

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker -

**Nachweis von HERV-K rec/cORF-Sequenzen in malignen  
Tumoren**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
vorgelegt von

Lütz, Christiane  
aus Berlin  
Mai 2006

Gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. H. Herbst

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker -  
Referent:: Univ.-Prof. Dr. med. H. Herbst  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch

## **Nachweis von HERV-K rec/cORF-Sequenzen in malignen Tumoren**

Christiane Lütz

Die Expression von Genprodukten des Humanen Endogenen Retrovirus-K (HERV-K) ist mit Keimzellneoplasien eng assoziiert. HERV-K Proviren kodieren über Spleiß-Mechanismen auch nicht-strukturelle Proteine, darunter das p15<sup>Rec/cORF</sup>, das in Experimentalsystemen transformierende Eigenschaften hat und das PLZF-Protein, einen Transkriptionsfaktor, bindet. Daher ist die Antwort auf die Frage, ob gespleißte rec/cORF Transkripte in Keimzelltumoren u.a. malignen Neoplasien nachgewiesen werden können, wichtig, um die Bedeutung des rec/cORF für die Entstehung von Neoplasien bewerten zu können.

Es wurde die Expression des rec/cORF in 144 Gewebeproben aus sechs verschiedenen Erkrankungsgruppen (testikuläre Keimzelltumoren, lymphatische Läsionen, Mammatumoren, Hirntumoren, Nierenzelltumoren und maligne Melanome) untersucht. Es handelte sich dabei mehrheitlich um maligne Neoplasien, daneben benigne neoplastische und nicht-neoplastische Läsionen. Die Expression wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR) nachgewiesen, außerdem wurden die Nukleotidsequenzen der Amplifikate repräsentativer Fälle bestimmt. Tatsächlich konnten in testikulären Keimzelltumoren regelmäßig sowie bei Nierenzellkarzinomen und malignen Melanomen in Einzelfällen gespleißte rec/cORF Transkripte nachgewiesen werden. So konnte bei 24 von 31 untersuchten Keimzelltumoren die rec/cORF-Bande nachgewiesen werden (77%), bei 3 der 31 Fälle war die PCR zum Nachweis von rec/cORF-Sequenzen gänzlich negativ. Bei den Nierengeweben waren 7 von 14 untersuchten Proben rec/cORF-positiv (50%), in der Gruppe der Melanome ließ sich dagegen nur in 2 von 13 Fällen rec/cORF nachweisen (15%), wobei auch in dieser Entitätengruppe 2 der 13 Fälle bei der PCR für rec/cORF-Sequenzen ein negatives Ergebnis zeigten. Zusätzlich wurden in allen Entitäten Spleißvarianten der rec/cORF-Sequenz gefunden. Dabei ist die 250bp lange np9-Bande von zentraler Bedeutung. Sie wurde bei 28 von 31 untersuchten Keimzelltumoren (90%), bei 24 von 27 untersuchten lymphatischen Läsionen (88%), bei 12 von 13 Mammageweben (92%), bei 15 von 16 untersuchten Hirntumoren (93%), bei 14 von 14 untersuchten Nierengeweben (100%) und bei 9 von 13 Melanomen gefunden (69%). Zusätzliche Banden, so eine 300bp und eine 400 bp lange Sequenz, fanden sich nur bei testikulären Keimzelltumoren (in 18 Fällen, 58%), bei Nierengeweben (5 Fälle, 35%) und bei Melanomen (2 Fälle, 15%), nicht aber bei den übrigen untersuchten Entitäten. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Assoziation zwischen der transkriptionellen Aktivierung von HERV-K-Providern und der Expression seiner Genprodukte mit der Entstehung bestimmter maligner Neoplasien.

**Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2006**

# 1 Inhaltsverzeichnis:

1	Inhaltsverzeichnis:	5
2	Einleitung:	7
2.1	Molekularpathologische Grundlagen der Karzinogenese	7
2.2	Virale Karzinogenese durch exogene Viren	8
2.2.1	Humane Papillomviren	9
2.2.2	Epstein-Barr-Virus	10
2.2.3	Hepatitis B-Virus	12
2.2.4	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus	12
2.3	Endogene Retroviren	13
2.4	HERV-K	16
2.5	Fragestellung	20
3	Materialien und Methoden	22
3.1	Materialien	22
3.1.1	Gewebe	22
3.1.2	Zelllinien	22
3.1.3	Oligonukleotide (Primer)	22
3.1.4	Reaktionskits	23
3.1.5	Enzyme	23
3.1.6	Nucleotidtriphosphate	23
3.1.7	Antibiotikum	23
3.1.8	Chemikalien	23
3.1.9	Fertig-Lösungen	24
3.1.10	TAE-Puffer	24
3.1.11	Glycerin-Bromphenolblau-Puffer (GBX)	25
3.1.12	Tris-Sulfat	25
3.1.13	Entwickler	25
3.1.14	Tris-Borat	25
3.1.15	Filterpapier	25
3.1.16	Gelfolie	25
3.1.17	Parafilm	25
3.1.18	Pipetten	25
3.1.19	Gefäße	26
3.1.20	Portionierhilfen	26
3.1.21	UV-Schutzbrille	26
3.1.22	Geräte	26
3.2	Methoden	28
3.2.1	Überprüfung der Histologie	28
3.2.2	Kryostatschnitte	28
3.2.3	RNA-Extraktion	29
3.2.4	Synthese der Erststrang-DNA	30
3.2.5	$\beta$ -Actin-spezifische PCR	31
3.2.6	PCR zum Nachweis von HERV-K rec/cORF-Sequenzen	31
3.2.7	Nachweis im Agarosegel	32
3.2.8	Polyacrylamidgele	33
3.2.9	Silberfärbung des Polyacrylamidgels	33
3.2.10	„Platinum Pfx“-PCR zur Sequenzierung	34

3.2.11	Nachweis der DNA-Banden .....	34
3.2.12	Aufreinigung der DNA-Banden aus dem Gel.....	34
3.2.13	Nährmedium .....	35
3.2.14	Klonierung .....	35
3.2.15	Bebrütung der Klone .....	36
3.2.16	Extraktion des Plasmids.....	36
3.2.17	Nachweis des Vektors .....	37
3.2.18	PCR zur Sequenzierung.....	37
3.2.19	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	37
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Histologie.....	38
4.2	$\beta$ -Actin-PCR.....	38
4.3	PCR zum Nachweis von HERV-K rec/cORF-Sequenzen.....	38
4.3.1	Zelllinien .....	38
4.3.2	Testikuläre Keimzelltumoren .....	38
4.3.3	Lymphatische Läsionen.....	41
4.3.4	Mammagewebe.....	41
4.3.5	Hirntumoren.....	45
4.3.6	Nierengewebe .....	47
4.3.7	Melanome .....	49
4.4	Sequenzen .....	51
5	Diskussion.....	73
5.1	Endogene Retroviren als Karzinogene .....	73
5.2	HERV-K-Genprodukte und ihre Interaktionspartner .....	75
5.2.1	Promyelozyten-Leukämie-Zinkfinger-(PLZF)-Protein.....	75
5.2.2	Testes-Zinkfinger-Protein (TZFP).....	77
5.3	Gewebespezifische Expression .....	79
5.4	Modulation der Immunantwort durch HERV-K-Genprodukte? .....	80
6	Anhang .....	82
7	Literaturverzeichnis.....	91

## 2 Einleitung

### 2.1 Molekularpathologische Grundlagen der Karzinogenese

Nach den Kreislauferkrankungen stellen die Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Dabei handelt es sich um gutartige oder bösartige Neoplasien, deren Charakteristikum zunächst das autonome Wachstum ist (Huvos et al., 1998; Bland et al., 1999). Wenn das Wachstum der Neoplasie zu einer Destruktion des umgebenden Gewebes und zum Auftreten von Metastasen führt, liegt ein maligner Tumor vor.

Das autonome Wachstum wird durch allmähliche Akkumulation genetischer Aberrationen in der Ursprungszelle der Neoplasie begründet (Brinkley et al., 1998; McKusick et al., 1985). Diese Aberrationen betreffen sowohl Proto-Onkogene als auch Tumorsuppressorgene, deren Genprodukte Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, Hormonrezeptoren, signaltransduzierende Proteine des Cytosols oder DNA-bindende Proteine darstellen. Auf Grund von Punktmutationen, Deletionen, Amplifikationen, Translokationen, u.a. kommt es zu einer Aktivierung von Proto-Onkogenen oder zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Hanahan et al., 2000). Den Prozess der Akkumulation dieser Aberrationen innerhalb einer Zelle bezeichnet man als Karzinogenese. Dabei kann sich eine sequentielle Entwicklung mit besonderen Erscheinungsformen der Tumoren oder sogenannten Präneoplasien zeigen, wobei in diesem Zusammenhang die Adenom-Karzinom-Sequenz im Rahmen der Entstehung des Colonkarzinoms als gut untersuchtes Beispiel zu nennen ist (Kinzler et al., 1996).

Bei den Aberrationen der Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene handelt es sich überwiegend um erworbene Aberrationen. Sie treten erst im höheren Lebensalter auf, da die Mutationswahrscheinlichkeit innerhalb einer Zelle normalerweise gering ist. Dementsprechend tritt auch die daraus resultierende Neoplasie erst im höheren Lebensalter auf (Renan et al., 1993), wobei dieser Prozess durch Umweltfaktoren oder bestimmte Verhaltensweisen, wie zum Beispiel Zigarettenrauchen, nachteilig beeinflusst werden kann.

Für die Krebsentstehung bedeutsame Mutationen können jedoch nicht nur erworben, sondern auch geerbt werden. Derartige Mutationen, die dann in der Keimbahn angesiedelt sind und damit in allen Zellen vorliegen, betreffen bevorzugt Tumorsuppressorgene. In diesem Fall sind weniger neu erworbene Mutationen

notwendig, um zu einer genetischen Konstellation, die autonomes Wachstum ermöglicht, zu gelangen. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens assoziierter Neoplasien bereits in einem früheren Lebensalter erhöht.

## 2.2 Virale Karzinogenese durch exogene Viren

Für die Tumoren von Adoleszenten und jungen Erwachsenen sind jedoch nicht nur vererbte genetische Aberrationen von Bedeutung. Einen wesentlichen Einfluss besitzen auch Infektionen mit potentiell onkogenen Viren. Einige ihrer Proteine können die Regulation der Proliferation und Differenzierung der Wirtszelle beeinflussen oder die Immunabwehr hinsichtlich der Virus-infizierten Zellen insuffizient werden lassen. Dies wird bei immundefizienten Patienten besonders deutlich (Tabelle 1).

**Tabelle 1** Virus-assoziierte Neoplasien

<b>Neoplasie</b>	<b>Virus</b>
Burkitt-Lymphom	Epstein-Barr-Virus (Zimber-Strobl et al., 1999; Carbone et al., 1996)
Hepatozelluläres Karzinom	Hepatitis B- und C-Virus (Arbothnut et al., 2001; Feitelson et al., 1999; Reid et al., 1999)
Kaposi-Sarkom	Humanes Herpes-Virus Typ 8 (HHV 8) (Cannon et al., 2001; Boshoff et al., 1995)
Anogenitales Karzinom	Humanes Papillom-Virus (Sotlar et al., 2001; Melbye et al., 1998)
Hodgkin-Lymphome	Epstein-Barr-Virus (Weiss et al., 2000; Tao et al., 2001)
Undifferenziertes Nasopharynxkarzinom	Epstein-Barr-Virus (Hamadi et al., 2000; Sasco et al., 1996)
Adult T-cell Leukemia/Lymphoma	Human T-cell Leukemia/Lymphoma Virus-1 (HTLV-1) (Plumelle et al., 2000)
PTLD, AIDS assoziierte Non-Hodgkin-Lymphome	Epstein-Barr-Virus (Littel et al., 2001; Randhawa et al., 1995)



Es handelt sich bei den potentiell onkogenen Viren hauptsächlich um exogene, das heißt infektiöse DNA- und RNA-Viren, die über verschiedene Mechanismen in die Signalwege der Zelle eingreifen. Diese Interferenz soll an einigen Beispielen verdeutlicht werden.

### 2.2.1 Humane Papillomviren

Die Gruppe der Humanen Papillom-Viren (HPV) ist mit der Entstehung anogenitaler Karzinome sowie des oralen und laryngealen Plattenepithelkarzinoms assoziiert. Unter den 70 bisher bekannten Typen der Papillom-Viren sind die Typen 16, 18, 31, 33, 35 und 51 häufig in malignen Neoplasien nachweisbar. Sie sind daher als Hochrisiko-Typen eingestuft. Die in genitalen Warzen nachweisbaren Typen 6 und 11 gelten dagegen als Typen mit niedrigem Risiko. Während bei Befall einer Wirtszelle durch ein „low-risk“ Virus die HPV-DNA gewöhnlich in episomaler, nicht integrierter Form vorliegt, kommt es bei einer Infektion der Wirtszelle mit einem „high-risk“ Virus häufiger zu einer Integration der HPV-DNA in das Genom der Wirtszelle. Die Lokalisation der Virus-DNA innerhalb des Genoms der Wirtszelle ist dabei zufällig, innerhalb eines Malignoms ist sie aber in allen Zellen identisch und stellt damit einen klonalen Marker dar.

Die Genprodukte der HPV können in zwei Klassen unterteilt werden, in frühe und späte Genprodukte. Während die sogenannten „early“-Proteine (E-Proteine) vor einer produktiven Replikation der Viren exprimiert werden, werden die „late“-Proteine (L-Proteine) erst während der Synthese neuer Viren exprimiert. Die „early“-Proteine 1 und 2 sind für die virale DNA-Replikation notwendig (Mohr et al., 1990; Ustav und Stenlund, 1991; Chiang et al., 1992; Frattini und Laimins, 1994). E2 wirkt außerdem als Repressor des Promotors der E-Proteine (Thierry und Yaniv, 1987; Stubenrauch et al., 1998; Howly und Lowy, 2002).

Die frühen Produkte E6 und E7 interagieren mit Proteinen, die den Zellzyklus und die Proliferation kontrollieren. Sie werden in Wirtszellen, die mit Hochrisiko-HPV infiziert sind, vermehrt exprimiert, weil bei der Integration des viralen Genoms der offene Leserahmen des E2 unterbrochen wird (Baker et al., 1987; Schwarz et al., 1985; Stoler et al., 1992) und so die Inhibition des „early“-Promotors vermindert wird.

E6 ist in einem Komplex mit einer Ubiquitin-Ligase in der Lage, das Tumorsuppressor-Protein p53 zu binden und der Proteolyse in einem Proteasom zuzuführen. Dadurch entfällt der Wachstumsarrest der Wirtszelle an den Übergängen G1/S und G2/M (Huibregste et al., 1993; Scheffner et al., 1993), so dass es zur Ansammlung genetischer Aberrationen kommen kann. Das Genprodukt E6 kann außerdem die Aktivierung der humanen Telomerase/reverse Transkriptase (hTERT) bedingen (Klingelhutz et al., 1996). Die normalerweise abnehmende Länge der Telomere der Chromosomen führt ab einem kritischen Punkt zum Zelltod (Harley, 1991; Allsopp und Harley, 1995; Reddel, 1998; Liu, 1999). Dieser Mechanismus wird durch eine abnorme Telomeraseaktivität unterbunden.

E7 interagiert mit Mitgliedern der Retinoblastom-Protein-Familie (Rb). Rb ist normalerweise in der frühen G1-Phase hypophosphoryliert und bindet in dieser Form den Transkriptionsfaktor E2F, so dass die Transkription der entsprechenden Genabschnitte reprimiert wird (Übersicht: Weinberg, 1995). Dies betrifft vor allem Genprodukte, die für die DNA-Synthese nötig sind, wie die DNA-Polymerase-alpha. Indem E7 die hypophosphorylierte Form des Rb bindet, macht es eine Bindung zwischen Rb und E2F unmöglich und fördert das Fortschreiten des Zellzyklus (Chellappan et al., 1991), wodurch wiederum die Replikation viraler Genprodukte ermöglicht wird. Zur effizienten Überwindung des Zellzyklusarrests durch E7 ist außerdem die Ubiquitin-vermittelte Inaktivierung des Rb selbst und des Inhibitors der Zyklin-abhängigen Kinase wie p21 nötig (Helt et al., 2002).

Diese Eingriffe der HPV in die Regulation des Zellzyklus und der Proliferation sind als initiierende Ereignisse zu sehen und fördern die Akkumulation von Mutationen aufgrund exogener Noxen, denn auch Zigarettenrauchen, mikrobielle Infektionen, hormonelle Umstellungen u.ä. sind in der Karzinogenese der mit den HPV assoziierten Tumoren von Bedeutung.

### 2.2.2 Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist u.a. mit dem endemischen Burkitt-Lymphom, B-Zell-Lymphomen immunsupprimierter Patienten (auf dem Boden einer HIV-Infektion oder einer immunsupprimierenden Therapie), dem Hodgkin-Lymphom und dem undifferenzierten Nasopharynx-Karzinom assoziiert. Das Virus befällt Epithelzellen des

Oropharynx sowie B-Lymphozyten, wobei es über eine Bindung an das Oberflächenprotein CD21 in die B-Lymphozyten gelangt. In der Wirtszelle liegt das EBV-Genom als episomales Ringmolekül vor. Da es sich um eine latente Infektion handelt, findet zunächst keine Replikation des Virus mit Lyse der Wirtszelle statt. Stattdessen kommt es zu einer Immortalisierung der Wirtszelle durch spezielle virale Genprodukte.

EBV exprimiert das „latente“ (Latenzphasen-)Membranprotein-1 (LMP1). LMP1 imitiert an der Zytoplasmamembran das CD40-Molekül, das zur Familie der TNF-Rezeptoren gehört („molekulares Mimikry“). LMP1 aktiviert dadurch Signalwege, die durch die Transkriptionsfaktoren NF-kappa-B und AP-1, sowie die sogenannten „Signaltransduktoren und -aktivatoren der Transkription“ (STATs) vermittelt werden (Berberich et al., 1994; Mitchell und Sugden, 1995; Sakata et al., 1995; Hanissian und Geha, 1997; Eliopoulos und Young, 1998; Gires et al., 1999). Es ist außerdem in der Lage, sowohl TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAFs) (Sandberg et al., 1997; Pullen et al., 1998, 1999) als auch TNF-R1-assoziierte „death domain“ Proteine (TRADD) (Izumi und Kieff, 1997) zu binden (Lam und Sugden, 2003). LMP1 nimmt damit Einfluss sowohl auf die Regulation der Proliferation und Differenzierung, als auch auf die Mechanismen der Tumorabwehr.

Eine weitere wichtige Eigenschaft des LMP1 ist seine direkte immunsuppressive Wirkung. Bestimmte Epitope des LMP1 führen zu einer Inhibition der T-Zell-Proliferation, indem sie in den Zell-Zell-Kontakt proliferierender T-Zellen eingreifen. Zusätzlich vermindern LMP1-Epitope die Produktion von Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und senken die Toxizität der Natural-Killer-Zellen (NKZ). Auf diese Weise entgehen die Antigen-präsentierenden Zellen der Elimination. Trotz hoher Expression des neo-Antigens LMP1 in einem Organismus ist die Antikörperbildung nur gering ausgeprägt. 33% der Hodgkin-Lymphom-Patienten und 8% der Patienten mit einem Nasopharynx-Karzinom besitzen Antikörper gegen LMP1 (nach Dukers et al., 2000). Die mit EBV infizierten Zellen entkommen bei einer globalen oder selektiven Immunschwäche der Immunantwort des Organismus und können vermehrt proliferieren.

### 2.2.3 Hepatitis B-Virus

Das Hepatitis B-Virus (HBV), das im fernen Osten und in Afrika endemisch ist, ist eng mit der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) assoziiert. Bei Infektion einer Wirtszelle wird in einigen Zellen das Genom des HBV in dasjenige der Wirtszelle integriert. Das Genom des HBV kodiert ein kleines Protein, das HBx, das in die Regulationsmechanismen der Zelle eingreift. Es reguliert sowohl zelluläre, als auch virale Gene, die durch die Polymerasen II (Avantaggiati et al., 1993; Lucito et al., 1992; Lubber et al., 1991; Seto et al. 1988 und 1989; Twu et al., 1989) und III (Aufiero et al., 1990; Wang et al., 1997) transkribiert werden. Unter diesen sogenannten X-responsive elements (XRE) befinden sich Gene, die im Zusammenhang mit der Proliferation der Wirtszelle und der akuten Entzündungsreaktion stehen, u.a. c-fos, c-jun, TNF-alpha, Interleukin-8 (IL-8) und HLA-DR (Gonzalez-Amaro et al., 1997; Hu et al., 1990; Mahe et al., 1991). Auf diese Weise kommt es in der Wirtszelle zu vermehrter Wachstums- und Proliferationsaktivität, die die Replikation der Viren unterstützt.

Während des verstärkten und unzureichend kontrollierten Wachstums wird eine Ansammlung genetischer Aberrationen in den Wirtszellen wahrscheinlicher. Diese genetischen Aberrationen können spontan auftreten, sie werden aber durch exogene Faktoren wie die Aufnahme von Aflatoxinen zusätzlich begünstigt.

### 2.2.4 Humanes T-Zell-Leukämie-Virus

Das Humane T-Zell-LeukämieVirus Typ I (HTLV-I) ist das erste Retrovirus, für das eine Assoziation mit einer menschlichen Krankheit belegt werden konnte. Das HTLV-1 ist in Japan, der Karibik und einigen Teilen Zentralafrikas endemisch verbreitet (Matsuoka, 2003) und ist mit der/dem Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATL) eng assoziiert. Bei einem Retrovirus handelt es sich um ein Virus, das ein Genom aus RNA enthält und nach Internalisierung in die Wirtszelle durch eine eigene Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben wird, die sich dann in das Wirtsgenom integriert. Dieses integrierte Virusgenom wird als Provirus bezeichnet und verhält sich wie ein Gen der Wirtszelle.

In seinem Genom enthält HTLV-I die sog. pX-Region, die verschiedene regulatorische Proteine kodiert. Die größte Bedeutung unter ihnen besitzt das Protein Tax (Franchini,

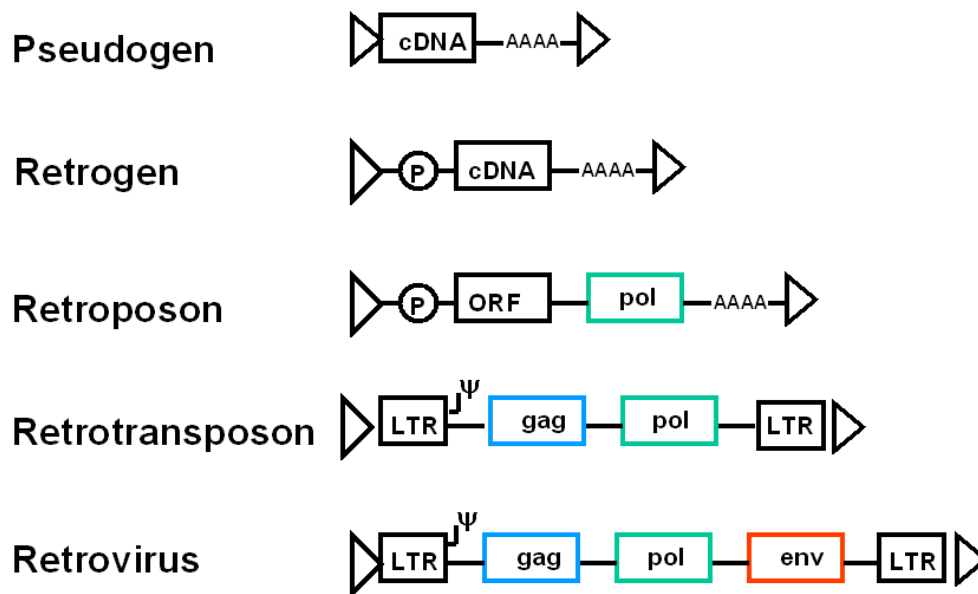
1995; Yoshida, 2001). Tax stimuliert die Expression verschiedener Zytokine, darunter Interleukin-2 (IL-2). Dabei fördert es sowohl die Expression des IL-2 selbst, als auch die Expression des IL-2R-alpha-Rezeptors, der eine besonders hohe Affinität zu IL-2 zeigt (Ballard et al., 1988; Wano et al., 1988). Da IL-2 das Fortschreiten ruhender T-Zellen im Zellzyklus anregt, induziert HTLV-I über diesen Mechanismus Wachstum und Proliferation der infizierten T-Zellen (Gatza et al., 2003). Gleichzeitig inhibiert Tax die Aktivität von Wachstumsrepressoren wie „transforming growth factor  $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ). Sowohl durch die Bindung des Transkriptionsfaktors CBP/p300 und der daraus resultierenden Unterbrechung seiner Interaktion mit den Smad-Proteinen, als auch durch direkte Interaktion mit einigen Smad-Proteinen vermindert Tax die Transkription der TGF- $\beta$ -responsiven Gene (Mori et al., 2001; Lee et al., 2002). Auf diese Weise werden die Zellen gegen die Wirkung des TGF- $\beta$  resistent, so dass eine Repression des Zellwachstums entfällt. Neben dem Wachstumsrepressor TGF- $\beta$  beeinträchtigt Tax auch die Wirkung des Tumorsuppressorproteins P53. Dabei wird die inhibitorische Wirkung über zwei Mechanismen vermittelt. Durch die kompetitive Bindung des CBP/p300 durch Tax wird zunächst die Transkription der durch p53 regulierten Kontrollgene des Zellzyklus vermindert. Daneben führt Tax zu einer abnormen Phosphorylierung des p53, so dass dessen Bindungseigenschaften verändert werden (Van Orden et al., 1999; Suzuki et al., 1999; Ariumi et al., 2000). Dadurch vermindert Tax die Fähigkeit der Zelle, DNA-Schäden zu reparieren, so dass es innerhalb der Zellen zu einer erhöhten Mutationsfrequenz kommt (Miyake et al., 1999).

