRNA gegen <i>GAPDH</i> in SK-Mel-28 mit verschiedenen Transfektionsagenzien.	1

Abbildung 3-6: Quantitative Bestimmung der Transfektionseffizienzen nach Verwendung von Cy3-markierter siRNA gegen <i>GAPDH</i> in SK-Mel-28 im FACS.	1
Abbildung 3-7: Vergleich der verbliebenen Expression unter Verwendung von siRNAs gegen <i>Bcl2</i> in SK-Mel-28.	1
Abbildung 3-8: Titration des optimalen siRNA:Transfektionagens-Verhältnisses unter Verwendung von siRNA gegen <i>GAPDH</i> und Nanofectin siRNA Agenz auf A-375-Zellen.....	1
Abbildung 3-9: Von SCHIAVETTI postuliertes <i>HERV-K-MEL env</i> -Transkript vor und nach Spleißen.....	1
Abbildung 3-10: Lage der verwendeten siRNAs zum Silencing von <i>HERV-K-MEL</i>	1
Abbildung 3-11: Relative Quantifizierung der <i>HERV-K-MEL</i> Expression nach Transfektion mit verschiedenen siRNAs gegen <i>HERV-K-MEL</i> mittels qRT-PCR.....	1
Abbildung 3-12: Mikroskopische Aufnahmen nach Transfektion bzw. AMG-Behandlung von A-375 (48 h p.t.).....	1
Abbildung 3-13: Veränderungen der Zellzahlen nach Transfektion bzw. AMG-Behandlung von Melanomzellen.....	1
Abbildung 3-14: FACS-Analyse von A-375-Zellen, die für 48 h mit 4 mM AMG behandelt wurden.	1
Abbildung 3-15: Impedanz-Messung von zwei unabhängigen Transfektionen auf SK-Mel-28.	1
Abbildung 3-16: Schematische Übersicht der Apoptosewege.....	1
Abbildung 3-17: Relative Quantifizierung der <i>Bcl2</i> -Expression nach Transfektion mit verschiedenen siRNAs gegen <i>HERV-K-MEL</i> mittels qRT-PCR.....	1
Abbildung 3-18: Relative Quantifizierung der Expression in den Melanomzelllinien nach <i>HERV-K-MEL</i> Silencing mittels qRT-PCR.....	1
Abbildung 3-19: Relative Quantifizierung der Expression in den Melanomzelllinien nach <i>Bcl2</i> -Silencing mittels qRT-PCR.....	1
Abbildung 3-20: Schematische Übersicht der Apoptosewege.....	1

Abbildung 3-21: Expressionsanalyse ausgewählter Apoptosegene in den verschiedenen Zelllinien.	1
Abbildung 3-22: Expression ausgewählter Apoptosegene nach Silencing in SK-Mel-28..	1
Abbildung 3-23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Transduktion von SK-Mel-28 mit Ad-EGFP mit unterschiedlichen MOIs 48 h p.t. ..	1
Abbildung 3-24: Verbleibende Expression nach Transduktion von SK-Mel-28 mit Adeno-shRNA-Viren bei einer MOI von 40.....	1
Abbildung 3-25: Klonierplanung für einen <i>HERV-K-MEL env</i> -Überexpressionsklon.	109
Abbildung 3-26: Typische Viruslastverläufe bei SIV-infizierten Makaken.	1
Abbildung 3-27: Quantifizierung der <i>HERV-K (HML-2)</i> Expression ausgewählter Tiere (<i>Macaca mulatta</i>) durch qRT-PCR.	1
Abbildung 3-28: SIV-Viruslastverlauf und <i>HERV-K (HML-2)</i> Expression nach SIV-Infektion von C8166.....	1
Abbildung 3-29: Ergebnisse eines <i>HERV</i> -spezifischen Mikroarrays.	1
Abbildung 3-30: Relative Quantifizierung der Expression verschiedener HML-Mitglieder nach SIV-Infektion in C8166 mittels qRT-PCR.....	1
Abbildung 3-31: Relative Quantifizierung der Expression verschiedener HML-Mitglieder nach SIV-Infektion in C8166 mittels qRT-PCR in einer weiteren Versuchsreihe.	1
Abbildung 4-1: Schematische Übersicht des Apoptosesignalweges nach <i>HERV-K-MEL</i> Silencing in SK-Mel-28.	1
Abbildung 4-2: Schematische Übersicht des Apoptosepathways nach AMG-Behandlung in SK-Mel-28.....	1
 Gleichungen	
Gleichung 1: Konzentrationsberechnung mit dem Spektralphotometer.	43
Gleichung 2: Berechnung des Gensilencings und der verbleibenden Expression.	62