Wie die zuvor aufgeführten Viren, führt auch eine Infektion mit HTLV-I zu einer erhöhten Wachstums- und Proliferationsaktivität der Zellen, die nachfolgend die Ansammlung genetischer Aberrationen erleichtert.

### **2.3 Endogene Retroviren**

Bei den bisher betrachteten Viren handelt es sich um exogene Viren, die zu einem beliebigen Zeitpunkt mehr oder weniger einzelne, jedoch niemals alle Zellen eines Wirtes befallen. Endogene Retroviren sind solche Retroviren, die ehemals exogen waren, jedoch im Laufe der Phylogenese auch Keimzellen befallen hatten und seither im Genom aller Zellen eines Individuums auftreten. Diese Proviren werden wie ein gewöhnliches Gen an die nachfolgenden Generationen vererbt.

Proviren endogener Retroviren sind somit als Relikte vergangener Keimzellinfektionen vor Hunderttausenden bis zu Millionen von Jahren in das menschliche Genom integriert und gehören damit zur Gruppe der Retroelemente (Löwer et al., 1996, 1993). Das einfachste Retroelement ist das Pseudogen. Dabei handelt es sich um eine Transkription zellulärer RNA zurück in DNA durch eine Reverse Transkriptase, die retroviralen Ursprungs ist. Die DNA wird in das Genom der Zelle integriert. Wenn dieses Pseudogen mit einer Promotor-Sequenz verknüpft ist und somit zur Expression kommen kann, spricht man von einem Retrogen. Ein Retroposon beinhaltet neben dem Promotor und einem reverse Transkriptase-Homologon (Polymerase-Gen pol) zusätzlich ein Gen, das partielle Informationen für ein Protein besitzt (sogenannter offener Leserahmen ORF). Zu den Retroposons gehören auch die „long interspersed repeat elements“ (LINE). Die nächst höher entwickelte Stufe stellen die Retrotransposons dar. Sie besitzen sowohl die reverse Transkriptase, als auch Gene für Polyproteine, die Äquivalente der Capsidproteine sind und üblicherweise als gruppenspezifische Antigene (gag) bezeichnet werden. Sie werden außerdem von „long terminal repeats“ (LTRs) eingeschlossen, die Promotorsequenzen beinhalten. Retrotransposons sind also unvollständige Proviren, die zu einer Bildung unvollständiger, nicht-infektiöser retroviraler Partikel führen können (Löwer et al., 1996; Krieg et al., 1997). Schließlich existieren als vollständigste Variante der Retroelemente die endogenen Retroviren. Sie bestehen aus zwei Steuerelementen (long terminal repeats = LTR), die offene Leseraster für gruppenspezifisches Antigen (gag), Protease (prt), Polymerase (pol) und Hüllprotein (env) zwischen sich einschließen (Löwer et al., 1996). Die Protease kann bei einigen Retroviren Bestandteil des gag-Gens sein (Abbildung 1).



**Abbildung 1** Genomische Retroelemente (nach Löwer und Löwer, 1996)

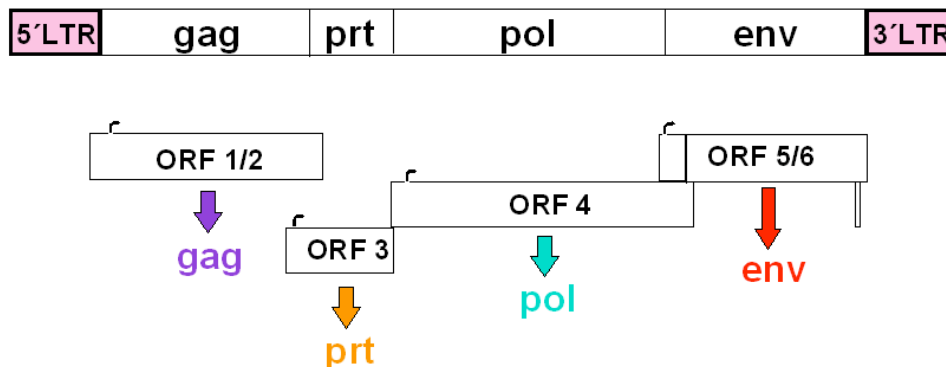
Erste Nachweise endogener Retroviren beim Menschen liegen schon einige Zeit zurück. Während der Arbeit mit Teratokarzinom-Zelllinien gegen Ende der 70er Jahre stieß man bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen auf Viruspartikel innerhalb einzelner Zellen. Da diese Partikel nur in diesen von Teratokarzinomen abgeleiteten Linien zu finden waren, nannte man sie „human teratocarcinoma-derived virus“ (HTDV) (Bronson et al., 1979). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Partikel und der Entstehung eines Teratokarzinoms in den entsprechenden Zellen wurde vermutet. Der Nachweis der viralen Partikel an nativem testikulärem Tumorgewebe gelang jedoch nicht überzeugend, so dass HTDV zunächst einige Jahre unbeachtet blieb. Mitte der 80er Jahre gelang dann mit Hilfe der Klonierung der Nachweis eines endogenen Retrovirus im menschlichen Genom, das als „humanes endogenes Retrovirus“ (HERV) der Gruppe K bezeichnet wurde (Ono et al., 1986). Weitergehende Untersuchungen bewiesen, dass es sich dabei um das früher als HTDV bezeichnete Virus handelte.

## 2.4 HERV-K

Das menschliche Genom wird zu etwa 1% von HERV eingenommen (Wilkinson et al., 1994), die in verschiedene Gruppen unterteilt werden können. Dem liegt zu Grunde, dass die virale reverse Transkriptase für die Transkription der viralen RNA in DNA einen doppelsträngigen Angriffspunkt benötigt, an dem eine RNA spezifisch binden und den Transkriptionsprozess initiieren kann. Da im Gegensatz zu exogenen Retroviren keine Infektion mit Viruspartikeln vorhergegangen sein kann, verwenden endogene Retroviren eine zelleigene tRNA als Primer. Die einzelnen HERV-Gruppen unterscheiden sich nun durch die in der tRNA jeweils kodierte Aminosäure. So werden HERV, deren tRNA Lysin kodiert, gemäß dem Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren als HERV-K bezeichnet (Larsson et al., 1989; Leib-Mösch et al., 1990).

Die im menschlichen Genom bisher entdeckten HERV sind durch Mutationsereignisse im Laufe der Evolution inaktiviert worden. Dabei sind vor allem multiple Terminationscodons, Deletionen und Mangel an 5'-long terminal repeats (LTRs) von Bedeutung (Larsson et al., 1989; Leib-Mösch et al., 1990). In einigen sehr seltenen Fällen werden HERV transkribiert, diese Transkripte werden jedoch wiederum nur in sehr seltenen Fällen in ein Protein übersetzt (Wilkinson et al., 1994). Bisher bildet HERV-K in diesem Punkt eine der wenigen Ausnahmen. Es besitzt offene Leserahmen für die Genprodukte pol, gag und env (Ono et al., 1986; Löwer et al., 1993; Müller-Lantzsch et al., 1993; Abbildung 2), deren Expression in plazentarem Gewebe, in Teratokarzinom-Zelllinien und in Brustkrebs-Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Schließlich konnte auch die Expression des HERV-K10 gag-Polypeptides und eines prozessierten Proteins in einer von der Teratokarzinom-Zelllinie abgeleiteten Zelllinie (GH) dargestellt werden (Löwer et al., 1993). Die Bedeutung dieser retroviralen Expression war unklar, und über eine Assoziation mit menschlichen Krankheiten wurde spekuliert.

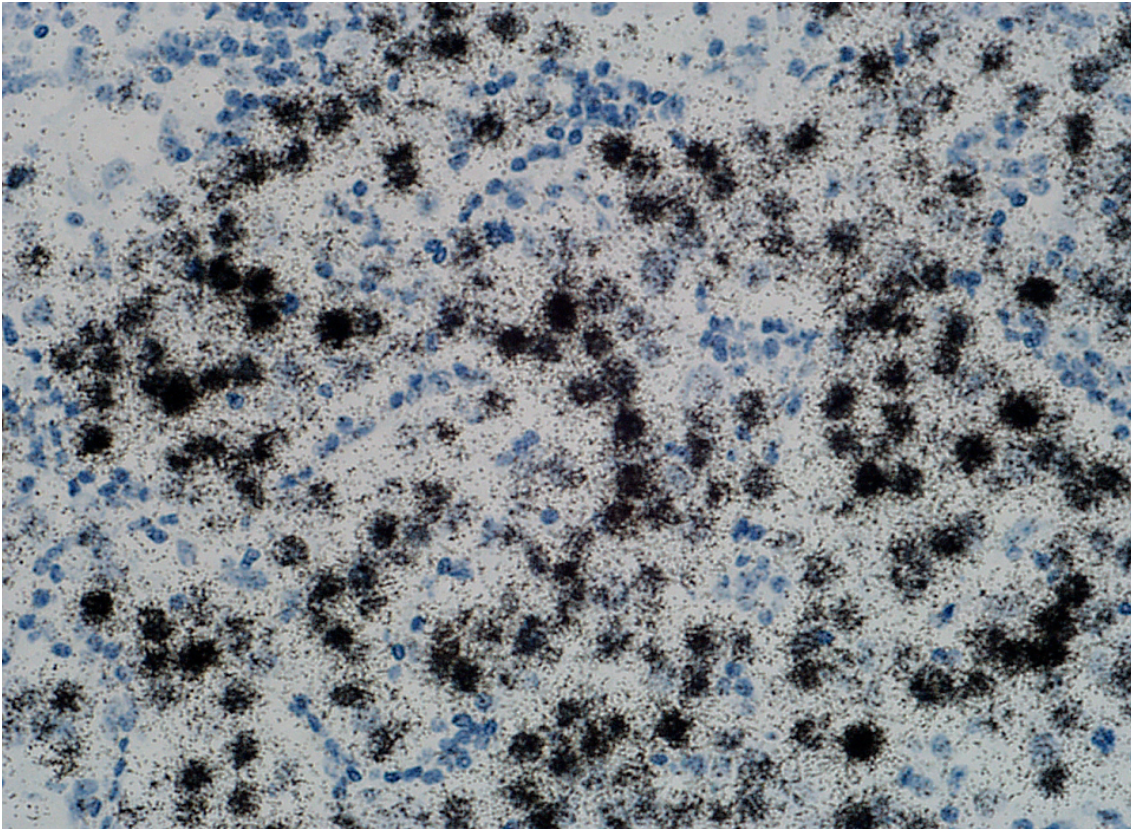




**Abbildung 2** Offene Leserahmen des HERV-K (HML-2.HOM) (nach Sauter et al., 1995).

Erste Ergebnisse im Hinblick auf diese Fragestellung lieferte eine Studie von Sauter et al., 1995, die mit Antikörpern gegen HERV-K-kodierte Proteine arbeitete. Mit Hilfe eines Insekten-Zell-Expressionssystems gelang zunächst die Expression von Abschnitten der HERV-K-spezifischen Proteine gag und env, um damit Kaninchen-Antisera und monoklonale Antikörper gegen diese Proteine zu entwickeln. Auf diese Weise wurden sowohl eine Bestimmung des Antikörpertiters in menschlichem Serum, als auch eine immunhistochemische Darstellung der Proteine in menschlichem Gewebe möglich. Die Untersuchung der Antikörpertiter gegen HERV-K gag im menschlichen Serum zeigte, dass in der Gruppe gesunder Patienten nur bei 0,4% der Individuen niedrige Antikörpertiter (1:40) auftraten.

Auch in der Gruppe der Patienten mit Autoimmunerkrankungen, einer Infektion mit dem Human Immunodeficiency Virus (HIV) oder mit verschiedenen Neoplasien außer Keimzelltumoren war nur in 2 bis 4% der Fälle ein niedriger Titer (1:40 bis 1:320) nachweisbar. Dagegen besaßen Patienten mit Seminomen hohe Antikörpertiter (bis zu 1:2560, in einem Fall sogar 1:20480) gegen HERV-K gag. Diese Titer variierten im Verlauf der Erkrankung. So kam es nach Therapie zu einem Titerabfall, während Patienten, bei denen zunächst keine Antikörper nachzuweisen waren, zu einem späteren Zeitpunkt bei der Entdeckung eines Seminoms positive Antikörpertiter aufwiesen.



**Abbildung 3** Nachweis von HERV-K RNA-Transkripten in einem Seminom mittels *in situ* Hybridisierung (Herbst et al., 1996)

Schließlich wurden Tumorbiopsien der Patienten mit nachweisbaren Antikörpertitern in einem Immunoblotting hinsichtlich der Expression des HERV-K gag untersucht. Dabei ließen sich gag-verwandte Proteine im Zytoplasma der Tumorzellen darstellen, während das umliegende Gewebe sowie das Gewebe gesunder Testes in dieser Reaktion negativ blieb (Sauter et al., 1995; Herbst et al., 1996). Mit HERV-K env verhielt es sich sehr ähnlich (Titer zwischen 1:640 und 1:10240), allerdings waren Antikörper gegen env bei Patienten mit Seminomen und gemischten Keimzelltumoren noch häufiger nachweisbar als Antikörper gegen gag (85% der untersuchten Fälle versus 53% der untersuchten Fälle) (Sauter et al., 1996).

Eine weitere Untersuchung beschäftigte sich mit dem Nachweis HERV-K-spezifischer RNA mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung (Abbildung 3). Die eingesetzten Sonden waren dabei spezifisch für HERV-K gag, pol und env. Mit ihrer Hilfe gelang der Nachweis HERV-K-spezifischer Expression in gonadalen Keimzelltumoren (mit

Ausnahme der Teratome), in uterinen Choriokarzinomen, in testikulären CIS/TIN sowie in atypischen Gonozyten in Gonadoblastomen. Dagegen fehlten durch diese Technik nachweisbare HERV-K-spezifische Signale in gesunden plazentaren und embryonalen Geweben, in Brust- und Prostatakarzinomen, sowie in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen. Lymphozyten und Plasmazellen des spärlichen entzündlichen Infiltrats, die ein positives Signal zeigten, deuteten jedoch darauf hin, dass der Mangel an HERV-K-spezifischen Signalen nicht auf fehlende RNA im Schnitt zurückging (Herbst et al., 1996).

Schließlich wurde für gag und rec/cORF jeweils das transformierende Potential untersucht (Boese et al., 2000), bei dem das Protein jeweils über einen Vektor in immortale, jedoch nicht transformierte Rattenfibroblastenzellen gebracht und unter kontrollierten Bedingungen in Mäusen exprimiert wurde. Dabei hatte die Expression von gag keine Auswirkung, während die Expression von rec/cORF zur Entwicklung eines Tumors innerhalb von 53 Tagen führte. Rec/cORF wurde daher onkogenes Potential zugesprochen.

Sequenzanalysen konnten zudem zeigen, dass HERV-K Proviren neben den Transkripten gag, prt, pol und env weitere Transkripte kodieren, die durch alternatives Spleißen entstehen. Dadurch lassen sich die HERV-K-Typen I und II unterscheiden.

HERV-K Typ II besitzt innerhalb der env-Gensequenz einen zentralen offenen Leserahmen (rec/cORF). Durch den Mechanismus des alternativen Spleißens ist HERV-K Typ II daher in der Lage das Protein p15<sup>rec/cORF</sup> zu transkribieren. P15<sup>rec/cORF</sup> bindet an das Promyelozyten-Leukämie-Zinkfinger (PLZF)-Protein (Boese et al., 2000), das in verschiedenen menschlichen Geweben, darunter auch Hodengewebe, exprimiert wird (Zhang et al., 1999) und mit der Leukämogenese assoziiert ist. Er wirkt als negativer Regulator des Zellzyklus, indem es an die DNA bindet und die Transkription der Zielgene inhibiert. Zu seinen Zielgenen gehört unter anderem Zyklin A2 (Yeyati et al., 1999). Im Falle einer Interaktion des p15<sup>rec/cORF</sup> mit dem PLZF wird demnach eine Überwindung des Zellzyklusarrests möglich, wie sie weiter oben im Zusammenhang mit den Genprodukten exogener Viren und den entsprechend assoziierten Krankheiten beschrieben wurde.

HERV-K Typ I weist dagegen eine Deletion von 292 bp im Bereich des env-Genabschnitts auf und kann daher kein p15<sup>rec/cORF</sup> exprimieren. Stattdessen kommt es zur Expression lediglich des Proteins np9. Dabei handelt es sich ebenfalls um ein Spleißprodukt der env-Gensequenz. Eine Expression des np9 konnte in 90% untersuchter transformierter Keimzelllinien nachgewiesen werden, außerdem bei 52% untersuchter Mammakarzinome, 37% untersuchter Keimzelltumoren und in 33% untersuchter Lymphozyten aus leukämischem Blut (Armbruster et al., 2002). Im Gegensatz zu rec/cORF fehlt np9 die PLZF-bindende Domäne. In Proben gesunder Gewebe, die Lymphozyten, Fibroblasten, Darm-, Plazenta- und Magenproben umfassten, wurde np9 nicht in nachweisbaren Mengen nachgewiesen (Armbruster et al., 2002), so dass eine Assoziation zwischen der Expression des np9 und dem Auftreten eines Malignoms in dem entsprechenden Gewebe vermutet wurde.

## 2.5 Fragestellung

Die bisherigen Untersuchungen der HERV-K-Expression legen eine Assoziation der transkriptionellen Aktivierung und nachfolgenden Expression des HERV-K und der Entwicklung einer malignen Neoplasie des entsprechenden Gewebes nahe. Ob die Aktivierung des HERV-K dabei ursächlich für die Entwicklung der Neoplasie ist oder ob es sich nur um das Epiphänomen einer Überexpression des HERV-K in einer bereits transformierten Zelle handelt, ist allerdings bis jetzt noch nicht geklärt. Es ist daher von besonderem Interesse, die Mechanismen der Aktivierung des HERV-K zu verstehen und darzustellen, auf welche Weise seine Transkripte Einfluss auf die Stoffwechselfvorgänge innerhalb der Zelle nehmen. Die Regulationsmechanismen des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung könnten als Angriffspunkt der retroviralen Transkripte dienen, so dass ein Zusammenspiel der Immortalisierung der Zelle und exogener Mutationsereignisse, ähnlich dem für exogene Viren beschriebenen, denkbar wäre. Um die Auswirkungen der Transkripte auf die Zelle beurteilen zu können, müssen jedoch die Transkripte selbst zunächst näher spezifiziert werden. Dabei kommt die Schlüsselrolle dem Protein p15<sup>rec/cORF</sup> zu. Es besitzt onkogenes Potential und stellt zudem eine Spleißvariante des Env-Proteins dar, das unter anderem in testikulären Keimzelltumoren nachgewiesen wurde. Daher ist die Untersuchung seiner Expression

von besonderem Interesse. Daneben ist auch der Nachweis der Expression des np9 interessant, obwohl dessen Rolle noch weitgehend ungeklärt ist.

Die bisherigen Erkenntnisse auf diesem Gebiet wurden hauptsächlich über verschiedene Blotting-Verfahren und die *in situ* Hybridisierung gewonnen. Beide Verfahren sind nicht dazu geeignet, sehr geringe Spiegel eines Genprodukts in einem Gewebe nachzuweisen. Es ist jedoch anzunehmen, dass es sich bei den Auswirkungen der HERV-K-Transkripte innerhalb der Zelle um ein stöchiometrisches Problem handelt, also bei geringen Expressionsgraden der Bindungspartner der Genprodukte des HERV-K auch nur sehr geringe Expressionsraten der HERV-K-Transkripte nötig sind, um das regulatorische Gleichgewicht in der Zelle zu stören. So könnte zum Beispiel bei einer geringgradigen PLZF-Expression ein geringes Ausmaß der p15<sup>rec/cORF</sup>-Expression ausreichen, um die Regulationsmechanismen des Zellzyklus zu beeinflussen. Es ist also zu erwarten, dass in einigen malignen Neoplasien nur extrem geringe Expressionsraten des HERV-K erreicht werden und trotzdem auf die Zelle wirksam sein könnten. Demnach ist es sinnvoll, zum Nachweis der HERV-K-Transkripte die Methode der RT-PCR zu wählen, weil sie sehr sensitiv RNA nachweisen kann und deshalb sehr geringe Transkriptspiegel erfasst werden können

Mit Hilfe der RT-PCR und Oligonukleotiden (Primern), die HERV-K rec/cORF-spezifische Sequenzen zum Nachweis bringen können, wird in dieser Arbeit folgenden Fragen nachgegangen:

- läßt sich rec/cORF regelmäßig in Keimzelltumoren nachweisen?
- läßt sich rec/cORF auch in anderen Tumorentitäten nachweisen?
- kommt es bei der Expression zu Spleißvarianten und dementsprechend zu bestimmten Entitäten-spezifischen Expressionsmustern?

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Gewebe

Nativ in flüssigem Stickstoff eingefrorene und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrte Gewebeproben von 31 Hodentumoren, 27 lymphatischen Läsionen, 13 Mammatumoren und 14 Nierenläsionen wurden aus dem Archiv des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie erhalten. 16 Aliquots von Hirntumoren aus der Tumorbank des Instituts für Neuropathologie des UKM wurden von Herrn Univ.-Prof. Dr. Paulus und Herrn Priv.-Doz. Dr. Rickert freundlicherweise zur Verfügung gestellt. 13 Gewebeproben maligner Melanome stammten aus der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Münster und sind den Herren Professoren Grabbe und Metze zu verdanken. Die klinischen Daten und histologischen Diagnosen zu den eingefrorenen Gewebeproben sind in Tabelle 8 (Anhang) zusammengestellt

#### 3.1.2 Zelllinien

Die Linien Tera 1 und Tera 2 wurden freundlicherweise von Herrn Univ.-Prof. Dr. Müller-Lantzsch, Abteilung für Virologie, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar, zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.3 Oligonukleotide (Primer)

Längenstandards für die Gelelektrophorese (Smart Ladder®, Marker 4 (phi-x)) wurden von Eurogentec, Seraing, Belgien, bezogen. Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation wurden von derselben Firma synthetisiert:

65-01 HERV: 5'-acaatgaacctcggagat-3' (6447-6466)

66-01 HERV: 3'-aacagaatctcaaggcagaagaa-5' (6327-6305)

29-95  $\beta$ -Actin: GGAGTACTTGCGCTCAGGAGG (antisense)

30-95  $\beta$ -Actin: CATGCCATCCTGCGTCTGGAC (sense)

#### 3.1.4 Reaktionskits

First-strand cDNA Synthesis Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

Platinum Pfx Polymerase draft, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Ultra Clean 15, DNA Purification Kit, Dionova, Hamburg, Deutschland

Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

QIAprep Spin Miniprep Kit, QIA-Gen GmbH, Hilden, Deutschland

BigDye Terminator 3.0, QIA-Gen GmbH, Hilden, Deutschland

#### 3.1.5 Enzyme

Taq-Polymerase, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

ECO RI Restriktionsenzym, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

#### 3.1.6 Nucleotidtriphosphate

dNTP's, 10mmol, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA

#### 3.1.7 Antibiotikum

Ampicillin, Bayer, Wuppertal, Deutschland

#### 3.1.8 Chemikalien

Die Chemikalien hatten den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad, wenn immer möglich „pro analysi“. Es stammte von

Merck Eurolab GmbH, Bochum, Deutschland:

Chloroform, Isopropanol (2-Propanol), Ethanol 96%, TRIS, Eisessig, Ethidiumbromid (einprozentige Lösung in Wasser), Bromphenol, Xylenxyanol, Glycerol, Schwefelsäure (96%), Ammoniumperoxidsulfat (APD), Borsäure, Salpetersäure, Natriumcarbonat, Formaldehydlösung (mindestens 37%)

Delta-Pharma, Boehringer Ingelheim, Deutschland:

Aqua Bidest (Aqua ad iniectabilia)

Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland:

Diethyl-Pyrocbonat (DEPC), Mineral Oil, Ethylene Glycol-bis(-Aminoethylether) (EDTA), pH 8,0

Spezialchemikalien und Reagenzien wurden wie folgt bezogen:

peqGold TriFast (TIM) (Trizol), peqLab, Erlangen, Deutschland

GSV Tissue Embedding Medium, SLEE Technik GmbH, Mainz, Deutschland

Leica Cryofect, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland

LE Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc. Rockland, ME, USA

ProtoGel Ultra Pure, 30% Acrylamid, 0,8%ige Bis-Acrylamid Stock Solution, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland

Temed plus one, Pharmacia Biotech AS, Uppsala, Schweden

Luria Broth Base, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Sephadex G-50, Fine DNA Grade, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

Multiscreen, for purification and analysis, Millipore Corporation, Bedford, USA

### 3.1.9 Fertig-Lösungen

10x PCR-Puffer, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

5x Sequencing Puffer, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.10 TAE-Puffer

Dieser Puffer wurde aus einer Stammlösung (50x = 242g TRIS, 57,1ml Eisessig und 100ml 0,5M EDTA (pH 8,0) auf 1000ml Aqua dest auffüllen) hergestellt (Gebrauchslösung 1x=0,04M Trisacetat, 0,001M EDTA, entsprechend 10ml 50xTAE und 490ml destilliertes Wasser).



### 3.1.11 Glycerin-Bromphenolblau-Puffer (GBX)

für 10ml Ansatz 25mg Bromphenolblau (0,25%), 25mg Xylencyanol (0,25%), 3,5ml Glycerol (30% in Wasser) auf 10ml mit destilliertem Wasser auffüllen

### 3.1.12 Tris-Sulfat

für pH 9,0 2,15ml Schwefelsäure 96% und 45,38ml Tris

### 3.1.13 Entwickler

200ml Natriumcarbonat (57,36g Natriumcarbonat auf 2l destilliertes Wasser) und 150µl Formalin 40%

### 3.1.14 Tris-Borat

Tris, Borsäure

### 3.1.15 Filterpapier

Filter Paper Circles, Durchmesser 10mm, S&S, Dassel, Deutschland

### 3.1.16 Gelfolie

GelBond PAG film, Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland ME, USA

### 3.1.17 Parafilm

Parafilm, American National Can, Menasha, WI, USA

### 3.1.18 Pipetten

Pipetten Eppendorf reference (0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl, 500-5000µl), Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen Safeseal Tips Premium (10µl, 100µl, 1000µl, 5000µl), Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland

### 3.1.19 Gefäße

#### Röhrchen

Microtubes 50µl und 1,5ml, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland

Tubes 200µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Von der Firma Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland wurden bezogen:

Weithals-spritz- und Weithals-standflasche, Weithals-Erlenmeyerkolben, Becherglas, Messzylinder, Reagenzglasständer, Reaktionsgefäßständer, PCR-Racks, Einmalküvetten, Kryoboxen, Multischraubgefäße, Verschlussclips, Petrischalen.

### 3.1.20 Portionierhilfen

Von der Firma Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland wurden bezogen:

Pinzette (gerade-stumpf, gebogen-spitz, Hakenpinzette), Skalpell und Skalpellklinge, Doppelspatel, Apothekerlöffel

### 3.1.21 UV-Schutzbrille

UV-Schutzbrille, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.22 Geräte

Kryotom, HM 500 OM, Deutschland

Vortexer, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Sigma Laborzentrifuge 2K15, Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland

Biofuge 13, Heraeus Sepatech GmbH, Deutschland

Thermocycler 60, biomed, Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland

Peltier Thermal Cycler, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland

Mikrowelle brother powerwave, ER 6320, Braun, Deutschland

Gelkammer GNA 100, Pharmacia Biotech AS, Uppsala, Schweden

Gelkammer 80-1316-60-02776, Pharmacia LKB, Schweden

Waage AE 240, Mettler, Deutschland

Transilluminator 2011 Macrovue, LKB Bromma, Bromma, Schweden

Gel Cam EP h-7, Electrophoresis Hood, UK

Laborschüttler, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland

Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Gradient Cycler, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Sealboy 235, Audion Electro, Weesp, Holland

Autoklav, Medizin und Labortechnik, Fritz Rösner GmbH und Co, Hamburg, Deutschland

Flow, Hera Safe, W.H. Mahl, Kaarst, Deutschland

Bunsenbrenner, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland

Eis Maschine, Ziegra EIS Maschinen, Isernhagen, Deutschland

Brutschrank, Memmert, Deutschland

Gefrierschränke, snijder scientific, Stilburg, Holland und Sanyo Electric Co., Japan

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Überprüfung der Histologie

Zur Verifizierung der Tumordiagnose wurde von den betreffenden Geweben vor der Extraktion ein Kryostatschnitt von 5µm Dicke abgenommen, gefärbt und mit den Paraffinsschnittpräparaten desselben Falls verglichen.

### 3.2.2 Kryostatschnitte

Vor Aufnahme der Arbeit wurden für jede Probe 1000µl Trizol-Reagenz in einem 1,5ml-Röhrchen vorgelegt und dieses beschriftet. Zur Extraktion des Tumorgewebes wurden von dem bei -80°C kryokonservierten, nativen Tumorgewebe von jeder Probe 20 bis 30 Schnitte von jeweils 5µm Dicke abgenommen, wobei bei Tumoren bis 5mm Durchmesser 25 bis 30 Schnitte entnommen wurden, während bei Tumoren über 5mm Durchmesser 20 bis 25 Schnitte ausreichten. Während der Arbeit wurden Handschuhe getragen, um den Abbau der RNA durch auf der Haut befindliche RNAsen zu vermeiden. In der Schneidebox des Kryotoms herrschte außerdem eine Temperatur von -25°C, um die Proben vor einer Erwärmung zu schützen, die ebenfalls eine Zerstörung der RNA verursachen könnte.

Die Probe wurde mit einer Pinzette aus ihrem Gefäß entnommen und dann mit der Rückseite auf der Haltevorrichtung des Kryotoms befestigt. Dazu wurde ein Einbettungsmedium verwendet, das bei Raumtemperatur flüssig ist, in der Kälte der Schneidebox jedoch rasch aushärtet. Nach Aushärtung des Mediums wurde die erforderliche Anzahl von Schnitten gefertigt, die sich auf der im Kryotom vorgesehenen Ablagefläche sammeln. Dort wurden sie mit Hilfe einer Pipettenspitze (100µl) vorsichtig aufgenommen und in das Trizol gegeben, ohne am Rand des Röhrchens Gewebe zu hinterlassen. Die verschlossenen Röhrchen wurden bis zur Auflösung der Schnitte in dem chaotropen Reagenz leicht geschüttelt und dann bei 4°C verwahrt. Die restliche Probe wurde wieder bei -80°C verwahrt, wobei deren Auftauen vermieden wurde.

Für die Gewinnung von RNA aus Zelllinien wurde mit Hilfe einer 1000µl-Pipette das Trizol mehrmals gründlich direkt über die Zellschicht gespült, das Gemisch

anschließend mit der Pipette aufgesaugt und in ein 1,5ml-Röhrchen gegeben. Dadurch wurden die Zellen sofort im Trizol-Reagenz gelöst, so dass sie im weiteren Verlauf wie die Gewebeproben weiter bearbeitet werden konnten.

### 3.2.3 RNA-Extraktion

Der Vorgang der eigentlichen Extraktion der RNA verlief über zwei Tage, wobei als Ausgangspunkt die in 1000µl Trizol aufgelöste Probe diente. Zunächst wurden die Proben durch vorsichtiges Aufziehen mit einer 1000µl-Pipette noch einmal gründlich durchmischt, bis alle sichtbaren Partikel aufgelöst waren. Dann wurden 200µl Chloroform hinzugegeben und beide Phasen für etwa 20sec auf dem Vortexer durchmischt, bis sich eine milchig-weiße Farbe ergab. Anschließend wurden die Proben 15min bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Während dieser Zeit konnte für jede Probe 500µl Isopropanol in ein neues Röhrchen vorgelegt werden. Das Isopropanol wurde bei 4°C gelagert und mußte frisch aus dem Kühlschrank entnommen werden. Nach Beendigung der Zentrifugation wiesen die Tubes jeweils drei Phasen auf, bestehend aus dem Trizol-haltigen Anteil am Grund des Tubes, einer dünnen weißlichen Interphase in der Mitte und einem klaren Überstand als oberster Schicht. Während die Trizol-haltige Phase die DNA enthielt und sich in der Interphase die Zelltrümmer befanden, enthielt der klare Überstand die RNA. Von dem Überstand wurden mit der 1000µl-Pipette 500µl abgenommen. Dabei durfte kein Material aus den anderen Phasen abgegriffen werden, um Verunreinigungen der weiteren RNA-Isolierung zu vermeiden. Der entnommene Überstand wurde zu dem vorgelegten Isopropanol gegeben, durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette vermischt und anschließend zur Ausfällung über Nacht bei -20°C konserviert.

Am zweiten Tag wurde das Gemisch aus dem Gefrierschrank entnommen und sofort für 10 min bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Während der Zentrifugation lagerte sich am Grund des Röhrchens Material zu einem kleinen weißen Pellet ab. Es handelte sich dabei um die noch nicht vollständig aufgereinigte RNA. Darüber befand sich klarer Überstand, der abgossen wurde. Im Anschluss wurden 500µl Ethanol (70%ig, bei -20°C gelagert) auf das Pellet gegeben und für 5min mit 7500g bei 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die Pellets wurden dann im geschlossenen Abzug 20min vollständig getrocknet. Anschließend wurden sie durch

mehrmaliges Aufziehen mit der 100µl-Pipette in Wasser aufgelöst. Das Wasser wurde mit DEPC versetzt, um die in unbehandeltem Wasser enthaltene RNase zu inaktivieren. Sehr schwach ausgebildete Pellets wurden in 20µl Wasser aufgelöst, während Pellets von 2mm Durchmesser 40µl Wasser benötigten (mittelgroße Pellets wurden in 25µl, 30µl oder 35µl Wasser aufgelöst). Das Gemisch aus Wasser und RNA wurde sofort auf Eis gegeben und dann für 10min in ein 70°C warmes Thermobad gestellt. Nach Beendigung des Thermobads wurden die Proben sofort wieder auf Eis gelagert. Zuletzt wurde am Photometer die Konzentration der RNA in den einzelnen Proben gemessen. Die Konzentration der RNA lag zwischen 100µg/ml und 1000µg/ml, da unter 100µg/ml das Material für die Synthese der first-strand DNA nicht sicher ausreicht und Werte über 1000µg/ml im weiteren Verlauf zu Pipettierungenauigkeiten führen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

#### 3.2.4 Synthese der Erststrang-DNA

Die Synthese der Erststrang-DNA erfolgte mit Hilfe des „First-strand cDNA Synthesis“ Kits. Dabei bestand der Ansatz für jede Probe aus 7µl Reaktionsmix und 8µl Gemisch aus RNA und Wasser. Der Reaktionsmix setzte sich für eine Probe zusammen aus 5µl Bulk, 1µl DTT und 1µl pd(N)<sub>6</sub>. Die verwendete Menge RNA errechnete sich aus der Konzentration der extrahierten RNA nach der Formel  $(1 \times 1000) : \text{Konzentration der RNA} = X$ . Bei einer Konzentration von 200µg/ml waren also 5µl zu verwenden. Die Differenz zu 8µl wurde durch Wasser ersetzt. Bei jedem Syntheselauf wurden eine negative Kontrolle für den Reaktionsmix und eine negative Kontrolle für jede Probe mitgeführt. Alle Pipettiervorgänge wurden auf Eis zu verrichtet.

Der Reaktionsmix wurde in einem Röhrchen (1,5ml) angesetzt, kurz auf dem Vortexer vermischt und bis zu seiner Verwendung auf Eis verwahrt. Die Proben mit der extrahierten RNA wurden so weit aufgetaut, dass sie pipettiert werden konnten. Für alle Reaktionen wurde ein 1,5ml großes Röhrchen bereitgestellt. Dann wurde zunächst für alle Proben 7µl Reaktionsmix vorgelegt, für die negative Kontrolle des Reaktionsmixes (K-) nur 3,5µl. Im nächsten Schritt wurde die errechnete Menge Wasser zugegeben (für K- immer 4µl). Die negativen Kontrollen der einzelnen Proben wurden dann für 5min bei 90°C in ein Thermobad gegeben, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Anschließend wurden sie kurz abzentrifugiert, dann wurde die RNA zugegeben und das

Gemisch sofort bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Bei allen positiven Proben (außer K-) wurde nach Zugabe des Wassers direkt die RNA zupipettiert und das Reaktionsgemisch dann für 60 bis 90min bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einen Brutschrank gestellt. In dieser Zeit lief die eigentliche Synthesereaktion ab. Nach Beendigung der Zeit im Brutschrank wurde die synthetisierte Erststrang-cDNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  verwahrt.

### 3.2.5 $\beta$ -Actin-spezifische PCR

Der Ansatz der  $\beta$ -Actin-PCR setzte sich zusammen aus  $1,5\mu\text{l}$  der zuvor synthetisierten first-strand cDNA und  $13,5\mu\text{l}$  Reaktionsmix, also insgesamt  $15\mu\text{l}$ . Bei jedem Amplifikationslauf wurden neben den positiven Proben die negative Kontrolle K- und die negativen Kontrollen der einzelnen Proben mitgeführt.

Der Reaktionsmix bestand für eine Probe aus  $1,5\mu\text{l}$  10xPuffer,  $1,5\mu\text{l}$  d'NTPs,  $3\mu\text{l}$  Actin-Mix,  $7,425\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und  $0,075\mu\text{l}$  Taq. Dabei wurde zunächst das Wasser in ein  $1,5\text{ml}$  fassendes Röhrchen pipettiert, dann folgten alle übrigen Bestandteile in der angegebenen Reihenfolge. Bei einer Vervielfachung für mehrere Proben wurde eine 0,3-fache Portion für Verlust durch den Pipettiervorgang berechnet. Der Reaktionsmix wurde kurz auf dem Vortexer durchmischt und bis zu seiner Verwendung auf Eis gestellt.

Die cDNA wurde soweit angetaut, dass sie pipettiert werden konnte. Dann wurde in  $50\mu\text{l}$  großen Röhrchen der Reaktionsmix vorgelegt und schließlich die cDNA zupipettiert. Um das Verdunsten der Reaktionsansätze während der PCR zu verhindern, wurden zuletzt noch 2 Tropfen Öl auf jeden Ansatz gegeben. Alle Pipettiervorgänge wurden auf Eis verrichtet. Die PCR lief dann unter den Bedingungen 4 min  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 sec  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 sec  $65^{\circ}\text{C}$  und 45 sec  $72^{\circ}\text{C}$  mit 30 Zyklen. Die Produkte der PCR wurden bei  $+4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.6 PCR zum Nachweis von HERV-K rec/cORF-Sequenzen

Der Ansatz der HERV-K-PCR bestand aus  $2\mu\text{l}$  first-strand cDNA und  $18\mu\text{l}$  Reaktionsmix. Es wurde cDNA verwendet, für die bereits ein positiver  $\beta$ -Actin-Nachweis existierte. Auch hier wurden bei jedem Amplifikationslauf die negative Kontrolle K- und die negativen Kontrollen der einzelnen Proben mitgeführt.

Der Reaktionsmix enthielt für eine Probe 2µl 10xPuffer, 2µl d'NTPs, 0,4µl Primer 65-01 (10pmol), 0,4µl Primer 66-01 (10pmol), 13,1µl H<sub>2</sub>O und 0,1µl Taq. Die Durchführung erfolgte analog zur β-Actin-spezifischen PCR.

Dann wurde die cDNA kurz angetaut, so dass sie pipettierfähig wurde. Der Reaktionsmix wurde für alle Proben in 50µl großen Röhrchen vorgelegt und die cDNA dann zugefügt (wiederum auf Eis pipettiert). Zuletzt wurden zwei Tropfen Öl auf den Ansatz gegeben. Die PCR lief unter den Bedingungen 4min 94°C, 30sec 94°C, 30sec 55°C und 45sec 72°C, 35 Zyklen. Die Produkte der PCR wurden bei +4°C verwahrt.

### 3.2.7 Nachweis im Agarosegel

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1,5%igen Agarosegel. Dazu wurden 0,75g Agarose und 45ml TAE-Puffer in einen Glasbehälter mit Schraubverschluss gegeben und unter leichtem Schwenken miteinander vermischt. Dann wurde das Gemisch in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Dabei mußte sich die Agarose vollständig auflösen. Schließlich wurden 2ml Ethidiumbromid zugegeben und ebenfalls unter leichtem Schwenken mit der übrigen Lösung vermischt. Nach Abkühlung der Gellösung auf etwa Handwärme wurde sie in die Gelbox gegossen. Das Gel härtete dann über ca. 20 min aus, wobei durch das Einhängen eines Kamms mit beliebig vielen Zacken die Slots des Gels geformt wurden.

Im nächsten Schritt wurden in einer Mikrotiterplatte jeweils 5µl einer zu untersuchenden Probe und 1ml des blauen GBX-Farbstoffs durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette vermischt.

Schließlich wurde das Gel in die Gelkammer eingehängt und die Proben senkrecht in die einzelnen Geltaschen pipettiert. An den Enden des Gels wurde jeweils Marker (Smart-Ladder) mit definierten Referenzbanden einpipettiert. Dann lief bei 80mA die eigentliche Elektrophorese ab, bis der blaue Streifen des Farbstoffs aus den Slots an das gegenüberliegende Ende des Gels gelaufen war und die Banden des Markers vollständig aufgetrennt waren. Das Gel wurde dann über einer UV-Lampe begutachtet und fotografiert.

Für ein 2%iges Agarosegel wurde bei sonst gleichen Bedingungen und gleichem Vorgehen 1g Agarose zugegeben.



### 3.2.8 Polyacrylamidgele

Die Gellösung bestand aus 6ml 30%igem Acryl PDA, 6ml Aqua bidest, 3ml 35mM Trissulfat, 105 $\mu$ l 10%igem APD und 5,3 $\mu$ l Temed. Das Temed wurde zuletzt und unter Rühren mit der Pipettenspitze zugegeben, da mit seiner Zugabe die Polymerisation des Gels begann. Die Lösung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, wobei auf einer der Glasplatten eine Gelbondfolie anhaftete, die später die Rückseite des fertigen Gels bildete. Das Gel war nach etwa 15min vollständig ausgehärtet.

Das Gel wurde dann mit der Folie als Rückseite in die Gelkammer gelegt (zur besseren Haftung wurde die Liegefläche der Gelkammer mit etwas Wasser befeuchtet). Die einzelnen Slots wurden dann mit 2,5 $\mu$ l Probe beladen. Am Rand des Gels wurde der Marker phiX (=Marker 4, im Verhältnis 1:50) aufgetragen. Ein vollständig beladenes Gel lief bei 18mA. Dazu wurden die beiden Pole auf Gelbalken mit bläulichem Trisborat an den beiden Enden des Gels aufgesetzt, so dass eine bläuliche über das Gel wandernde Linie den Fortschritt der Elektrophorese anzeigte. Der Vorgang war beendet, wenn die Linie den gegenüberliegenden Balken erreicht hatte, zu diesem Zeitpunkt waren auch die Banden des Markers vollständig aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Färbung des Gels mit Silber.

### 3.2.9 Silberfärbung des Polyacrylamidgels

Das Gel wurde zunächst für 3min in eine Wanne mit 1%iger HNO<sub>3</sub> (Salpetersäure) gegeben. Danach wurde das HNO<sub>3</sub> abgegossen und das Gel 1- bis 3mal mit destilliertem Wasser gespült. Dann wurde das Gel für 20min in 0,4iges Silbernitrat (AgNO<sub>3</sub>) gelegt. Anschließend wurde das Silbernitrat abgegossen und das Gel wiederum 1- bis 3mal mit destilliertem Wasser gespült. Im nächsten Schritt wurde der Entwickler auf das Gel gegeben. Er setzte sich zusammen aus 200ml Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>=57,36g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf 2l destilliertes Wasser) und 150 $\mu$ l 40%igem Formalin und wurde in drei Fraktionen auf das Gel gegeben. Während dieser Phase wurden die Banden in brauner Farbe auf dem Gel sichtbar. Da die Färbung noch nicht fixiert war, wurde nach diesem Schritt nicht mit Wasser gespült, sondern sofort reichlich 10%ige Essigsäure auf das Gel gegeben. Die Essigsäure wurde für 3min in der Wanne belassen. Danach wurde 1-

bis 3mal mit destilliertem Wasser gespült. Zuletzt wurde das Gel für 5min in 10%igem Glycerin gebadet. Das Gel wurde schließlich in Folie eingeschweißt.

#### 3.2.10 „Platinum Pfx“-PCR zur Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde zunächst eine erneute PCR mit dem „Platinum Pfx DNA Polymerase“ Kit durchgeführt. Dabei wurde DNA verwendet, für die ein positiver Nachweis der HERV-K-Banden existierte. Es wurden 200µl fassende Röhrchen verwendet.

Der Reaktionsmix für eine Probe setzte sich zusammen aus 31,5µl Wasser (dest.), 5µl 10x Pfx Amplification Puffer, 1,5µl dNTPs, 1µl Magnesium-Sulfat, 1,5µl 65-01 (10µM), 1,5µl 66-01 (10µM), 5µl Enhancer und 1µl Platinum Pfx DNA Polymerase, insgesamt 48µl Reaktionsmix. Hinzugegeben wurden 2µl DNA. Die PCR lief schließlich unter den Bedingungen 2min 94°C, 15sec 94°C, 30sec 55°C und 1min 68°C mit 35 Zyklen ab.

#### 3.2.11 Nachweis der DNA-Banden

Zunächst wurde ein 2%iges Agarosegel mit großen Slots gegossen, Anleitung siehe oben. Dann wurden jeweils 15µl DNA und 2µl Loading Puffer miteinander vermischt und in die Slots pipettiert. Die Elektrophorese lief sehr langsam bei 40V ab, um eine sehr saubere Auftrennung der Banden zu erzielen. Nach Ablauf der Elektrophorese wurden über der UV-Lampe die einzelnen Banden aus dem Gel herausgeschnitten und zur weiteren Verarbeitung in 1,5ml große Röhrchen gegeben.

#### 3.2.12 Aufreinigung der DNA-Banden aus dem Gel

Zur Aufreinigung der Banden aus dem Gel wurde das „Ultra Clean 15 DNA Purification“ Kit verwendet.