Tabellen

Tabelle 1-1: Einteilung und charakteristische Vertreter der Retroviren.	3
Tabelle 1-2: Assoziation und Auftreten verschiedener HERV-Familien in Geweben und bei Krankheiten.....	11
Tabelle 2-1: Verwendete Geräte	29
Tabelle 2-2: Verwendetes Verbrauchsmaterial	30
Tabelle 2-3: Verwendete Kits	30
Tabelle 2-4: Verwendete Polymerasen	31
Tabelle 2-5: Verwendete Primer.....	31
Tabelle 2-6: Verwendete Bakterien, Plasmide und Cosmide	33
Tabelle 2-7: Für die Gelelektrophorese verwendete Marker und Ladepuffer ...	40
Tabelle 2-8: Verwendete Zellen	45
Tabelle 2-9: Verwendete Kulturmedien	46
Tabelle 2-10: Annealingtemperatur der LTR-spezifischen Primer.....	56
Tabelle 2-11: Verwendete siRNAs unter Angabe der Sequenz	57
Tabelle 2-12: Verwendete Adeno-shRNA-Viren mit Zielsequenz.....	58
Tabelle 2-13: Verwendete siRNA-Transfektionsagenzien.....	59
Tabelle 2-14: Übersicht der Bedingungen für die liposomen-basierte Transfektion	60
Tabelle 3-1: LTR3-spezifische Primer für die 5'-RACE-PCR.....	70
Tabelle 3-2: Übersicht der Expressionsveränderungen ausgewählter apoptoseassoziiierter Gene nach Transfektion bzw. Behandlung mit AMG in SK-Mel-28.....	104
Tabelle 4-1: Gegenüberstellung der Expressionsprofile ausgewählter Apoptosegene dieser Arbeit und von SALVUCCI	132

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. H.-J. Fritz danke ich für die externe Betreuung der vorliegenden Arbeit und deren Vertretung im Fachbereich Biologie der Georg-August-Universität Göttingen.

Herrn Prof. Dr. W. Liebl danke ich für die Übernahme des Korreferates dieser Arbeit.

An Herrn Prof. Dr. G. Hunsmann geht mein ganz besonderer Dank für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Deutschen Primatenzentrum in der Virologie & Immunologie anzufertigen und die Hilfe in den letzten Tagen der Fertigstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt meinen Betreuern Dr. Stephan Fröde, der mir in den ersten Jahren meiner Arbeit eine Menge beigebracht hat, und Dr. Dirk Motzkus, der meine Betreuung nach dem Ausscheiden von Dr. Fröde übernommen hat. Die Jahre mit Euch haben mich definitiv geprägt.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung bedanken, die mir während meiner gesamten Doktorarbeit fachlich und persönlich zur Seite gestanden haben. Ohne Eure seelische und moralische Unterstützung hätte ich vielleicht aufgegeben. Besonders Karin und Betty möchte ich an dieser Stelle danken. Ihr habt mich immer wieder aufgebaut!

Auch bei meinen Freunden möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Ich habe mich in Göttingen sehr, sehr wohl gefühlt und werde die Zeit mit Euch nicht vergessen. Ohne Euch wäre ich heute nicht dort, wo ich jetzt bin. Besonders Meike gilt mein großer Dank. Du warst in den letzten Jahren immer für mich da und hast mir gezeigt, dass ich auf Dich zählen kann.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ihr habt mir ermöglicht, meine Ziele zu erreichen, sowohl durch finanzielle als auch moralische Unterstützung. Meiner Schwester Julia möchte ich an dieser Stelle noch sagen: Glaub an Dich! Dann kannst Du alles schaffen!

LEBENS LAUF

Nadine Keiner

Geboren am 25.12.1980 in Stadtoldendorf

Nationalität: Deutsch

- | | |
|-------------------|--|
| Seit 11/2005 | Doktorandin in der AG „Endogene Retroviren“,
Abteilung Virologie und Immunologie,
Deutsches Primatenzentrum GmbH,
Leibniz Institut für Primatenforschung, Göttingen |
| 10/2004 – 08/2005 | Diplomarbeit „NS1-Deletionsmutanten von Influenza-
A-Viren“,
Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg |
| 10/2000 – 08/2005 | Diplomstudiengang Biologie,
Philipps-Universität Marburg |
| 08/1993 – 07/2000 | Besuch des Campe-Gymnasiums Holzminden,
Abschluss: Abitur |
-

Göttingen, den 25.05.09

Nadine Keiner