Den Gelbalken wurden jeweils 350µl Ultra Salt zugegeben, so dass sie über 5min bei 60°C eingeschmolzen werden konnten. Im nächsten Schritt gab man jeweils 6µl Ultra Bind in jedes Röhrchen, wobei das Gemisch auf dem Vortexer annähernd verflüssigt werden mußte. Danach mußte es 1min ruhen. Dann wurde das Gemisch kurz

abzentrifugiert, so dass sich am Grund des Röhrchens ein weißes Pellet, das die DNA enthielt, und darüber ein klarer Überstand bildeten. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen. Dann wurde 1ml Ultra Wash zugegeben. Das Gemisch wurde auf dem Vortexer vermischt und dann zentrifugiert, so dass sich wiederum ein Pellet und Überstand bildeten. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang zur weiteren Aufreinigung noch einmal wiederholt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet und damit die DNA in 10µl Wasser (dest.) aufgelöst. Das Gemisch mußte 1min ruhen. Schließlich wurde das Gemisch kurz zentrifugiert, so dass sich am Grund die überschüssige Matrix absetzte und sich im Überstand darüber die DNA befand. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C eingefroren.

### 3.2.13 Nährmedium

Für die Bebrütung der im weiteren Verlauf mit einem Vektor zur Klonierung versehenen Bakterien benötigte man ein spezielles Nährmedium. Dazu wurde zunächst eine Gellösung aus 500ml destilliertem Wasser, 12,5g Luria Broth Base und 7,5g Agarose hergestellt und bei 121°C für 20min autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50-60°C wurden 500µl Ampicillin (entspricht 100mg/ml) zugegeben. Schließlich wurden unter einer Flow jeweils 25ml Lösung in eine Petrischale gegeben, die zum gebrauchsfertigen Nährmedium aushärteten. Für jeden Klonierungsansatz wurden 2 Medien angesetzt.

### 3.2.14 Klonierung

Für den Vorgang der Klonierung wurde das „Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing“ benutzt. Für einen Ansatz wurden zunächst 1µl PCR-DNA Amplifikat aus dem vorhergehenden Schritt, 1µl Salt Solution und 3µl destilliertes Wasser (insgesamt 5µl Mix) auf Eis in ein 50µl fassendes Röhrchen pipettiert. Zuletzt wurde 1µl Vektor hinzugegeben. Dann wurde das Gemisch 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden 2µl des Ansatzes auf je eine Einheit der vorgegebenen Bakterien (E. coli) gegeben und durch leichtes Schwenken vermischt. Danach wurde der Ansatz für 30sec bei 42°C in ein Wasserbad gestellt. Dieser „Hitzeschock“ diente der Parturbation der Bakterienmembranen, so dass der Vektor in das Bakterium hineingelangen konnte.

Direkt im Anschluss wurde der Ansatz für 2min auf Eis gestellt, damit sich die Poren wieder verschliessen konnten. Danach wurden 250µl SOC Medium in den Ansatz gegeben und das Gemisch bei 37°C für 1 h im Schüttler inkubiert.

#### 3.2.15 Bebrütung der Klone

Von jedem Ansatz wurden mit einer sterilen Pasteurpipette 50µl auf einem ersten Nährmedium und der Rest des Ansatzes (annähernd 250µl) auf einem zweiten Nährmedium ausgestrichen. Dann wurden die Platten mit dem zugehörigen Deckel verschlossen und mit Parafilm gegen externe Keime abgedichtet. Zuletzt wurden die Bakterien mit dem inklonierten Vektor über Nacht (längstens 12h) bei 37°C bebrütet. (Nährmedium mit seiner Rückseite nach oben richten, sonst Kondensatbildung im Deckel!)

Von den bebrüteten Kolonien wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine Kolonie abgepickt und auf eine Platte mit Nährmedium gesetzt. Die Kolonie wurde im Schüttler für mindestens 9 h bei 37°C bebrütet.

#### 3.2.16 Extraktion des Plasmids

Anschließend erfolgte die Aufbereitung mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“. Dazu wurde das bakterielle Pellet in 250µl Puffer P1 aufgelöst und in ein Mikroröhrchen umgefüllt. Dann wurden 250µl Puffer P2 zugefügt und die Bestandteile durch leichtes Schwenken (4-6mal) vermischt. Anschließend wurden 350µl Puffer N3 zugegeben und 4-6mal zur Durchmischung geschwenkt. Schließlich wurde für 10min zentrifugiert, wobei das Mikroröhrchen in einem Sammelröhrchen (2ml) plaziert wurde. Der Überstand wurde in die QIAprep Säule pipettiert und dann für 30-60sec zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden 0,5ml Puffer PB auf die Säule gegeben und 30-60sec zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde ebenfalls verworfen. Dann wurden 0,75ml Puffer PE auf die Säule gegeben und wiederum für 30-60sec zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule schließlich noch einmal 1 min zentrifugiert, um sämtliche Rückstände des Puffers zu entfernen. Die Säule wurde dann in einem sterilen Röhrchen (1,5ml) plaziert. Schließlich wurden 50µl Wasser zentral aufgetragen, für

1min stehen gelassen und danach für 1min zentrifugiert. Die DNA (Plasmid) wurde so aus der Säule herausgelöst und befand sich in den 50µl Wasser, die sich im Rahmen der Zentrifugation am Grund des Röhrchens sammelten. Sie wurde bei -20°C verwahrt.

### 3.2.17 Nachweis des Vektors

Um nachzuweisen, dass tatsächlich der gewünschte Vektor in das Plasmid inkloniert wurde, wurde er mit dem Restriktionsenzym ECO RI spezifisch ausgeschnitten. Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 2µl Plasmid, 1µl Puffer, 1µl ECO RI und 6µl H<sub>2</sub>O. Es erfolgte eine Inkubation über 1,5h bei 37°C, ehe der Nachweis des Vektors im Agarosegel (1%) erfolgte (siehe auch oben).

### 3.2.18 PCR zur Sequenzierung

Die PCR zur Sequenzierung erfolgte mit dem „BigDye Terminator 3.0“-Kit. Der Reaktionsmix bestand aus 1,0µl „BigDye“ Reaktionsmix 3.0, 1,0µl 5x Sequenzierungspuffer, 3,0µl DNA, 1,5µl 1µM Primer und 3,5µl H<sub>2</sub>O (insgesamt 10µl). Die PCR lief unter den Bedingungen 4min 96°C, 20sec 96°C, 10sec 50°C und 2min 60°C, 35 PCR-Zyklen.

### 3.2.19 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung erfolgte mit dem entsprechenden Reaktionskit. Die Aufbereitung der zu verwendenden Säulen erfolgte nach den Anweisungen für das Kit. Dann wurden 10µl DNA auf jeweils eine Säule gegeben und anschließend zentrifugiert. Schließlich wurde die Probe in 10µl Wasser aufgelöst und mit der Methode nach F. Sanger durch Anregung der Fluoreszenzderivate mit einem Argonlaser ausgewertet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Histologie**

Die Begutachtung der histologischen Schnitte ergab die Übereinstimmung mit den zuvor gestellten Diagnosen (Tabelle 8, Anhang). Die eingefrorenen Gewebeproben waren im Vergleich mit den routinemäßig angefertigten Paraffinschnitten für den jeweiligen Tumor repräsentativ.

### **4.2 $\beta$ -Actin-PCR**

Insgesamt 113 Gewebeproben wurden auf Vorliegen in der RT-PCR amplifizierbarer  $\beta$ -Actin Transkripte untersucht. Dabei blieb nur bei einer Probe der Nachweis negativ, während in allen übrigen Proben  $\beta$ -Actin nachweisbar war und somit amplifizierbare RNA vorlag (Tabelle 9, Anhang). Entsprechend der Sequenz der gewählten Primer wurde ein 430bp langes Amplifikat erhalten. 112 Gewebeproben wurden daraufhin weiter untersucht. Abb. 4 zeigt exemplarisch für jeweils eine Probe jeder Gewebegruppe bzw. Entität die  $\beta$ -Actin-Bande.

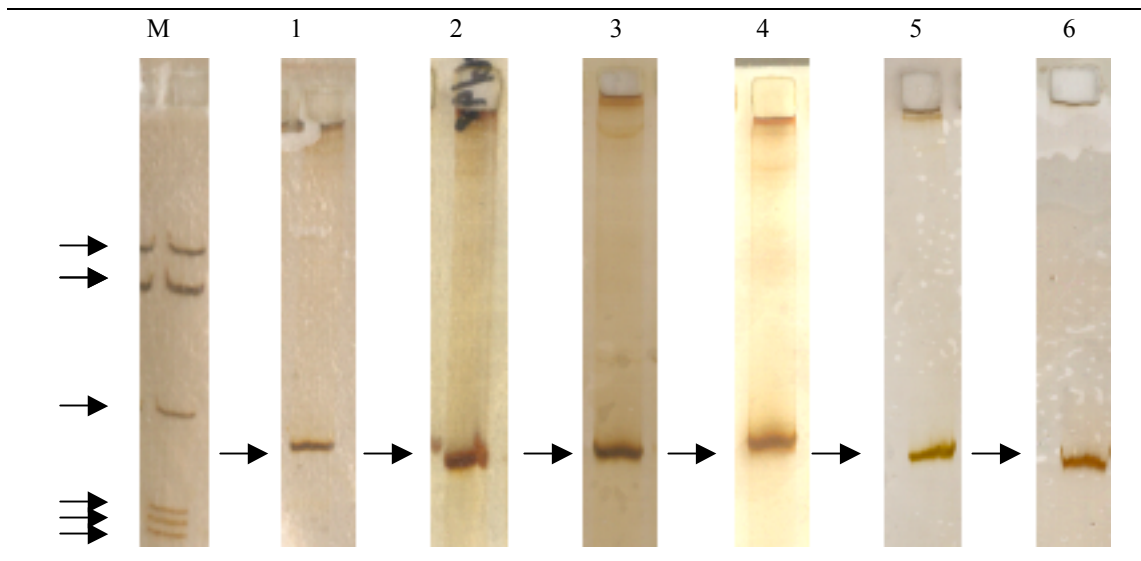
### **4.3 PCR zum Nachweis von HERV-K rec/cORF-Sequenzen**

#### **4.3.1 Zelllinien**

Die Zelllinien Tera 1 und Tera 2, die sich von Teratokarzinomen ableiteten, wurden hinsichtlich ihrer Expression HERV-K-spezifischer Sequenzen als Referenzen festgelegt. Sie exprimierten regelhaft die rec/cORF-Bande (450bp), die np9-Bande (250bp) sowie eine 300bp und eine 400bp lange Zwischenbande. Die Zelllinie Tera 1 wurde in allen Versuchsreihen als Referenz mitgeführt.

#### **4.3.2 Testikuläre Keimzelltumoren**

Die Gruppe der testikulären Keimzelltumoren bot ein homogenes Bild. Ohne Ausnahme exprimierten die verschiedenen Keimzelltumoren die rec/cORF-Bande (450bp) und die np9-Bande (250bp), daneben zeigten sich in den meisten Fällen eine Bande von 300bp Länge



**Abbildung 4**  $\beta$ -Actin-Banden für jeweils eine Probe jeder Entität.

M=Marker 4 (von oben nach unten Banden mit 1353bp, 1078/872bp zusammen liegend, 603bp, 310bp, 281bp, 271bp Länge); 1=Seminom, TIN (IH 2371/00); 2=Mantelzell-Lymphom (IH 996/98); 3=invasives muzinöses Mammakarzinom (IH 16637/01); 4=Glioblastom (TB 135); 5=klarzelliges Nierenzellkarzinom (IH 1496/01); 6=Lentigomaligna-Melanom (H99-1321). Für alle untersuchten Entitäten ist exemplarisch die  $\beta$ -Actin-Bande jeweils einer Probe dargestellt.

sowie eine Bande von 400bp Länge. Die Kombination dieser 4 Banden war somit das Expressionsgrundmuster der Gruppe der testikulären Keimzelltumoren und entsprach damit dem Referenzmuster der Zelllinien (Tabelle 2, Abbildung 5). Fakultativ stellten sich bei einigen Proben weitere Banden mit einer Länge von 235bp, 270bp oder 430bp dar, wobei diese Banden nicht auf einen Tumortyp dieser Gruppe beschränkt waren. Bemerkenswert war die Tatsache, dass das Grundmuster auch in Proben exprimiert wurde, die eine TIN, jedoch keinen invasiven Tumor beinhalteten (siehe IH 2561/00, IH 905/00 II). Eingefrorenes Gewebe, das keinen Tumor, sondern nur zellarme Anteile eines alten Infarkts enthielt (IH 2653/00) zeigte dagegen keine HERV-K-Expression, ebenso wie ein hochmalignes NHL des Hodens (IH 2330/00).

**Tabelle 2** Ergebnisse der HERV-K-PCR in der Gruppe der testikulären Keimzelltumoren

Nr.	IH-Nr.	Diagnose	Banden
1	IH 412/01	Seminom, TIN	250, 450
2	IH 3022/00	Seminom	<b>250</b> , 300, 400, 450
3	IH 2371/00	Seminom, TIN	235, <b>250</b> , 300, 400, 450
4	IH 2196/00 II	embryonales Karzinom	235, <b>250</b> , 300, 450
5	IH 2503/00	Teratokarzinom, TIN	235, 250, 450
6	IH 2561/00	ausgeprägte TIN, kein invasiver Tumor	235, <b>250</b> , 300, 450
7	IH 2510/00	embryonales Karzinom, reifes und unreifes Teratom	235, <b>250</b> , 270, 300, 400, 450
8	IH 2846/00	Seminom (s.2844/00 als 2. Entnahme)	235, <b>250</b> , 430, 450
9	IH 2874/00	Mischtumor: Seminom, Chorionkarzinom, Dottersacktumor, reifes Teratom	235, 250
10	IH 905/00 II	ausgedehnte TIN	200, <b>250</b> , 300, 400, 450
11	IH 2164/00 I	unreifes Teratom, Seminom, embryonales Karzinom	250, 300, 400, 450
12	IH 1351/00	embryonales Karzinom	250, 400, 450
13	IH 717/00	embryonales Karzinom, Chorionkarzinom	250, 300, 400, 450
14	IH 374/00	TIN, reifes Teratom	235, 250, 450
15	IH 330/01	Seminom	235, 250, 450
16	IH 66/01	Seminom	235, <b>250</b> , 300, 400, 450
17	IH 144/01	Seminom	235, <b>250</b> , 300, 400, <b>450</b>
18	IH 406/00 II	Seminom, TIN	235, <b>250</b>
19	IH 2798/00 re	Ductus deferens, Nebenhoden, kein Tumor (siehe Zeile 28)	235, 250
20	IH 406/00 I	Seminom, TIN	235, <b>250</b> , 300, 400, 450
21	IH 279/01	ausgebrannter Tumor, TIN	<b>250</b> , 300, 400, 450
22	IH 118/01	Seminom	235, <b>250</b> , 300, 400, <b>450</b>
23	IH 2844/00	Seminom	<b>250</b> , 400, 450
24	IH 2028/00	Seminom	<b>250</b> , 300, 450
25	IH 1391/00	embryonales Karzinom, Chorionkarzinom	<b>250</b> , 300, 400, 450
26	IH 2330/00 III	Hochmalignes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom	Negativ
27	IH 2653/00	älterer kompletter Infarkt, zellarm, Sklerose, kein Tumor	Negativ
28	IH 2798/00 li	Ductus deferens, Nebenhoden, kein Tumor (siehe Zeile 19)	Negativ

Die Banden sind mit ihrer Länge bezeichnet, fettgedruckte Schrift zeigt hohe Expressionsrate an, normal gedruckte Schrift steht für mittelgradige Expression und kursiv gedruckte Schrift bezeichnet geringe Expressionsrate.



**Tabelle 2** Ergebnisse der HERV-K-PCR in der Gruppe der testikulären Keimzelltumoren

<b>Nr. IH-Nr.</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Banden</b>
29 IH 2479/99	embryonales Karzinom, Dottersacktumor, reifes und unreifes Teratom	<i>250</i>
30 IH 592/00	regressiv verändertes Seminom, TIN	<b>250, 300, 400, 450</b>
31 IH 112/00	Seminom	<i>250, 450</i>

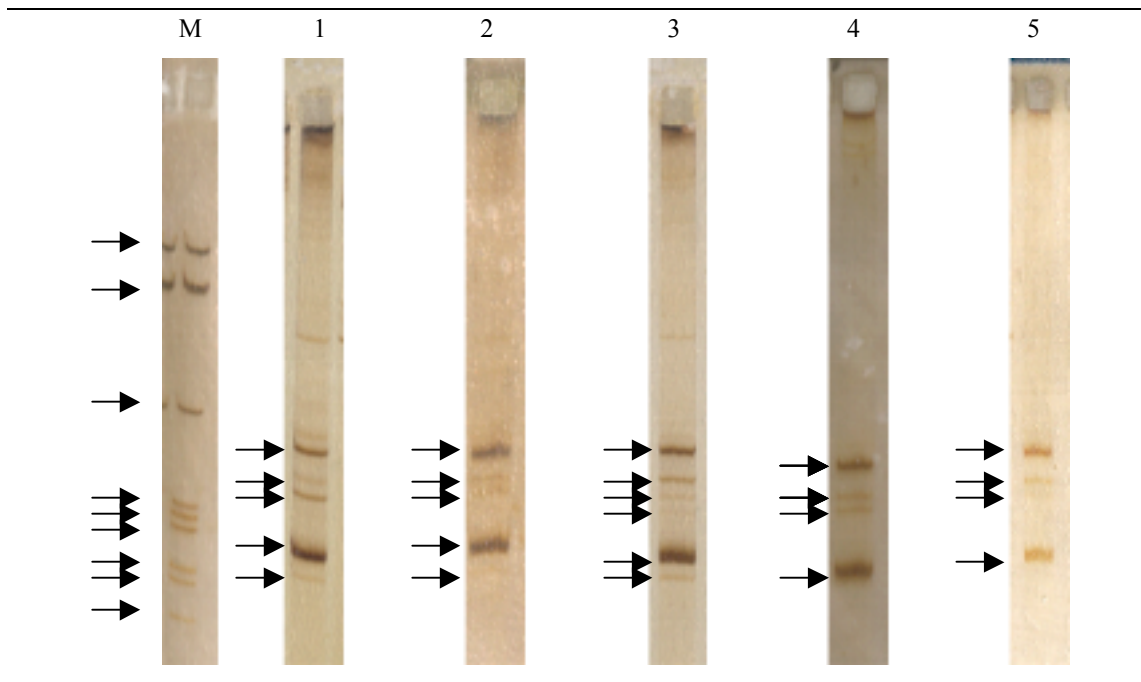
Die Banden sind mit ihrer Länge bezeichnet, fettgedruckte Schrift zeigt hohe Expressionsrate an, normal gedruckte Schrift steht für mittelgradige Expression und kursiv gedruckte Schrift bezeichnet geringe Expressionsrate.

#### 4.3.3 Lymphatische Läsionen

Die lymphatischen Gewebe boten ein homogenes Bild, denn in allen Fällen kam es zu einer Expression der np9-Bande mit 250bp Länge. Nur bei drei Proben kam eine zusätzliche Bande von 235bp Länge zur Darstellung. In drei Fällen wurde keine HERV-K-spezifische Bande exprimiert, wobei bei Fall IH 969/99 bereits der  $\beta$ -Actin-Nachweis nur schwach ausgeprägt war (Tabelle 3, Abbildung 6).

#### 4.3.4 Mammagewebe

Alle Mammagewebe exprimierten die np9-Bande (250bp) und bis auf sehr wenige Ausnahmen zusätzlich eine Bande von 235bp Länge, so dass die Kombination dieser beiden Banden das Expressionsgrundmuster der Mammagewebe darstellte (Tabelle 4, Abbildung 7). Dies traf auch für eine fibrozystische Mastopathie (E 5558/01) zu, während eine zweite fibröse Mastopathie (IH 1185/01) keine HERV-K-Expression zeigte. Selten kam es darüber hinaus zur Darstellung einer Bande von 260bp Länge. Auffällig war die Tatsache, dass zwei Proben, die histologisch keinen Anhalt für einen malignen Tumor boten, trotzdem schwache HERV-K-Banden zeigten (die np9-Bande bei E 6754/01 beziehungsweise die 235bp lange Bande, die np9-Bande und eine 260bp lange Bande bei E 6755/01).



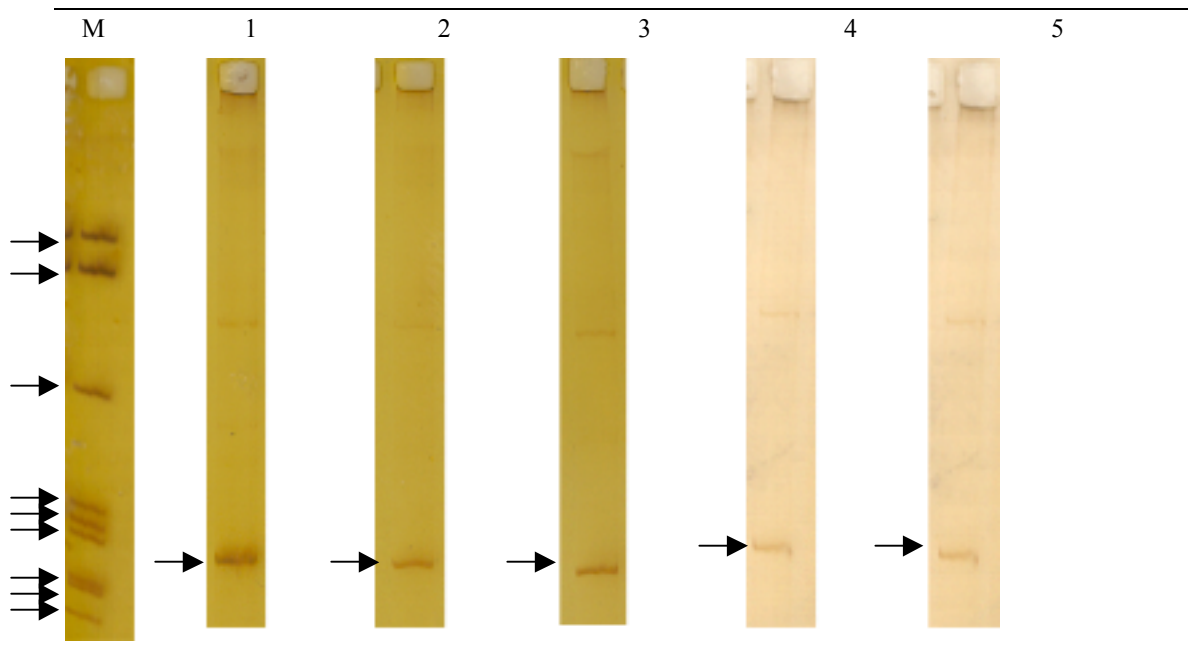
**Abbildung 5** HERV-K-spezifische Expression bei testikulären Keimzelltumoren.

M=Marker 4 (von oben nach unten Banden mit 1353bp, 1078/872bp zusammen liegend, 603bp, 310bp, 281bp, 271bp, 234bp, 194bp 118bp Länge), 1=Seminom, TIN (IH 2371/00; Banden mit 235bp, 250bp, 300bp, 400bp, 450bp); 2=Seminom (IH 118/01; Banden mit 235bp, 250bp, 300p, 400bp, 450bp); 3=embryonales Karzinom, reifes und unreifes Teratom (IH 2510/00; Banden mit 235bp, 250bp, 270bp, 300bp, 400bp, 450bp); 4=embryonales Karzinom, Chorionkarzinom (IH 717/00; Banden mit 250bp, 300bp, 400bp, 450bp); 5=regressiv verändertes Seminom, TIN (IH 592/00; Banden mit 250bp, 300bp, 400bp, 450bp). Es zeigten sich HERV-K spezifische Banden mit typischer rec/cORF- und np9-Expression und den 300bp und 400bp langen Zwischenbanden, sowie fakultativen Banden anderer Länge (z.B. 235bp Länge bei Nummer 2371/00 und 2510/00).

**Tabelle 3** Ergebnisse der HERV-K-PCR bei lymphatischen Läsionen

Nr.	IH-Nr.	Diagnose	Banden
32	IH 953/99	anaplastisches großzelliges Lymphom	250
33	IH 1969/99	follikuläres Lymphom	250
34	IH 1513/99	Plasmozytom	<b>250</b>
35	IH 2469/98	EBV-assoziierte Lymphadenitis	250
36	IH 16/99	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	250
37	IH 79/98	Burkitt-Lymphom	250
38	IH 115/98	follikuläres Lymphom	250
39	IH 140/99	Burkitt-Lymphom	250
40	IH 969/99	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	( - )
41	IH 648/98	granularzelliges T-Zell-Lymphom/Chronisch-lymphatische Leukämie der T-Zellreihe	250
42	IH 1092/98	anaplastisches großzelliges Lymphom	( - )
43	IH 15/99	follikuläres Lymphom	250
44	IH 177/98	anaplastisches großzelliges Lymphom	( - )
45	IH 1450/99	follikuläres Lymphom	<b>250</b>
46	IH 2474/98	diffuses großzelliges Lymphom	<b>250</b>
47	IH 1174/98	Hyperplasie des Lymphknotens	<b>250</b>
48	IH 996/98	Mantelzell-Lymphom	<b>250</b>
49	IH 120/98	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	250
50	IH 34/98	Immunozytom	235, 250
51	IH 1030/98	Hyperplasie des Lymphknotens	<b>250</b>
52	IH 1267/99	follikuläres Lymphom	<b>250</b>
53	IH 1279/99	follikuläres Lymphom	<b>250</b>
54	IH 1216/99	peripheres T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom	<b>250</b>
55	IH 931/99	Chronische lymphatische Leukämie der B-Zellreihe	<b>250</b>
56	IH 911/99	Plasmozytom	<b>250</b>
57	IH 1134/99	Chronische lymphatische Leukämie der B-Zellreihe	235, <b>250</b>
58	IH 1238/99	Chronische lymphatische Leukämie der B-Zellreihe	235, <b>250</b>

Die Banden sind mit ihrer Länge bezeichnet, fettgedruckte Schrift zeigt hohe Expressionsrate an, normal gedruckte Schrift steht für mittelgradige Expression und kursiv gedruckte Schrift bezeichnet geringe Expressionsrate.



**Abbildung 6** Darstellung der np9-Bande in der Gruppe der Lymphknotengewebe.

M=Marker 4 (von oben nach unten Banden mit 1353bp, 1078/872bp zusammen liegend, 603bp, 310bp, 281bp, 271bp, 234bp, 194bp und 118bp Länge); 1=Mantelzelllymphom (IH 996/98; Bande mit 250bp); 2=diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (IH 120/98; Bande mit 250bp); 3=peripheres T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (IH 1216/98; Bande mit 250bp); 4=follikuläres Lymphom (IH 115/98; Bande mit 250bp); 5=follikuläres Lymphom (IH 1969/98; Bande mit 250bp). Es zeigte sich die für HERV-K spezifische np9-Expression in der Gruppe der Lymphknotengewebe, im Vergleich zu anderen Entitäten fehlten hier jedoch die rec/cORF-Bande sowie weitere Zwischenbanden.

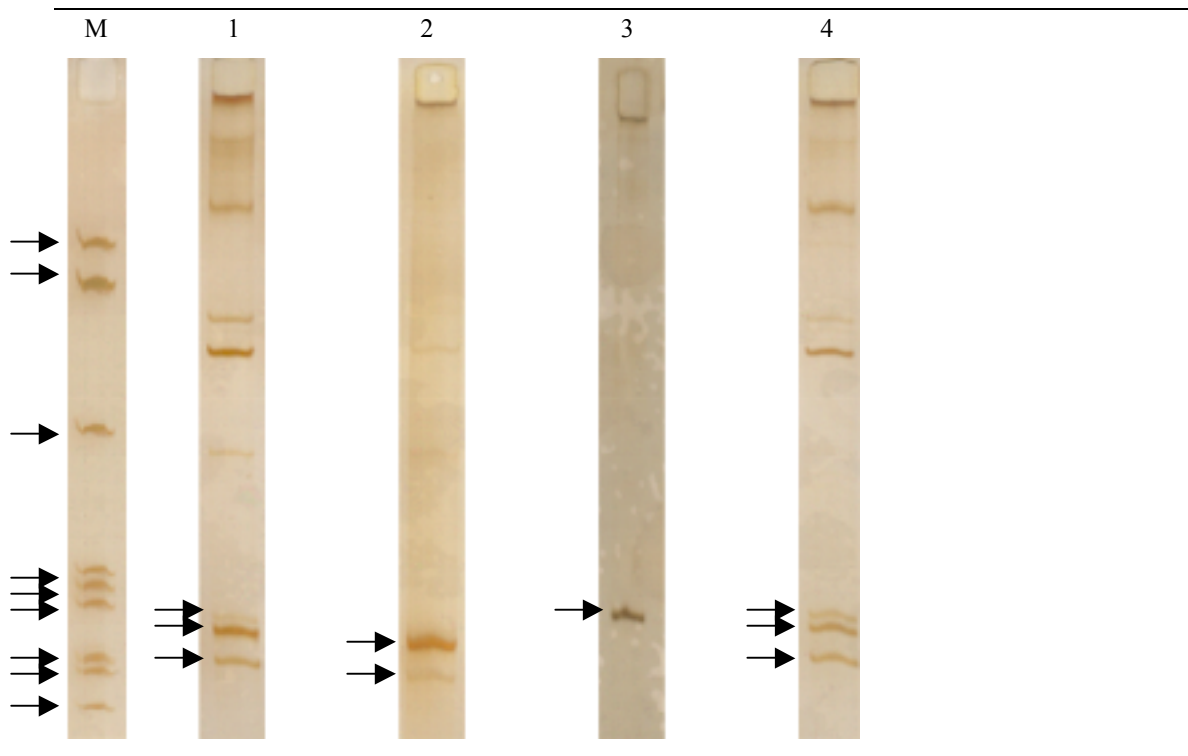
**Tabelle 4** Ergebnisse der HERV-K-PCR für Mammagewebe.

<b>Nr.</b>	<b>IH-/E-Nr.</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Banden</b>
59	E 16637/01	invasives muzinöses Mammakarzinom	235, <b>250</b> , 260
60	E 7605/01	mischdifferenziertes Mammakarzinom, DCIS	235, 250, 260
61	E 5558/01	fibrozystische Mastopathie, duktales Hyperplasia, Papillomatose	235, 250
62	E 6754/01	Fibrose, kein Tumor	250
63	E 6755/01	Fibrose, kein Tumor	235, 250, 260
64	E 5258/01	invasives, duktales Mammakarzinom	235, 250, 260
65	E 12080/01	mischdifferenziertes invasives Mammakarzinom	235, <b>250</b> , 260
66	E 12348/01	invasives duktales Mammakarzinom	235, <b>250</b>
67	IH 2741/00	invasives duktales Mammakarzinom, DCIS	<b>250</b>
68	IH 2756/00	invasives duktales Mammakarzinom	235, 250
69	IH 1166/01	invasives duktales Mammakarzinom	250
70	IH 1172/01	mischdifferenziertes Mammakarzinom, atypische lobuläre Hyperplasia	235, 250
71	IH 1185/01	fibrose Mastopathie	negativ

Die Banden sind mit ihrer Länge bezeichnet, fettgedruckte Schrift zeigt hohe Expressionsrate an, normal gedruckte Schrift steht für mittelgradige Expression und kursiv gedruckte Schrift bezeichnet geringe Expressionsrate.

#### 4.3.5 Hirntumoren

In allen Fällen kam es zur Darstellung der np9-Bande (250bp), darüber hinaus konnte bis auf drei Ausnahmen (TB 74, TB105 und TB 102) in allen Fällen zusätzlich die Expression einer 235bp langen Bande nachgewiesen werden (Tabelle 5, Abbildung 8). Demnach stellte die Kombination der Expression der np9-Bande und der 235bp langen Bande das Expressionsgrundmuster der Hirntumoren dar. Sehr bemerkenswert war die Tatsache, dass ein im Hirn befindliches Germinom (TB 59) in seiner Expression dem oben dargestellten Muster der Keimzelltumoren entsprach (Expression der rec/cORF-Bande und der np9-Bande).



**Abbildung 7** Darstellung der Expression HERV-K-spezifischer Banden bei Mammagewebe.

M=Marker 4 (von oben nach unten Banden 1353bp, 1078/872bp zusammen liegend, 603bp, 310bp, 281bp, 271bp, 234bp, 194bp 118bp Länge); 1=invasives muzinöses Mammakarzinom (IH 16637/01; Banden mit 235bp, 250bp, 260bp); 2=invasives duktakes Mammakarzinom G3 (IH 12348/01, Banden mit 235bp und 250bp); 3=invasives duktales Mamakarzinom, DCIS (IH 2741/01; Bande mit 250bp); 4=mischdifferenziertes Mammakarzinom, DCIS (IH 7605/01; Bande mit 235bp, 250bp, 260bp).

Für die Gruppe der Mammagewebe war die Expression der np9-Bande, sowie die Expression von Banden mit 235bp und 260bp Länge typisch.

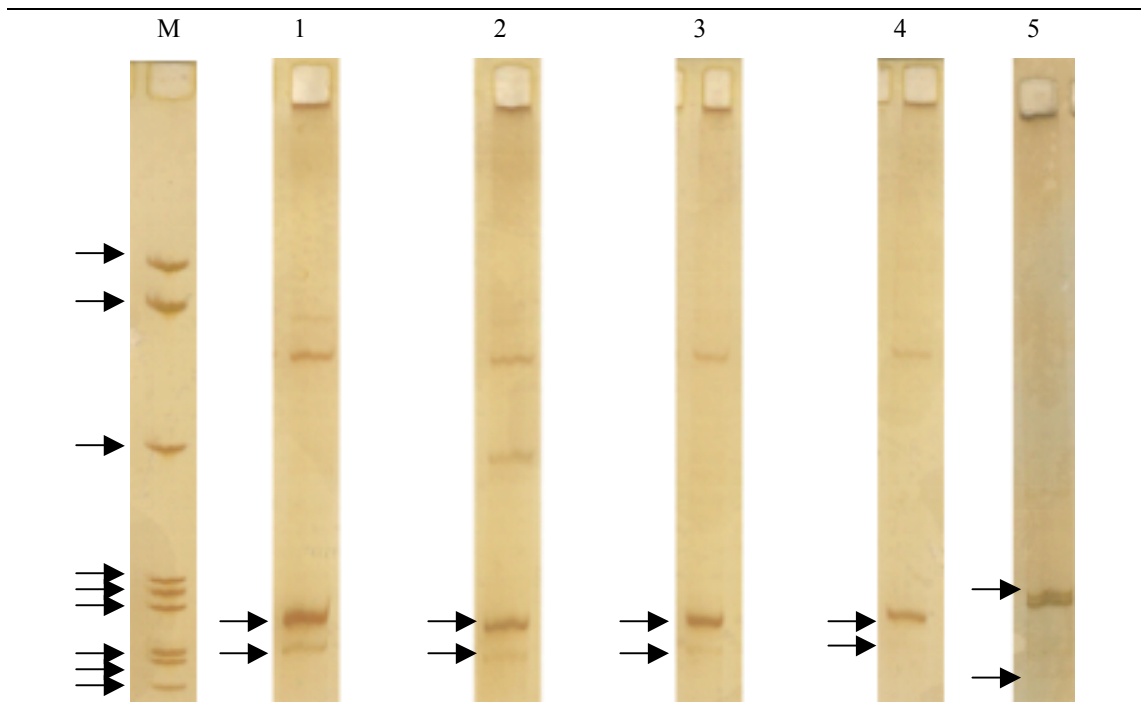
**Tabelle 5** Ergebnisse der HERV-K-PCR für Hirntumoren

<b>Nr.</b>	<b>TB-Nr.</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Banden</b>
72	TB 74	Glioblastom	250
73	TB 110	Glioblastom	235, 250
74	TB 152	Glioblastom	235, 250
75	TB 153	Glioblastom	235, 250
76	TB 105	Glioblastom	250
77	TB 27	anaplastisches Astrozytom	negativ
78	TB 34	Glioblastom	235, <b>250</b>
79	TB 71	anaplastisches Astrozytom	235, <b>250</b>
80	TB 26	Glioblastom	235, <b>250</b>
81	TB 132	Glioblastom	235, <b>250</b>
82	TB 80	Glioblastom	235, <b>250</b>
83	TB 154 I	Glioblastom	235, <b>250</b>
84	TB 135	Glioblastom	235, <b>250</b>
85	TB 102	anaplastisches Astrozytom	<b>250</b>
86	TB 83	Glioblastom	235, 250
87	TB 59	Germinom	<b>250, 450</b>

Die Banden sind mit ihrer Länge bezeichnet, fettgedruckte Schrift zeigt hohe Expressionsrate an, normal gedruckte Schrift steht für mittelgradige Expression und kursiv gedruckte Schrift bezeichnet geringe Expressionsrate.

#### 4.3.6 Nierengewebe

In allen Nierengeweben wurde die np9-Bande (250bp) exprimiert und außer in zwei Ausnahmefällen (IH 863/01 und IH 1496/01) kam es zudem zur Expression der 235bps langen Bande (Tabelle 6, Abbildung 9). Die rec/cORF-Bande (450bp) kam in knapp der Hälfte der Fälle zur Darstellung, ebenso einige Zwischenbanden von 300bp und 400bp Länge, sowie größere Banden mit 500bp, 550bp oder 600bp Länge. Das Expressionsgrundmuster in der Gruppe der Nierenzellgewebe beinhaltete demnach nahezu obligat die np9- und die 235bp lange Bande, während die längeren Banden in ihrem Auftreten stärker variierten. Das Muster ähnelte jedoch am meisten dem der testikulären Keimzelltumoren. Dies galt auch für ein



**Abbildung 8** HERV-K-spezifische Banden bei Hirntumoren.

M=Marker 4 (von oben nach unten Banden mit 1353bp, 1078/872bp zusammen liegend, 603bp, 310bp, 281bp, 271bp, 234bp, 194bp 118bp Länge); 1=Glioblastom (TB 135; Banden mit 235bp, 250bp); 2=Glioblastom (TB 154 I; Banden mit 235bp, 250bp); 3=Glioblastom (TB 132; Banden mit 235bp, 250bp); 4=anaplastisches Astrozytom (TB71; Banden mit 235bp, 250bp); 5=Germinom (TB59; Banden mit 250bp, 450bp).

Darstellung der typischen Kombination von np9-Bande und 235bp-Bande in der Gruppe der Hirntumoren, sowie Darstellung entsprechender Banden eines Germinoms im Gehirn (ORF-und np9-Bande wie bei testikulären Keimzelltumoren).



**Tabelle 6** Ergebnisse der HERV-K-PCR für Nierengewebe.

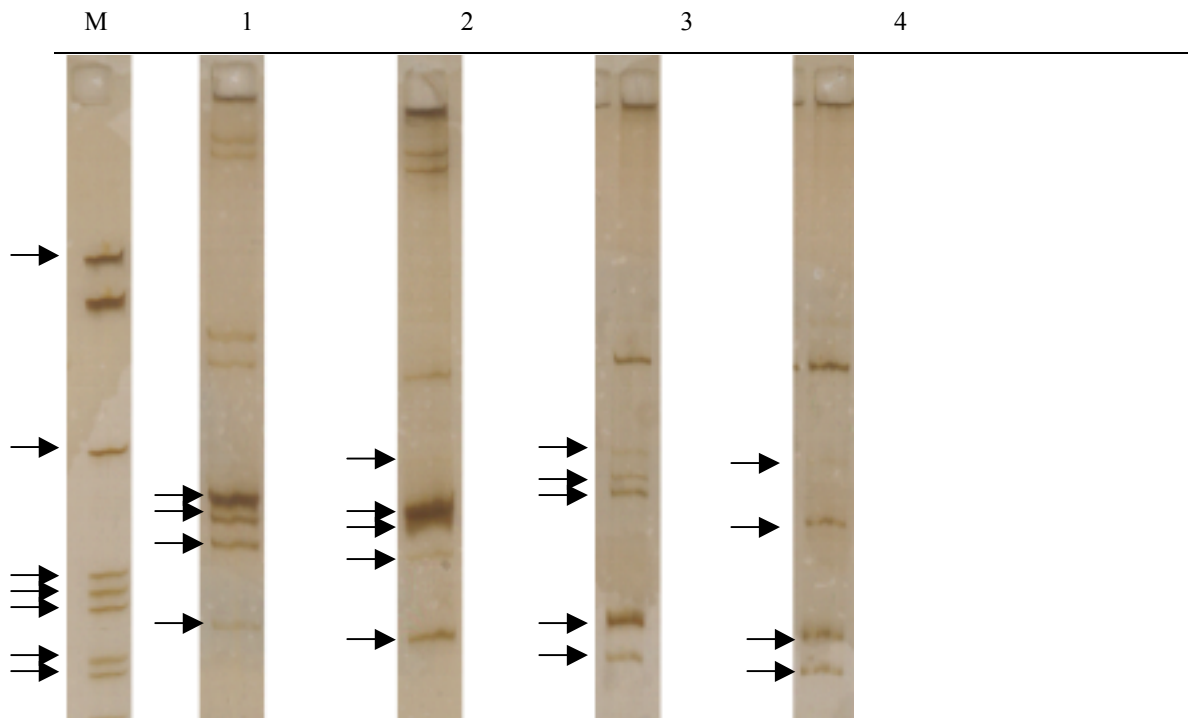
<b>Nr.</b>	<b>IH-Nr.</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Banden</b>
88	IH 1378/01	xanthogranulomatöse Pyelonephritis	235, 250
89	IH 1062/01	Nierenzellkarzinom	235, 250, 270, 500, 550, 600
90	IH 820/01	Onkozytom	235, <b>250</b>
91	IH 1376/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	235, <b>250</b> , 500, 550, 600
92	IH 1304/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	235, 250, 450, 600
93	IH 817/01	Nierenzellkarzinom	235, <b>250</b>
94	IH 1186/01	Urothelkarzinom	235, 250, 500
95	IH 1184/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	235, 250, 500
96	IH 770/01	Nierenzellkarzinom	235, 250, 400, 450, <b>500</b>
97	IH 969/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	235, 250, 300, 400, <b>450</b> , 500
98	IH 1302/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	235, 250, 450, 500
99	IH 863/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	250, 300, 400, <b>450</b>
100	IH 1496/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	250, 300, 400, <b>450</b> , 600
101	IH 822/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	235, 250, 300, <b>450</b> , 550

Die Banden sind mit ihrer Länge bezeichnet, fettgedruckte Schrift zeigt hohe Expressionsrate an, normal gedruckte Schrift steht für mittelgradige Expression und kursiv gedruckte Schrift bezeichnet geringe Expressionsrate.

untersuchtes Urothelkarzinom. Überraschend exprimierten selbst die untersuchte Pyelonephritis (IH 1378/01) und ein Onkozytom (IH 820/01) die np9-Bande und die kleine 235bps lange Bande.

#### 4.3.7 Melanome

Abgesehen von einer Ausnahme (H 01-0685) wiesen alle für HERV-K positiven Fälle die np9-Bande auf, sowie die kleine Bande mit 235bp Länge (außer H 01-0466). Nur in zwei Fällen kam es zur Darstellung der rec/cORF-Bande (H 99-2113 und H 01-0107). Auch Banden anderer Längen wurden in dieser Gruppe nur sehr selten exprimiert. Zwei Proben zeigten keine HERV-K-spezifischen Banden, wobei bei Nummer H 99-1351 bereits der  $\beta$ -Actinnachweis nur sehr schwach ausgebildet war (Tabelle 7, Abbildung 10).



**Abbildung 9** Darstellung HERV-K-spezifischer Banden bei Nierenzellkarzinomen.

M=Marker 4 (von oben nach unten Banden mit 1353bp, 1078/872bp zusammen liegend, 603bp, 310bp, 281bp, 271bp, 234bp, 194bp Länge); 1=klarzelliges Nierenzellkarzinom (IH 863/01; Banden mit 250bp, 300bp, 400bp, 450bp); 2=klarzelliges Nierenzellkarzinom (IH 1496/01; Banden mit 250bp, 300bp, 400bp, 450bp, 600bp); 3=klarzelliges Nierenzellkarzinom (IH 1376/01, Banden mit 235bp, 250bp, 500bp, 550bp, 600bp); 4=klarzelliges Nierenzellkarzinom (IH 1304/01; Banden mit 235, 250, 450, 600).

Es zeigte sich bei Nierenzellkarzinomen typischerweise die np9-Bande beziehungsweise fakultativ die rec/cORF-Bande (450bp). Weitere Banden von zum Beispiel 300bp oder 400bp Länge sind hier sehr variabel.

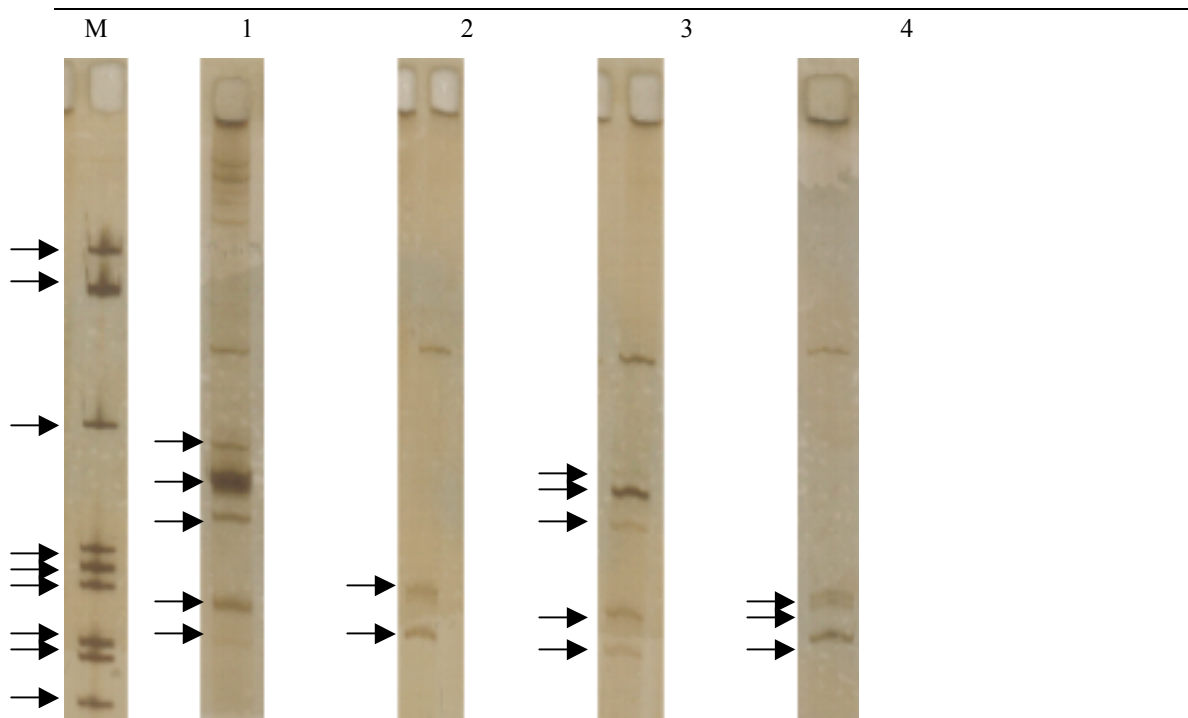
**Tabelle 7** Ergebnisse der HERV-K-PCR in der Gruppe der Melanome

<b>Nr.</b>	<b>H-Nr.</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Banden</b>
102	99-1321	Lentigo-maligna-Melanom	235, 250
103	99-2113	noduläres Melanom	235, 250, 400, <b>450</b> , 500
104	01-0322	superfiziell spreitendes Melanom	235, 250
105	01-0710	noduläres Melanom	235, 250
106	01-0107	noduläres Melanom	235, 250, 400, <b>450</b> , 550
107	99-1352	Melanom	Negativ
108	01-0842	superfiziell spreitendes Melanom	235
109	01-0554	superfiziell spreitendes Melanom	235, 250
110	01-0493	Lentigo-maligna-Melanom	235, 250, 260
111	01-0794	superfiziell spreitendes Melanom	Negativ
112	99-1608	superfiziell spreitendes Melanom	235, 250
113	01-0466	Lentigo-maligna-Melanom	250
114	01-0685	superfiziell spreitendes Melanom	235

Die Banden sind mit ihrer Länge bezeichnet, fettgedruckte Schrift zeigt hohe Expresionsrate an, normal gedruckte Schrift steht für mittelgradige Expression und kursiv gedruckte Schrift bezeichnet geringe Expresionsrate.

#### **4.4 Sequenzen**

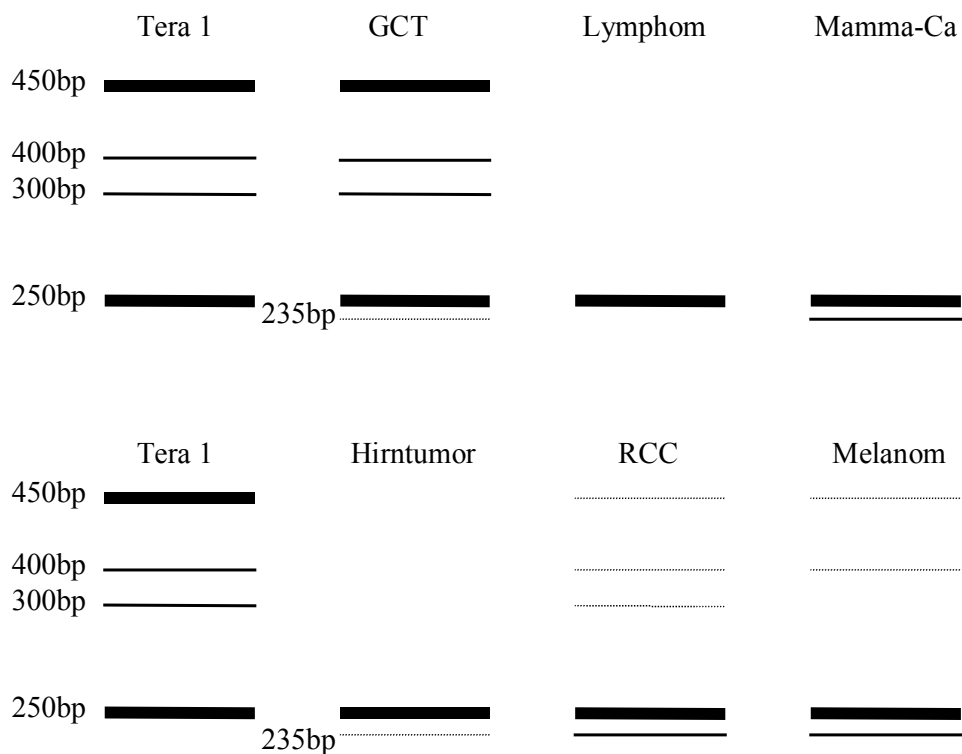
Die Sequenzanalysen zeigten, dass es sich tatsächlich um HERV-K-spezifische Sequenzen handelte. Die Genorte der Sequenzen lagen auf den Chromosomen 1, 3, 5, 7, 12 und 22. Es wurde außerdem deutlich, dass den einzelnen Entitäten auch verschiedene Spleißmuster bzw. Proviren zugeordnet werden können, so trat zum Beispiel HERV-K(HML-2) bevorzugt in der Gruppe der Nierengewebe auf. Dies wiederholte die Entitätenspezifität der verschiedenen Expressionsgrundmuster (vergl. Abbildung 11). Abbildung 12 zeigt eine Übersicht der Sequenzen der einzelnen Proben, in der die Spleißvarianten deutlich werden. In den Abbildungen 13, 14 und 15 sind die Sequenzen selbst dargestellt.



**Abbildung 10** HERV-K-spezifische Banden der Melanome.

M=Marker 4 (von oben nach unten Banden mit 1353bp, 1078/872bp zusammen liegend, 603bp, 310bp, 281bp, 271bp, 234bp, 194bp, 118bp Länge); 1=noduläres Melanom (H 01-0107; Banden mit 235bp, 250bp, 400bp, 450bp, 550bp); 2=Lentigo-maligna-Melanom (H 99-1321; Banden mit 235bp, 250bp); 3=noduläres Melanom (H 99-2113; Banden mit 235bp, 250bp, 400bp, 450bp, 500bp); 4=Lentigo-maligna-Melanom (H 01-0493; Banden mit 235bp, 250bp, 260bp).

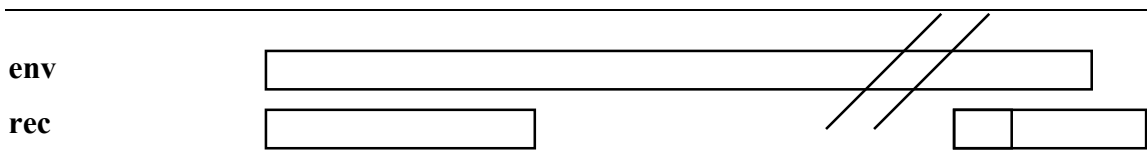
Darstellung der typischen Kombination aus np9-Bande und der 235bp langen Bande in der Gruppe der Melanome, daneben einzelne längere Banden.



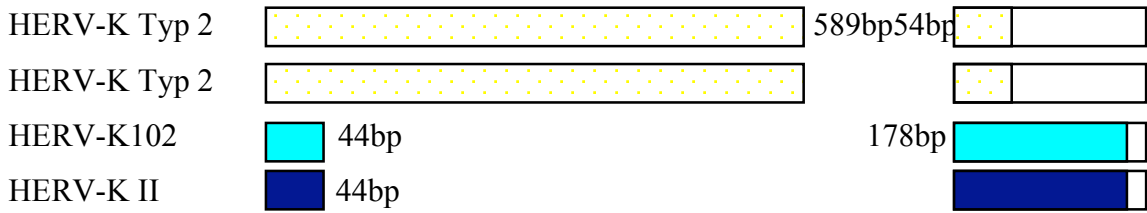
**Abbildung 11** Vergleich der HERV-K-Expressionsgrundmuster

Tera 1=Zelllinie, GCT=Gruppe der testikulären Keimzelltumoren, Lymphom=Lymphknotengewebe, Mamma-Ca=Mammagewebe (überwiegend Mammakarzinome), RCC=Nierengewebe (überwiegend Nierenzellkarzinome), Melanom=Gruppe der Melanome. Die verschiedenen Entitäten zeigen in der PCR für HERV-K-spezifische rec/cORF-Sequenzen jeweils eigene Expressionsgrundmuster. Kräftige Banden entsprechen hoher Expressionsrate, dünne Banden zeigen schwächere Expressionsrate und gestrichelte Banden stehen für häufige, aber fakultativ auftretende Banden.

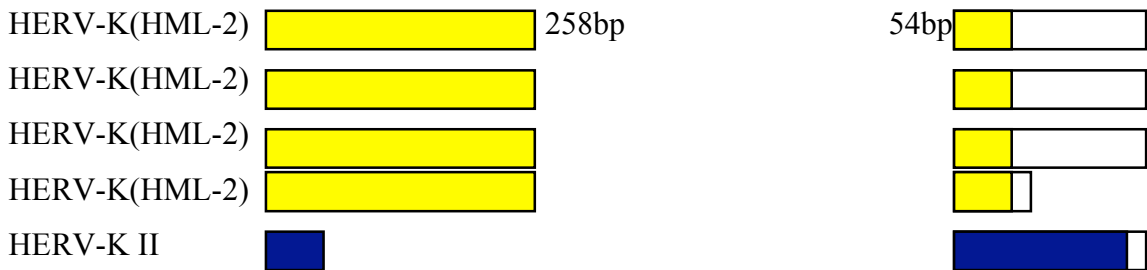
---



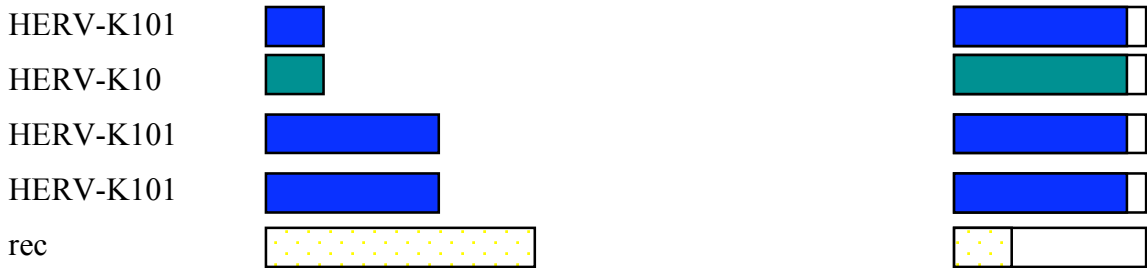
**Probe IH99-1321 (Lentigo-maligna-Melanom)**



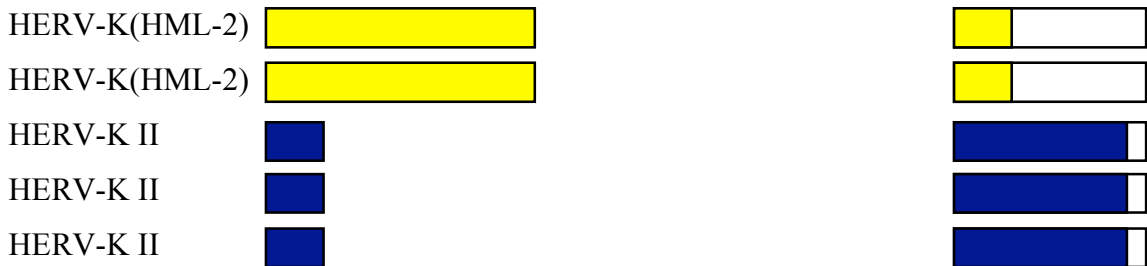
**Probe IH1496/01 (klarzelliges Nierenzellkarzinom)**



**Probe IH2371/00 (Seminom, TIN)**



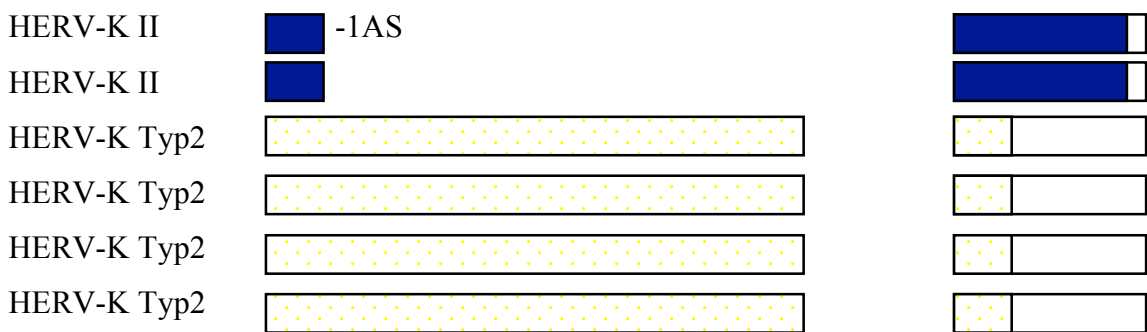
**Probe IH1376/01 (klarzelliges Nierenzellkarzinom)**



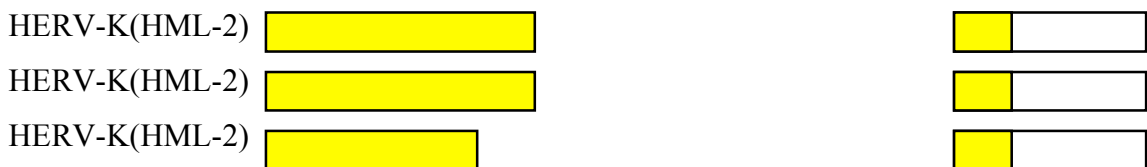
**Probe IH118/01 (Seminom)**



**Probe E12348/01 (invasives duktales Mammakarzinom)**



**Probe IH863/01 (klarzelliges Nierenzellkarzinom)**



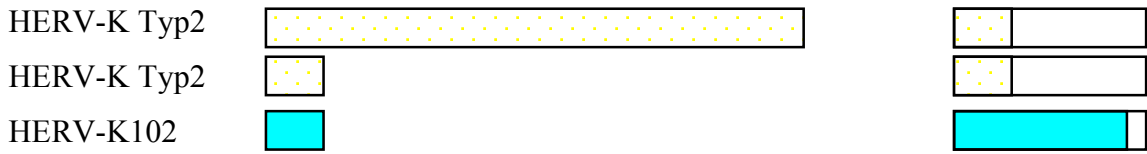
**Probe H01-0107 (noduläres Melanom)**



**Probe IH79/98 (Burkitt-Lymphom)**



**Probe IH2469/98** (EBV-assoziierte Lymphadenitis)



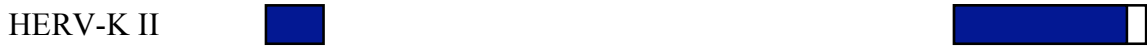
**Probe IH34/98** (Immunozytom)



**Probe IH120/98** (diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom)



**Probe IH996/98** (Mantelzell-Lymphom)



**Probe IH1174/98** (Hyperplasie des Lymphknotens)



**Probe IH911/99** (Plasmozytom)



**Probe IH931/99** (Chronisch-lymphatische Leukämie der B-Zellreihe)



**Probe IH1216/99** (peripheres T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom)





**Probe IH1267/99** (follikuläres Lymphom)

HERV-K II



---

**Abbildung 12** Übersichtsdarstellung der PCR-Produkte

Die Abbildung stellt die verschiedenen Spleißmuster der HERV-K rec/cORF-Sequenzen bei ausgesuchten Fällen, die für das entsprechende Expressionsmuster repräsentativ waren, dar. Die Kopfzeile zeigt im Vergleich dazu die env-Sequenz als Übersicht. Es wurde deutlich, dass die verschiedenen Spleißvarianten unterschiedlichen HERV-K-Providiren zugeordnet werden konnten. Dabei verhielten sich die Fälle einer Entität untereinander sehr homogen, zum Beispiel ließen sich die Sequenzen in der Gruppe der Lymphknotengewebe meist dem HERV-K II zuordnen.

**Abbildung 13** Darstellung der Varianten der cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2.HOM).

```

n-t6451 CORF (HERV-K TypII (HML-2.HOM))
ATGAAACCCATCGGAGATGCAAAAGAAAAGCACCTCCCGGGAGACGGAGACATCCCAATCGAGCACCGTTGACTCACAAGATGAAACAAAATGGTGACGTCAGAAACAGATGA
H99-1321 (a2d4) .....a.....gg.....a.a.....t.
H99-1321 (a1d4) .....gg.....a.....t.
IH1496/01 (b2f3) .....C.....a.....
IH1496/01 (b2e3) .....C.....a.....
IH1496/01 (b1d3) .....C.....a.....
IH1496/01 (b1c3) .....C.....a.....
IH1496/01 (a1b3) .....C.....a.....
IH2371/00 (c1a3) .....gg.....a.a.....t.
IH2371/00 (a2f2) .....
IH1376/01 (b1a4) .....gg.....a.....t.
.....ccgca.....

```

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ I cORF-Sequenzen der untersuchten Fälle. Die Vergleichssequenz ist in der Kopfzeile angegeben. Punkte zeigen Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz, Austausch sind mit den Buchstaben der entsprechenden Base gekennzeichnet, Leerzeichen zeigen eine Unterbrechung der Sequenz an. Die Sequenzen sind mit der Identifikationsnummer des Falls und in Klammern mit der Platte und dem Klon der entsprechenden Sequenzierungsreihe beschriftet. H99-1321=Melanom (LMM), IH1496/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, IH2371/00=Seminom, TIN, IH1376/01klarzelliges Nierenzellkarzinom. (Spleißmuster n. Armbruster et al. 2002)

**Abbildung 13** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2.HOM).

rec/cORF (HERV-K TypII (HML-2.HOM))	
AGTTGCCATCCACCAAGAAGGCAGAGCCGCCAACTTGGGCACAACTAAAGAAGCTGACCGCAGTTAGCTACAAAAATATCTAGAGAACACACAACAAAAACCCCCAGAGAG	
H99-1321 (a2d4)	
H99-1321 (a1d4)	
IH1496/01 (b2f3)	
IH1496b/01 (b2e3)	.....g.....
.....	.....g.....
IH1496/01 (b1d3)	.....g.....
IH1496/01 (b1c3)	.....g.....
.....	.....c.....
IH1496/01 (a1b3)	.....
IH2371/00 (c1a3)	.....
IH2371/00 (a2f2)	.....
IH1376/01 (b1a4)	.....
.....	.....

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ I rec/cORF-Sequenzen der untersuchten Fälle. Die Vergleichssequenz ist in der Kopfzeile angegeben. Punkte zeigen Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz, Austausch sind mit den Buchstaben der entsprechenden Base gekennzeichnet, Leerzeichen zeigen eine Unterbrechung der Sequenz an. Die Sequenzen sind mit der Identifikationsnummer des Falls und in Klammern mit der Platte und dem Klon der entsprechenden Sequenzierungsreihe beschriftet. H99-1321=Melanom (LMM), IH1496/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, IH2371/00=Seminom, TIN, IH1376/01klarzelliges Nierenzellkarzinom. (Spleißmuster n. Armbruester et al. 2002)

**Abbildung 13** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2.HOM).

rec/cORF (HERV-K TypII (HML-2.HOM))	TATGCTGCTTGCAGCCCTTGATGATTGTATCAATGGTG:::TCTGCAGGTGTACCCAACAGCTCCGAAGAGACAGCGACCATCGAGAACGGGCCATGATGACGATGGCGGTTTT
H99-1321 (a2d4)	.....
H99-1321 (a1d4)	.....C.....
IH1496/01 (b2f3)	.....t.....
IH1496/01 (b2e3)	.....t.....
IH1496/01 (b1d3)	.....t.....
IH1496/01 (b1c3)	.....t.....
IH1496/01 (a1b3)	.....t.....
IH2371/00 (c1a3)	.....
IH2371/00 (a2f2)	.....
IH1376/01 (b1a4)	.....

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ I rec/cORF-Sequenzen der untersuchten Fälle. Die Vergleichssequenz ist in der Kopfzeile angegeben. Punkte zeigen Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz, Austausch sind mit den Buchstaben der entsprechenden Base gekennzeichnet, Leerzeichen zeigen eine Unterbrechung der Sequenz an. Die Sequenzen sind mit der Identifikationsnummer des Falls und in Klammern mit der Platte und dem Klon der entsprechenden Sequenzierungsreihe beschriftet. H99-1321=Melanom (LMM), IH1496/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, IH2371/00=Seminom, TIN, IH1376/01klarzelliges Nierenzellkarzinom. (Spleißmuster n. Armbruster et al. 2002)

**Abbildung 13** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2.HOM).

rec/cORF (HERV-K TypII (HML-2.HOM))	
TGTCGAAAAGAAAAGGGGGAAATGTGGGAAAACCAAGAGAGATCAGATTGTTACTGTGTGTAGAAAAGAAAGTAGACATAGGAGACTCCATTTTGTATTGTGCTAAGAA	
H99-1321 (a2d4)	.....C.a.....
H99-1321 (a1d4)	.....g.....t.....
IH1496/01 (b2f3)	
IH1496/01 (b2e3)	
IH1496/01 (b1d3)	.....a.....
IH1496/01 (b1c3)	.....a.....
IH1496/01 (a1b3)	.....a.....
IH2371/00 (c1a3)	.....C.....a.....
IH2371/00 (a2f2)	
IH1376/01 (b1a4)	.....a.....

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ I rec/cORF-Sequenzen der untersuchten Fälle. Die Vergleichssequenz ist in der Kopfzeile angegeben. Punkte zeigen Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz, Austausch mit den Buchstaben der entsprechenden Base gekennzeichnet, Leerzeichen zeigen eine Unterbrechung der Sequenz an. Die Sequenzen sind mit der Identifikationsnummer des Falls und in Klammern mit der Platte und dem Klon der entsprechenden Sequenzierungsreihe beschriftet. H99-1321=Melanom (LMM), IH1496/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, IH2371/00=Seminom, TIN, IH1376/01klarzelliges Nierenzellkarzinom. (Spleißmuster n. Armbruster et al. 2002)

**Abbildung 13** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2.HOM).

```

rec/cORF (HERV-K TypII (HML-2.HOM) )
AAATCTTCTGCCTTGAGATTCTGTT
H99-1321 (a2d4)
.....
H99-1321 (a1d4)
.....
IH1496/01 (b2f3)
IH1496/01 (b2e3)
.....
IH1496/01 (b1d3)
.....
IH1496/01 (b1c3)
.....
IH1496/01 (a1b3)
.....
IH2371/00 (c1a3)
.....
IH2371/00 (a2f2)
.....
IH1376/01 (b1a4)
.....

```

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ I rec/cORF-Sequenzen der untersuchten Fälle. Die Vergleichssequenz ist in der Kopfzeile angegeben. Punkte zeigen Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz, Austausch sind mit den Buchstaben der entsprechenden Base gekennzeichnet, Leerzeichen zeigen eine Unterbrechung der Sequenz an. Die Sequenzen sind mit der Identifikationsnummer des Falls und in Klammern mit der Platte und dem Klon der entsprechenden Sequenzierungsreihe beschriftet. H99-1321=Melanom (LMM), IH1496/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, IH2371/00=Seminom, TIN, IH1376/01klarzelliges Nierenzellkarzinom. (Spleißmuster n. Armbruester et al. 2002)

**Abbildung 14** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2.HOM).

n16451 REC/CORF (HERV-K TypII (HML-2.HOM))	ATGAAACCCATCGGAGATGCAAAAGAAAAGCACCTCCCGGGAGACGGAGACATCCCAATCGAGCACCGTTGACTCACAAAGATGAAACAAAATGGTGACGTCAGAAACAGATGA
IH1376/01 (b2b3)	.....C.....a.....
IH1376/01 (a1g3)	.....gg.....t.
IH1376/01 (a2h3)	.....gg.....t.
IH118/01 (Id1 (I+II), I18c1 (I+II))	.....gg.....t.
E12348/01 (a2c5)	.....gg.....t.
E12348/01 (a2d5)	.....gg.....t.
IH863/01 (c2)	.....C.....a.....
IH863/01 (d2)	.....C.....a.....
H01-0107 (1(g1+h1))	.....gg.....t.
H01-0107 (1e6)	.....gg.....t.

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ I rec/cORF-Sequenzen der untersuchten Fälle. Die Vergleichssequenz ist in der Kopfzeile angegeben. Punkte zeigen Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz, Austausch sind mit den Buchstaben der entsprechenden Base gekennzeichnet, Leerzeichen zeigen eine Unterbrechung der Sequenz an. Die Sequenzen sind mit der Identifikationsnummer des Falls und in Klammern mit der Platte und dem Klon der entsprechenden Sequenzierungsreihe beschriftet. IH1376/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, IH118/01=Seminom, E12348/01=duktales Mammakarzinom, IH863/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, H01-0107=Melanom (NMM).

**Abbildung 14** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2.HOM).

rec/cORF (HERV-K TypII (HML-2.HOM))	AGTTGCCATCCACCAAGAAGGCAGAGCCGCCAACTTGGGCACAACTAAAGAAGCTGACCGCAGTTAGCTACAAAATATCTAGAGAACACACAAAAGGTGACACAAAACCCCCAGAGAG
IH1376/01 (b2b3)	.....g.....
IH1376/01 (a1g3)	.....
Ih1376/01 /a2h3)	.....
IH118/01 (Id1 (I+II), I18c1 (I+II))	.....
E12348/01 (a2c5)	.....
E12348/01 (a2d5)	.....
IH863/01 (t3)	.....g.....
IH863/01 (d2)	.....t.....
H01-0107 (1(g1+h1))	.....
H01-0107 (1e6)	.....

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ I rec/cORF-Sequenzen der untersuchten Fälle. Die Vergleichssequenz ist in der Kopfzeile angegeben. Punkte zeigen Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz, Austausch sind mit den Buchstaben der entsprechenden Base gekennzeichnet, Leerzeichen zeigen eine Unterbrechung der Sequenz an. Die Sequenzen sind mit der Identifikationsnummer des Falls und in Klammern mit der Platte und dem Klon der entsprechenden Sequenzierungsreihe beschriftet. IH1376/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, IH118/01=Seminom, E12348/01=duktales Mammakarzinom, IH863/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, H01-0107=Melanom (NMM).



**Abbildung 14** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2.HOM).

rec/cORF (HERV-K TypII (HML-2.HOM))	TATGCTGCTTGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTG:::TCTGCAGGTGTACCCAACAGCTCCGAAGAGACAGCGACCATCGAGAACGGGCCATGATGACGATGGCGGTTTT
IH1376/01 (b2b3)	.....t
IH1376/01 (a1g3)	.....
IH1376/01 (a2h3)	.....
IH118/01 (Id1 (I+II), I118c1 (I+II))	.....C.....
E12348/01 (a2c5)	.....
E12348/01 (a2d5)	.....
IH863/01 (t3)	.....
IH863/01 (d2)	.....t
H01-0107 (1(g1+h1))	.....
H01-0107 (1e6)	.....

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ I rec/cORF-Sequenzen der untersuchten Fälle. Die Vergleichssequenz ist in der Kopfzeile angegeben. Punkte zeigen Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz, Austausch sind mit den Buchstaben der entsprechenden Base gekennzeichnet, Leerzeichen zeigen eine Unterbrechung der Sequenz an. Die Sequenzen sind mit der Identifikationsnummer des Falls und in Klammern mit der Platte und dem Klon der entsprechenden Sequenzierungsreihe beschriftet. IH1376/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, IH118/01=Seminom, E12348/01=duktales Mammakarzinom, IH863/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, H01-0107=Melanom (NMM).

**Abbildung XX Darstellung der Varianten der cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2.HOM).**

cORF (HERV-K TypII (HML-2.HOM))	
TGTCGAAAAGAAAAGGGGGAAATGTGGGGAAACCAAGAGAGATCAGATTGTTACTGTCTGTGTAGAAAAGTAGACATAGGAGACTCCCATTTTGTATTGTGCTAAGAA	
IH1376/01 (b2b3)	.....g.....a.....
IH1376/01 (a1g3)	.....C.....a.....
IH1376/01 (a2h3)	.....C.....a.....
IH118/01 (Id1 (I+II), I118c1 (I+II))	.....C.....a.....
E12348/01 (a2c5)	.....C.....a.....
E12348/01 (a2d5)	.....C.....a.....
IH863/01 (t3)	.....C.....a.....
IH863/01 (d2)	.....a.....
H01-0107 (1(g1+h1))	.....a.....
H01-0107 (1e6)	.....a.....

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ I cORF-Sequenzen der untersuchten Fälle. Die Vergleichssequenz ist in der Kopfzeile angegeben. Punkte zeigen Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz, Austausch sind mit den Buchstaben der entsprechenden Base gekennzeichnet, Leerzeichen zeigen eine Unterbrechung der Sequenz an. Die Sequenzen sind mit der Identifikationsnummer des Falls und in Klammern mit der Platte und dem Klon der entsprechenden Sequenzierungsreihe beschriftet. IH1376/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, IH118/01=Seminom, E12348/01=duktales Mammakarzinom, IH863/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, H01-0107=Melanom (NMM).

**Abbildung 14** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2.HOM).

```

rec/cORF (HERV-K TypII (HML-2.HOM) )
AAATTCCTTCGCCTTGAGATTCIGTT
IH1376/01 (b2b3)
.....
IH1376/01 (a1g3)
.....
IH1376/01 (a2h3)
.....
IH118/01 (Id1 (I+II+),I18c1(I+II))
.....
E12348/01 (a2c5)
.....
E12348/01 (a2d5)
.....
IH863/01 (t3)
.....
IH863/01 (d2)
.....
H01-0107 (1(g1+h1))
.....
H01-0107 (1e6)
.....

```

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ I rec/cORF-Sequenzen der untersuchten Fälle. Die Vergleichssequenz ist in der Kopfzeile angegeben. Punkte zeigen Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz, Austausch sind mit den Buchstaben der entsprechenden Base gekennzeichnet, Leerzeichen zeigen eine Unterbrechung der Sequenz an. Die Sequenzen sind mit der Identifikationsnummer des Falls und in Klammern mit der Platte und dem Klon der entsprechenden Sequenzierungsreihe beschriftet. IH1376/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, IH118/01=Seminom, E12348/01=duktales Mammakarzinom, IH863/01=klarzelliges Nierenzellkarzinom, H01-0107=Melanom (NMM).

**Abbildung 15** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2:HOM).

```

Nt6451 rec/cORF (HERV-K Typ II (HML-2:HOM))
ATGAAACCCATCGGAGATGCAAGAAAAGCACCTCCCGGGAGACGGAGACATCGCAATCGAGCACCGTTGACTCACAAGATGAAACAAAATGGTGACGTCAGAAACAGATGA
IH2469/98 (2/40)
.....gg.....a.....t.
IH2469/98 (2/45) → fremde Sequenz
.....gg.....a.....tgggagagcaccaggatgtttaaagcctgcagtcctccaaaattggttggtagaagtacctactgtcagtcctc
IH34/98 (3/52) → fremde Sequenz
.....atcactaaatgtcctaaataaagatgattttccagagaagaaaaatgcatgccaaagtgtcacctggcctataaaacaaatctaaatctacgctttaaac
IH120/98 (4/2)
.....gg.....a.....t.
IH120/98 (4/3)
.....gg.....a.....t.
IH996/98 (6/8)
.....gg.....a.....t.
IH1174/98 (8/2)
.....gg.....a.....t.
IH911/99 (9/12)
.....gg.....a.....t.
IH931/99 (10/5)
.....gg.....a.....t.
IH1216/99 (11/15)
.....gg.....a.....t.
IH1267/99 (12/6)
.....gg.....a.....t.

```

Die Abbildung zeigt die Varianten der rec/cORF-Sequenz bei verschiedenen Proben der einzelnen Entitäten. Die Vergleichssequenz befindet sich in der Kopfzeile. Austausch sind mit dem Buchstaben der Base angegeben, Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz ist durch Punkte angegeben, bei fehlenden Zeichen werden diese Teile nicht explimiert. Bei den sehr regelhaften Austauschen ab Base 6488 handelt es sich um unterschiedliche Spleißsequenzen. In Klammern ist hinter der Identifikationsnummern der Proben die Nummer des Klon und der Platte aus der Sequenzierung angegeben. IH2469/98=Mononukleose, 34/98=Immunozytom, 120/98=Lymphom (DLBCL), 996/98= Mantelzelllymphom, 1174/98=reaktiver Lymphknoten, 911/99=Plasmozytom, 931/99=B-Zelllymphom, 1216/99=pT-NHL, 1267/99=Follikelzentrumslymphom. (Splicingsites vergl. Armbruester et al. 2002)

**Abbildung 15** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2:HOM).

```

rec/cORF (HERV-K Typ II (HML-2:HOM) )
AGTTGCCATCCACCAAGAAGGCAGAGCCGCCAACTTGGGCACAACTAAAGAAGCTGACCGCAGTTAGCTACAAAAATATCTAGAGAACACACAAAACCCCCAGAGAG
IH2469/98 (2/40)

IH2469/98 (2/45)      ←
atcagtagattcacttatcacatg
IH34/98 (3/52)      ←
ccatcgcagcgcctcaaaaaacagaacacc
IH120/98 (4/2)

IH120/98 (4/3)

IH996/98 (6/8)

IH1174/98 (8/2)

IH911/99 (9/12)

IH931/99 (10/5)

IH1216/99 (11/15)

IH1267/99 (12/6)

```

Die Abbildung zeigt die Varianten der rec/cORF-Sequenz bei verschiedenen Proben der einzelnen Entitäten. Die Vergleichssequenz befindet sich in der Kopfzeile. Austausch sind mit dem Buchstaben der Base angegeben, Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz ist durch Punkte angegeben, bei fehlenden Zeichen werden diese Teile nicht exprimiert. In Klammern ist hinter der Identifikationsnummer der Proben die Nummer des Klons und der Platte aus der Sequenzierung angegeben. IH2469/98=Mononukleose, 34/98=Immunozytom, 120/98=Lymphom (DLBCL), 996/98= Mantelzelllymphom, 1174/98=reaktiver Lymphknoten, 911/99=Plasmozytom, 931/99=B-Zelllymphom, 1216/99=pT-NHL, 1267/99=Follikelzentrumslymphom. (Splicing sites vergl. Armbruester et al. 2002)

**Abbildung 15** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2:HOM).

rec/cORF (HERV-K Typ II (HML-2:HOM))	TATGCTGCTTGCAGCCTTGATGATTGTATCAATGGTG:::TCTGCAGGTGTACCCAACAGCTCCGAAGAGACAGCGACCATCGAGAACGGGCCATGATGACCATGGCGGTTTT
IH2469/98 (2/40)	.....
IH2469/98 (2/45)	.....
IH34/98 (3/52)	.....
IH120/98 (4/2)	.....
IH120/98 (4/3)	.....
IH996/98 (6/8)	.....
IH1174/98 (8/2)	.....
IH911/99 (9/12)	.....
IH931/99 (10/5)	.....
IH1216/99 (11/15)	.....
IH1267/99 (12/6)	.....

Die Abbildung zeigt die Varianten der rec/cORF-Sequenz bei verschiedenen Proben der einzelnen Entitäten. Die Vergleichssequenz befindet sich in der Kopfzeile. Austausch sind mit dem Buchstaben der Base angegeben, Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz ist durch Punkte angegeben, bei fehlenden Zeichen werden diese Teile nicht exprimiert. In Klammern ist hinter der Identifikationsnummer der Proben die Nummer des Klons und der Platte aus der Sequenzierung angegeben. IH2469/98=Mononukleose, 34/98=Immunozytom, 120/98=Lymphom (DLBCL), 996/98=Mantelzelllymphom, 1174/98=reaktiver Lymphknoten, 911/99=Plasmazytom, 931/99=B-Zelllymphom, 1216/99=pT-NHL, 1267/99=Follikelzentrumslymphom. (Splicing sites vergl. Armbruster et al. 2002)

**Abbildung 15** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2:HOM).

rec/cORF (HERV-K Typ II (HML-2:HOM))	TGTCGAAAAGAAAAGGGGAAATGTGGGAAAACCAAGAGAGATCAGATTGTTACTGTGTCTGTAGAAAAGAAAGTAGACATAGGAGACTCCCAATTTTGTATTGTGCTAAGAA
IH2469/98 (2/40)	.....g.....t.....
IH2469/98 (2/45)	.....t.....
IH34/98 (3/52)	.....
IH120/98 (4/2)	.....a.g.....C.....C...a..g.....
IH120/98 (4/3)	.....C.....C...a.....
IH996/98 (6/8)	.....a.....
IH1174/98 (8/2)	.....C...a.....
IH911/99 (9/12)	.....g.....C...a.....
IH931/99 (10/5)	.....C...a.....
IH1216/99 (11/15)	.....C...a.....
IH1267/99 (12/6)	.....C...a.....
.....C.....	.....C...a.....

Die Abbildung zeigt die Varianten der rec/cORF-Sequenz bei verschiedenen Proben der einzelnen Entitäten. Die Vergleichssequenz befindet sich in der Kopfzeile. Austausch sind mit dem Buchstaben der Base angegeben, Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz ist durch Punkte angegeben, bei fehlenden Zeichen werden diese Teile nicht exprimiert. In Klammern ist hinter der Identifikationsnummern der Proben die Nummer des Klon und der Platte aus der Sequenzierung angegeben. IH2469/98=Mononukleose, 34/98=Immunozytom, 120/98=Lymphom (DLBCL), 996/98= Mantelzelllymphom, 1174/98=reaktiver Lymphknoten, 911/99=Plasmozytom, 931/99=B-Zelllymphom, 1216/99=pT-NHL, 1267/99=Follikelzentrumslymphom. (Splicing sites vergl. Armbruester et al. 2002)

**Abbildung 15** Darstellung der Varianten der rec/cORF-Sequenzen im Vergleich zu HERV-K Typ II (HML-2:HOM).

```

rec/cORF (HERV-K Typ II (HML-2.HOM) )
AAATTCCTTCGCCTTGAGATTCIGTT
IH2496/98 (2/40)
.....
IH2496/98 (2/45)
.....
IH34/98 (3/52)
.....
IH120/98 (4/2)
.....
IH120/98 (4/3)
.....
IH996/98 (6/8)
.....
IH1174/98 (8/2)
.....
IH911/99 (9/12)
.....
IH931/99 (10/5)
.....
IH1216/99 (11/15)
.....
IH1267/99 (12/6)
.....

```

Die Abbildung zeigt die Varianten der rec/cORF-Sequenz bei verschiedenen Proben der einzelnen Entitäten. Die Vergleichssequenz befindet sich in der Kopfzeile. Austausch sind mit dem Buchstaben der Base angegeben, Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz ist durch Punkte angegeben, bei fehlenden Zeichen werden diese Teile nicht exprimiert. In Klammern ist hinter der Identifikationsnummern der Proben die Nummer des Klons und der Platte aus der Sequenzierung angegeben.

IH2469/98=Mononukleose, 34/98=Immunozytom, 120/98=Lymphom (DLBCL), 996/98= Mantelzelllymphom, 1174/98=reaktiver Lymphknoten, 911/99=Plasmozytom, 931/99=B-Zelllymphom, 1216/99=pT-NHL, 1267/99=Follikelzentrumlymphom. (Splicingsites vergl. Armbruester et al. 2002)



## 5 Diskussion

### 5.1 Endogene Retroviren als Karzinogene

Für eine Vielzahl von Tumoren des Menschen ist eine Assoziation mit der Infektion des Organismus durch eines der bekannten potentiell onkogenen exogenen Viren belegt. Daneben gibt es Hinweise darauf, dass die Karzinogenese beim Menschen auch durch die Aktivierung und damit Expression endogener Retroviren beeinflusst werden kann.

Der Nachweis der HERV-K-spezifischen Genprodukte gag und env in Zellen testikulärer und ovarieller Keimzelltumoren, uteriner Chorionkarzinome und testikulärer CIS/TIN (Herbst et al., 1996) sowie der Nachweis korrespondierender Antikörper im Serum der Patienten mit solchen Tumoren (Sauter et al., 1996) weisen auf eine Verbindung zwischen der transkriptionellen Aktivierung von HERV-K Proviren einerseits und dem Auftreten dieser Tumoren andererseits hin. Untersuchungen, die sich mit dem Nachweis des HERV-K-Proteins np9 befassten, zeigten eine Expression des HERV-K auch in Mammakarzinomen und Lymphozyten leukämischen Bluts (Armbruster et al., 2002). Die weiterhin untersuchten gesunden adulten, embryonalen und plazentaren Gewebeproben sowie Prostatakarzinome wiesen im Empfindlichkeitsbereich der jeweils eingesetzten Methoden keine Expression des HERV-K auf. Damit scheint die Expression des HERV-K auf einige wenige Tumorentitäten beschränkt zu sein.

Diese bisher bekannten Befunde bekräftigen die Hypothese einer Beteiligung des HERV-K an der Karzinogenese bestimmter menschlicher Tumoren durch Aktivierung und Expression seiner Genprodukte. Diese Genprodukte könnten Einfluss nehmen auf intrazelluläre Stoffwechselforgänge und Signalwege. Dabei könnten ähnliche Mechanismen eine Rolle spielen, die bereits aus den Untersuchungen mit exogenen Viren und ihrer Beteiligung an Karzinogenese bekannt sind.

Um allerdings zu diesem Punkt der Untersuchungen zu gelangen, müssen zunächst die bisher bekannten und im Rahmen einer anderen Untersuchungsmethode eventuell neu hinzutretende Genprodukte verifiziert werden und ihre Verteilung auf die verschiedenen Tumorentitäten geklärt werden. Für diesen Nachweis ist die Methode der RT-PCR besonders geeignet, da sie sehr sensitiv auch extrem geringe Transkriptspiegel nachzuweisen vermag. Dieser Aufgabe hat sich diese Arbeit gewidmet, indem sie mit

Hilfe der RT-PCR folgenden Fragen nachging: läßt sich rec/cORF in Keimzelltumoren nachweisen? Läßt sich rec/cORF auch in anderen Tumorentitäten nachweisen? Kommt es bei der Expression zu Spleißvarianten und dementsprechend zu bestimmten Entitäten-spezifischen Expressionsmustern?

Der Fragekomplex konnte hier eindeutig beantwortet werden: rec/cORF wurde regelmäßig in Keimzelltumoren exprimiert. Daneben ließ sich rec/cORF auch in Nierengeweben und Melanomen nachweisen. Bei Lymphknoten, Mammageweben und Hirntumoren wurden Spleißvarianten des rec/cORF exprimiert. Insgesamt stellten sich entitätenspezifische Expressionsgrundmuster dar: testikuläre Keimzelltumoren exprimierten meist np9 (250bp), eine Bande von 300bp und eine Bande von 400bp Länge sowie rec/cORF (450bp); Lymphknotengewebe wiesen überwiegend nur np9 (250bp) auf; Mammagewebe und Hirntumore exprimierten hauptsächlich np9 (250bp) und eine kleinere Bande von 235bp Länge, ebenso verhielt es sich mit den Nierengeweben und den Melanomen. Zusätzlich zu diesem Grundmuster traten häufig Banden anderer Länge auf, wobei es sich dabei meist um Banden von 300bp oder 400bp Länge handelte. Nur in der Gruppe der Mammagewebe (und bei einem einzigen Melanom) kam es auch zur Expression einer 260bp langen Bande, und nur in der Gruppe der Nierengewebe und der Melanome ließen sich Banden von 500bp, 550bp und 600bp Länge nachweisen. Die Sequenzanalysen bewiesen, dass es sich bei den dargestellten Banden tatsächlich um HERV-K-spezifische Sequenzen handelte. Dabei kam es zur Expression von HERV-K Typ 1 und HERV-K Typ 2, HERV-K(HML-2) und HERV-K(HML-2.HOM). HERV-K Typ 1 konnte in verschiedene Subtypen unterteilt werden, nämlich HERV-KII, HERV-K 101 und HERV-K102. (Diese Subtypen unterscheiden sich durch unterschiedliche Donor-/Akzeptorsequenzen.) Die unterschiedlichen HERV-K-Typen konnten außerdem unterschiedlichen Genorten und Chromosomen zugeordnet werden (Chromosom 1, 5, 7, 12 und 22, wobei Chromosom 1 zwei verschiedene Genloci trug).

Die Ergebnisse bekräftigen die Hypothese einer Assoziation zwischen der Genese der untersuchten Tumorentitäten und der Expression des HERV-K. Die Expression scheint dabei gewebespezifisch determiniert zu sein. Daraus ergeben sich im Wesentlichen drei übergeordnete Problemkomplexe: die Funktion der HERV-K-Genprodukte, die

Regulation ihrer Expression und schließlich die Rolle der Immunabwehr des Organismus.

## **5.2 HERV-K-Genprodukte und ihre Interaktionspartner**

### **5.2.1 Promyelozyten-Leukämie-Zinkfinger-(PLZF)-Protein**

Zunächst stellt sich die Frage, auf welche Weise die retroviralen Genprodukte in die Stoffwechselforgänge der Zelle eingreifen und so eine Entartung der Zelle begünstigen, oder ob es im Gegensatz dazu erst im Rahmen einer schon vollzogenen Entartung zur Expression der HERV-K-spezifischen Produkte kommt. Die beiden Schlüsselproteine sind in diesem Zusammenhang offenbar das np9 und das p15<sup>rec/cORF</sup>, die durch besonders regelmäßige Expression auffallen. Das p15<sup>rec/cORF</sup> enthält eine das Promyelozyten-Leukämie-Zinkfinger (PLZF)-Protein bindende Domäne. Das PLZF-Protein ist als Partner des RAR $\alpha$  in Genfusionen in einer Variante der Akuten Promyelozytischen Leukämie (APL) gefunden worden.

Das PLZF-Gen ist eines von fünf Genen, die mit dem Retinolsäure-Rezeptor-alpha (RAR $\alpha$ )-Gen fusionieren können. Eine solche Fusion ist ein Charakteristikum der APL (Chen et al., 1993). Durch diese Genfusion entsteht das Fusionsprotein PLZF-RAR $\alpha$ . Damit wird die eigentliche Funktion des im Nukleus lokalisierten PLZF-Proteins, nämlich mit Hilfe von Co-Repressoren wie N-CoR oder SMRT (Hong et al., 1997; He et al., 1998) die Repression des Zellzyklus hämatopoetischer Vorläuferzellen zu vermitteln, stark beeinträchtigt, was wiederum das Auftreten einer malignen Entartung der Zellen begünstigt. Inzwischen wird für das PLZF-Protein auch ein Zusammenhang mit der Differenzierung von Stammzellen gesehen.

Eine neue Studie von Buaas et al., 2004 zu diesem Thema geht von homozygoten luxoiden mutierten Mäusen aus. Diese in den 1950er Jahren zuerst beschriebene, spontane Mutation zeichnete sich zunächst durch Abnormalität der Gliedmaßen und des Skeletts sowie männliche Infertilität aus. Zunächst wurden die Hoden 8 Monate alter, männlicher, für die Mutation homozygoter Mäuse histologisch untersucht. Dabei zeigten sich Tubuli seminiferi, die keine Gameten sondern nur somatische Sertoli-Zellen enthielten, und in einigen Tubuli seminiferi fehlten eine oder mehr Generationen der Stammzellen. Manche Abschnitte enthielten zudem elongierte Spermatozoen, jedoch

keine in ihrer Entwicklung jüngeren Stammzellen. In weitergehenden Kolonisierungsversuchen konnte jedoch bewiesen werden, dass die somatischen Zellen in den Hoden der homozygoten Mutanten eine Spermatogenese bei implantierten Wildtyp-Stammzellen unterstützen, so dass sich die Mutation direkt auf die Stammzellen auswirken mußte. Nachfolgende Sequenzanalysen des durch die Mutation betroffenen Genabschnitts zeigten, dass in diesem Genabschnitt PLZF enthalten war. PLZF besitzt normalerweise 9 Sequenz-spezifische DNA-bindende Zinkfinger-Domänen (vom Krüppeltyp; Li et al., 1997) und die sogenannte BTB/POZ-Domäne, die Selbstassoziation und Protein-Protein-Interaktion vermittelt (Bardwell et al., 1994). Durch die Mutation fehlten dem exprimierten Protein alle 9 Zinkfinger-Domänen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz gelang zusätzlich der Beweis, dass PLZF in Stammzellen exprimiert wird. Da außerdem eine gezielte Ausschaltung des PLZF zu Defekten am Skelett und zu Infertilität führte, wie sie bei der homozygoten luxoiden Mutation zu beobachten sind, schien der unvollständig exprimierte PLZF ursächlich für den bei der luxoiden Mutation auftretenden Phänotypen zu sein. Bei einem Vergleich des Zellzyklus von Wildtypspermatogonien und Spermatogonien luxoider Mutanten konnte jedoch kein Unterschied des Ablaufs dargestellt werden, so dass dies als Ursache für die Phänotypen ausgeschlossen werden konnte. Es erschien vielmehr wahrscheinlich, dass PLZF Stammzellen in ihrem undifferenzierten Stadium konservierte und ein Funktionsausfall des PLZF das Gleichgewicht zur vermehrten Differenzierung der Stammzellen verschob (Buaas et al., 2004).

Eine zweite Studie zu diesem Thema von Costoya et al., 2004 kam zu ähnlichen Ergebnissen. Die Autoren stellten zunächst fest, dass PLZF in den Gonaden männlicher Mäuse sowohl während der Embryonalzeit, als auch nach der Geburt exprimiert wurde. Das Maximum der Expression wurde eine Woche nach der Geburt erreicht. Zu diesem Zeitpunkt traten die bisher im Zellzyklus ruhenden Gonozyten in eine Phase der Proliferation über. Danach sank der PLZF-Spiegel wieder ab, bis sich die Expression schließlich nur noch auf wenige Spermatogonien beschränkte. Um herauszufinden, welche der Spermatogonien PLZF-Protein exprimierten, wurde die gleichzeitige Expression von PLZF-Protein und Zyklin D1 bzw. Zyklin D2 untersucht. Die beiden Zykline stellten Marker für mitotische Aktivität bzw. für den Übergang aus der ruhenden Phase in die A1-Phase dar. Dabei zeigte sich, dass PLZF-Protein nur in

Zyklin-negativen Spermatogonien exprimiert wurde. Die PLZF-Expression war demnach typisch für ruhende, nicht differenzierende Spermatogonien, bei denen es sich damit um Vorläuferstammzellen handelte. Im Rahmen der histologischen Untersuchungen wurde deutlich, dass bei homozygot PLZF-negativen Mäusen zwar das Durchlaufen des gesamten Prozesses der Spermatogenese möglich war, dass aber die Gesamtzahl der Spermien schließlich geringer war als bei Kontrollmäusen. Außerdem zeigte sich in den Tubuli zwar bis zur zweiten Woche eine unverminderte Proliferation, ab der zweiten Woche jedoch zeigte sich eine fortschreitende Degeneration der Tubuli mit abnehmenden Zahlen proliferierender Spermatogonien. Diese Beobachtung legte nahe, dass es während einer Inaktivierung des PLZF-Gens bzw. -Proteins zunächst zu einem explosionsartigen Ausbruch der Proliferation kommt, diese aber zu einer raschen Erschöpfung des Zellvorrats führt. Die Bedeutung von PLZF läge demnach in der Erhaltung des Stammzellkompartments. Dies belegte auch das beobachtete Repopulationsdefizit von spermatogonischen Stammzellen aus homozygot PLZF-negativen Mäusen bei Transplantationsversuchen. Schließlich zeigte sich in Untersuchungen mit cDNA-Microarrays eine gestörte Expression durch PLZF regulierter Gene, darunter Gene für den Metabolismus, RNA-Bindung, Kontrolle des Zellzyklus, Zytoskelett, Zellkontakte und Transkriptionsfaktoren. Diese Studie machte somit deutlich, dass PLZF einerseits für den Erhalt der Stammzellen unerlässlich war und andererseits seine Inaktivierung bei Spermatogonien zu einem unregulierten Ausbruch aus der ruhenden Phase bei gleichzeitig verminderter apoptotischer Aktivität führte (Costoya et al., 2004).

### **5.2.2 Testes-Zinkfinger-Protein (TZFP)**

In enger Beziehung zu PLZF steht das Testes-Zinkfinger-Protein (TZFP). Es wird vor allem in den Hoden exprimiert und besitzt ebenfalls eine BTB/POZ-Domäne sowie drei PLZF-ähnliche Zinkfinger (Lin et al., 1999). Im Rahmen einer Studie von Tang et al. 2001 stellte sich heraus, dass TZFP sequenzspezifisch an einen Abschnitt im Gen der Proteinkinase AIE1 binden und damit eventuell die Transkription von Genen beeinflussen konnte. Außerdem erschien es im Rahmen der Untersuchungen wahrscheinlich, dass bei Verschmelzung mit einer heterologen Domäne die C-terminale Zinkfingerdomäne des TZFP als spezifischer transkriptioneller Transaktivator fungieren

konnte. Für die BTB/POZ-Domäne am N-terminalen Ende konnte währenddessen eine Repressoraktivität gezeigt werden. Zudem war die Aminosäuresequenz des TZFP identisch mit der des Fanconi Anämie Zinkfingers (FAZF) und des Repressors des GATA (ROG). Während FAZF mit dem Fanconi Anämie Protein C interagiert (Hoatlin et al., 1999), wird ROG mit der Regulation der Differenzierung und Aktivierung von T-Helferzellen in Zusammenhang gebracht. In Anbetracht der Identität der Aminosäuresequenzen könnte daher bezüglich des TZFP über die gleichen Interaktionen spekuliert werden. Auf Grund weiterer Sequenzanalysen ist zudem denkbar, dass TZFP ebenfalls an den IL-3R-Promotor und den lex A-Operator bindet (Tang et al., 2001).

Es wird deutlich, wie vielfältig die Auswirkungen von PLZF und TZFP auf zelluläre Stoffwechselfvorgänge und Regulationsmechanismen sind. Dieses sensible Regulationsgleichgewicht der Zelle kann durch ein Protein wie  $p15^{\text{rec/cORF}}$  empfindlich gestört werden. Indem es zum Beispiel an PLZF-Protein bindet, kann dessen Bindungsfähigkeit zu seinen Bindungspartnern verändert, vermindert oder womöglich aufgehoben werden. In der Folge kommt es dann zu der oben erläuterten Dysregulation zum Beispiel der Stammzellproliferation. Eine solche Dysregulation kann zusammen mit weiteren Faktoren an der Karzinogenese beteiligt sein. Dieser Mechanismus erinnert an die Wirkungsweisen exogener, potentiell onkogener Viren. Daher ist es wichtig, derartige Kausalketten in Zusammenhang mit HERV-K zu verstehen. Für  $p15^{\text{rec/cORF}}$  ist die Interaktion mit PLZF bereits beschrieben. Zusätzlich ist eine Interaktion zwischen  $p15^{\text{rec/cORF}}$  und TZFP sehr wahrscheinlich wegen der großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen PLZF und TZFP. Die Auswirkungen dieser Interaktion auf Stoffwechselfvorgänge und Genexpression innerhalb der Zellen (sowohl Tumorzellen als auch Zellen gesunder Vergleichsgewebe) sind noch zu überprüfen.

Eine Bindung eines der beiden Proteine an np9 ist jedoch nahezu ausgeschlossen, da np9 eine Deletion von 292bp enthält, die genau die PLZF-bindende Sequenz beinhaltet. Demnach wird es für np9 einen separaten Bindungspartner geben, der noch zu benennen ist und dessen Bedeutung noch dargestellt werden muss. Dies gilt im nächsten Schritt auch für die neu aufgetretenen selteneren Banden. Sie müssen zunächst als exprimierte Proteine des HERV-K benannt werden, ehe sie dann hinsichtlich ihrer Auswirkungen innerhalb einer Zelle untersucht werden können.

### 5.3 Gewebespezifische Expression

Neben den Auswirkungen der exprimierten HERV-K-Produkte ist zu klären, wie es überhaupt zu diesen verschiedenen Produkten in den verschiedenen Tumorentitäten kommt. Dabei ist einerseits die Frage nach der Genese der verschiedenen Banden zu stellen, andererseits sind mögliche Regulationsmechanismen zu hinterfragen. Wie bereits dargelegt, zeigte sich für jede Tumorentität ein Expressionsgrundmuster, zu dem gelegentlich weitere Banden beziehungsweise Genprodukte hinzutreten. Die bisher bekannten Proteine rec/cORF und np9 stammen von unterschiedlichen HERV-K-Typen und beruhen auf unterschiedlichen Donor-/Akzeptorsequenzen für die Transkription (Armbruster et al., 2002). Die hier vorgelegten Sequenzanalysen zeigen jedoch, dass die nachgewiesenen Genprodukte verschiedenen HERV-K-Providiren zugeordnet werden können (HERV-K101, HERV-KII, HERV-K102 aus der Gruppe HERV-K Typ 1, HERV-K Typ 2 sowie HERV-K(HML-2) und HERV-K(HML-2.HOM)). Diese Providiren unterscheiden sich wie HERV-K Typ 1 und Typ 2 durch ihre Donor-/Akzeptorsequenzen (Armbruster et al., 2002). Die einzelnen Providiren mit ihren spezifischen Donor-/Akzeptorbereichen befinden sich außerdem auf unterschiedlichen Chromosomen (Chromosom 1, Chromosom 5, Chromosom 7, Chromosom 12 und Chromosom 22). Man könnte nun zunächst annehmen, dass es bei der Aktivierung des HERV-K in Abhängigkeit vom umgebenden Gewebe zu einer Aktivierung eines bestimmten Provirus auf einem bestimmten Chromosom kommt. Da in den meisten Fällen aber mehrere HERV-K-Genprodukte nebeneinander auftraten, müßte es innerhalb einer Tumorzelle zu einer gleichzeitigen Aktivierung mehrerer Providiren kommen. Die Expressionsmuster der Tumorentitäten kämen dann durch die Aktivierung einer festen Kombination aus Providiren zustande. Dieser Vorgang ist sehr kompliziert und erscheint daher unwahrscheinlich. Es ist vielmehr anzunehmen, dass es zum alternativen Spleißen einer Sequenz kommt. Die Ergebnisse dieses Spleißprozesses können hinsichtlich der Gensequenz natürlich trotzdem einzelnen Providiren und Chromosomen zugeordnet werden.

Wie kommt es aber nun dazu, dass in verschiedenen Gewebeentitäten verschiedene Spleißvorgänge stattfinden und noch dazu eine Expression in unterschiedlichem Ausmaß geschieht, d.h. dass schwach, mittelgradig und kräftig ausgebildete Banden entstehen? Dieses Phänomen könnte mit gewebespezifischen Botenstoffen oder

Proteinen zusammenhängen, die in die Transkriptionsvorgänge des HERV-K eingreifen oder als Bindungspartner für HERV-K-Transkripte dienen. Das Ausmaß der Transkription dieser Modulatoren könnte dann auch auf das Ausmaß der Transkription der HERV-K-Genprodukte Einfluss nehmen. Eine niedrige Konzentration eines gewebespezifischen HERV-K-Bindungspartners (zum Beispiel PLZF) erforderte zum Beispiel auch nur eine geringe Expressionsrate des entsprechenden HERV-K-Genproduktes (zum Beispiel rec/cORF) und umgekehrt. Durch solche Interaktionen ließe sich somit sowohl die Gewebespezifität als auch die Expressionsrate der HERV-K-Transkripte erklären. In der weiteren Forschungsarbeit müssen also neben den bereits oben erwähnten Interaktionspartnern auch die Zusammenhänge zwischen der Expressionsrate der HERV-K-Genprodukte und der Expressionsrate ihrer Interaktionspartner geklärt werden. Diese Untersuchungen könnten dann vielleicht auch Hinweise geben, aus welchem Grund es überhaupt zu einer Aktivierung des HERV-K kommt. Denn laut früheren Untersuchungen (siehe oben) ist eine Expression des HERV-K in gesunden Geweben nicht regelhaft vorhanden. Wenn dies tatsächlich so ist, muss es einen Auslöser für die Expression des HERV-K geben. Denkbar wäre jedoch auch der gewissermaßen umgekehrte Kausalzusammenhang. Man könnte nämlich auch davon ausgehen, dass HERV-K-Genprodukte über ihre Interaktion mit zellulären Botenstoffen zum Beispiel an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind und dass HERV-K daher regelhaft in gesunden Zellen exprimiert wird - allerdings mit einer so geringen Expressionsrate, dass ein Nachweis mit den bisherigen Methoden nicht erfolgen konnte. Erst die Entartung einer Zelle würde dann eine übermäßige und damit meßbare Expression des HERV-K verursachen. Unter der Vorstellung, dass der Erhalt der HERV-K-Sequenzen im Genom des Menschen im Laufe der Evolution einen Vorteil bedeutet haben muss, sollte diese Hypothese nicht ganz außer Acht gelassen werden.

#### **5.4 Modulation der Immunantwort durch HERV-K-Genprodukte?**

Ein bisher unbeachtet gebliebener Aspekt ist die Immunabwehr des Organismus im Rahmen der malignen Erkrankung. Die Expression eines Virus in einer Zelle führt normalerweise zu einer Präsentation fremder Peptide an der Zelloberfläche, so dass es zu einer Bindung an T-Lymphozyten und damit zu einer Aktivierung der Immunabwehr



kommt. Die durch das Virus befallene Zelle kann dann eliminiert werden. Einige Bakterien und Viren umgehen diesen Mechanismus jedoch mit Hilfe eines sogenannten Superantigens. Ein Superantigen bindet an T-Zellen, die variable Gene für die Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors exprimieren (abgekürzt TCRBV-Gene). Auf diese Weise aktiviert das Superantigen nicht eine kleine, spezifische Population von T-Zellen, sondern eine riesige Anzahl unspezifischer T-Zellen. Die daraus resultierende Immunantwort ist zwar überschießend, aber nicht effizient gegenüber dem eigentlichen Virus.

Im Zusammenhang mit Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) konnte eine solche Superantigenaktivität gezeigt werden (Sutkowski et al., 1996). Allerdings konnte keine entsprechende Sequenz im Genom des EBV gefunden werden, so dass angenommen werden mußte, dass EBV ein endogenes Superantigen zur Expression bringt. Sequenzanalysen zeigten, dass innerhalb eines durch EBV transformierten Gens auch HERV-K18 kodiert ist. Für das Protein „env“ einer Variante dieses HERV-K18 war bereits eine Superantigenaktivität bekannt. Daher nahm man an, dass auch das env-Protein des HERV-K18 Superantigenaktivität besitzen könnte. Tatsächlich konnte dargestellt werden, dass HERV-K18 env-Allele und das mit EBV assoziierte Superantigen T-Zellen mit den gleichen TCRBV-Genen stimulierten und so zu einer stark ausgeprägten T-Zellproliferation führten. Diese Proliferation der T-Zellen konnte mit Hilfe eines Serums gegen env blockiert werden. Außerdem wurde in EBV-negativen Zellen ein Anstieg der HERV-K18 env-Transkription nach Infektion der Zellen mit dem EBV nachgewiesen. Diese Daten legten nahe, dass HERV-K18 env ein Superantigen darstellt und eine polyklonale T-Zellproliferation bedingen kann (Sutkowski et al., 2001).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass auch in den untersuchten Tumorzellen HERV-K env als Superantigen exprimiert wird. Die daraus resultierende überschießende Proliferation unspezifischer T-Zellen könnte dann die spezifische Elimination der Tumorzellen verhindern und ein ungestörtes Wachstum der Tumorzellen ermöglichen. Der Beweis für solche Interaktionen zwischen HERV-K-Transkripten und Mechanismen der Immunabwehr steht allerdings noch aus und stellt sicherlich einen interessanten Punkt in der weiteren Arbeit dar.

## 6 Anhang

**Tabelle 8** Diagnosen und klinische Angaben der verwendeten Gewebeproben

Nr. Proben-Nr.		G	A	Diagnose
<b>GCT</b>				
1	IH 412/01	M	52	Seminom, TIN
2	IH 3022/00	M	44	Seminom
3	IH 2371/00	M	30	Seminom, TIN
4	IH 2196/00 II	M	47	embryonales Karzinom
5	IH 2503/00	M	19	Teratokarzinom, TIN
6	IH 2561/00	M	28	ausgeprägte TIN, kein invasiver Tumor
7	IH 2510/00	M	37	embryonales Karzinom, reifes und unreifes Teratom
8	IH 2846/00	M	36	Seminom (s.2844/00 als 2. Entnahme!)
9	IH 2874/00	M	?	Mischtumor: Seminom, Chorionkarzinom, Dottersacktumor, reifes Teratom
10	IH 905/00 II	M	28	ausgedehnte TIN
11	IH 2164/00 I	M	39	unreifes Teratom, Seminom, embryonales Karzinom
12	IH 1351/00	M	36	embryonales Karzinom
13	IH 717/00	M	22	embryonales Karzinom, Chorionkarzinom
14	IH 374/00	M	26	TIN, reifes Teratom
15	IH 330/01	M	44	Seminom
16	IH 66/01	M	25	Seminom
17	IH 144/01	M	29	Seminom
18	IH 406/00 II	M	57	Seminom, TIN
19	IH 2798/00 re	F	12	Ductus deferens, Nebenhoden, kein Tumor (s. Zeile 28!)
20	IH 406/00 I	M	57	Seminom, TIN
21	IH 279/01	M	20	ausgebrannter Tumor, TIN
22	IH 118/01	M	45	Seminom
23	IH 2844/00	M	36	Seminom
24	IH 2028/00	M	41	Seminom
25	IH 1391/00	M	59	embryonales Karzinom, Chorionkarzinom
26	IH 2330/00 III	M	80	hochmalignes B-Zell-Non-Hogkin-Lymphom
27	IH 2653/00	M	13	älterer kompletter Infarkt, zellarm, Sklerose, kein Tumor
28	IH 2798/00 li	M		Ductus deferens, Nebenhoden, kein Tumor (s. Zeile 19!)
29	IH 2479/99	M	30	embryonales Karzinom, Dottersacktumor, reifes und unreifes Teratom
30	IH 592/00	M	46	regressiv verändertes Seminom, TIN
31	IH 112/00	M	59	Seminom
<b>Lymphatische Läsionen</b>				
32	IH 953/99	M	11	anaplastisches großzelliges Lymphom
33	IH 1969/99	M	74	follikuläres Lymphom
34	IH 1513/99	M	55	Plasmozytom
35	IH 2469/98	M	17	EBV-assoziierte Lymphadenitis
36	IH 16/99	M	55	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

37	IH 79/98	F	12	Burkitt-Lymphom
38	IH 115/98	F	63	follikuläres Lymphom
39	IH 140/99	F	84	Burkitt-Lymphom
40	IH 969/99	F	31	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
41	IH 648/98	F	69	granularzelliges T-Zell-Lymphom/T-CLL
42	IH 1092/98	m	32	anaplastisches großzelliges Lymphom, T-Typ
43	IH 15/99	F	58	follikuläres Lymphom
44	IH 177/98	m	5	anaplastisches großzelliges Lymphom
45	IH 1450/99	m	64	follikuläres Lymphom
46	IH 2474/98	F	57	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
47	IH 1174/98	F	20	Hyperplasie des Lymphknotens
48	IH 996/98	m	58	Mantelzell-Lymphom
49	IH 120/98	m	82	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
50	IH 34/98	m	63	Immunozytom
51	IH 1030/98	m	58	Hyperplasie des Lymphknotens
52	IH 1267/99	F	57	follikuläres Lymphom
53	IH 1279/99	m	50	follikuläres Lymphom
54	IH 1216/99	m	62	peripheres T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
55	IH 931/99	m	55	Chronische lymphatische Leukämie der B-Zellreihe
56	IH 911/99	m	59	Plasmozytom
57	IH 1134/99	F	5	Chronische lymphatische Leukämie der B-Zellreihe
58	IH 1238/99	m	68	Chronische lymphatische Leukämie der B-Zellreihe

### **Mammagewebe**

59	E 16637/01	F	87	invasives muzinöses Mammakarzinom,
60	E 7605/01	F	48	mischdifferenziertes Mammakarzinom, DCIS
61	E 5558/01	F	45	fibrozystische Mastopathie, duktales Hyperplasie, Papillomatose
62	E 6754/01	F	53	Fibrose, kein Tumor
63	E 6755/01	F	56	Fibrose, kein Tumor
64	E 5258/01	F	63	invasives duktales Mammakarzinom
65	E 12080/01	f	67	mischdifferenziertes Mammakarzinom
66	E 12348/01	f	56	invasives duktales Mammakarzinom
67	IH 2741/00	f	45	invasives duktales Mammakarzinom, DCIS
68	IH 2756/00	f	62	invasives duktales Mammakarzinom
69	IH 1166/01	f	47	invasives duktales Mammakarzinom
70	IH 1172/01	f	56	mischdifferenziertes Mammakarzinom, atypische lobuläre Hyperplasie
71	IH 1185/01	f	49	fibröse Mastopathie

### **Hirntumoren**

72	TB 74	M	46	Glioblastom
73	TB 110	F	62	Glioblastom
74	TB 152	M	71	Glioblastom
75	TB 155	M	49	Glioblastom
76	TB 105	M	61	Glioblastom
77	TB 27	F	43	anaplastisches Astrozytom
78	TB 34	M	34	Glioblastom
79	TB 71	M	54	anaplastisches Astrozytom
80	TB 26	M	58	Glioblastom
81	TB 132	M	55	Glioblastom

82	TB 80	M	59	Glioblastom
83	TB 154 I	M	73	Glioblastom
84	TB 135	M	70	Glioblastom
85	TB 102	M	67	anaplastisches Astrozytom
86	TB 83	M	65	Glioblastom
87	TB 59	F	17	Germinom

### **Nierengewebe**

88	IH 1378/01	F	64	xanthogranulomatöse Pyelonephritis
89	IH 1062/01	M	47	Nierenzellkarzinom
90	IH 820/01	F	58	Onkozytom
91	IH 1376/01	F	76	klarzelliges Nierenzellkarzinom
92	IH 1304/01	M	60	klarzelliges Nierenzellkarzinom
93	IH 817/01	M	64	Nierenzellkarzinom
94	IH 1186/01	F	67	Urothelkarzinom
95	IH 1184/01	M	47	klarzelliges Nierenzellkarzinom
96	IH 770/01	M	65	Nierenzellkarzinom
97	IH 969/01	F	66	klarzelliges Nierenzellkarzinom
98	IH 1302/01	M	54	klarzelliges Nierenzellkarzinom
99	IH 863/01	M	61	klarzelliges Nierenzellkarzinom
100	IH 1496/01	M	63	klarzelliges Nierenzellkarzinom
101	IH 822/01	M	63	klarzelliges Nierenzellkarzinom

### **Melanom**

102	H 99-1321	F	71	Lentigo-maligna-Melanom
103	H 99-2113	F	91	noduläres Melanom
104	H 01-0322	M	39	superfiziell spreitendes Melanom
105	H 01-0710	F	38	noduläres Melanom
106	H 01-0107	M	70	noduläres Melanom
107	H 99-1352	F	66	Melanom
108	H 01-0842	M	85	superfiziell spreitendes Melanom
109	H 01-0554	M	51	superfiziell spreitendes Melanom
110	H 01-0493	F	43	Lentigo-maligna-Melanom
111	H 01-0794	M	54	superfiziell spreitendes Melanom
112	H 99-1608	F	72	superfiziell spreitendes Melanom
113	H 01-0466	F	53	Lentigo-maligna-Melanom
114	H 01-0685	F	71	superfiziell spreitendes Melanom

Die Gewebeproben sind mit einer fortlaufenden Nummer (Spalte „Nr.“; GCT=Gruppe der testikulären Keimzelltumoren) und der Identifikationsnummer (Spalte „Proben-Nr.“) aus der jeweiligen Klinik versehen. In der Spalte „G“ befindet sich das Geschlecht des jeweiligen Patienten. In der Spalte „A“ ist das Alter des Patienten bei Probeentnahme aufgeführt. Die Spalte „Diagnose“ zeigt die Diagnose nach histopathologischer Untersuchung.

**Tabelle 9** Ergebnisse der  $\beta$ -Actin-PCR

<b>Nr. Proben-Nr. Diagnose</b>			<b>Ergebnis</b>
<b>Hodengewebe</b>			
1	IH 412/01	Seminom, TIN	positiv
2	IH 3022/00	Seminom	positiv
3	IH 2371/00	Seminom, TIN	positiv
4	IH 2196/00 II	embryonales Karzinom	positiv
5	IH 2503/00	Teratokarzinom, TIN	positiv
6	IH 2561/00	ausgeprägte TIN, kein invasiver Tumor	positiv
7	IH 2510/00	embryonales Karzinom, reifes und unreifes Teratom	positiv
8	IH 2846/00	Seminom (s.2844/00 als 2. Entnahme!)	positiv
9	IH 2874/00	Mischtumor: Seminom, Chorionkarzinom, Dottersacktumor, reifes Teratom	positiv
10	IH 905/00 II	ausgedehnte TIN	positiv
11	IH 2164/00 I	unreifes Teratom, Seminom, embryonales Karzinom	positiv
12	IH 1351/00	embryonales Karzinom	positiv
13	IH 717/00	embryonales Karzinom, Chorionkarzinom	positiv
14	IH 374/00	TIN, reifes Teratom	positiv
15	IH 330/01	Seminom	positiv
16	IH 66/01	Seminom	positiv
17	IH 144/01	Seminom	positiv
18	IH 406/00 II	Seminom, TIN	positiv
19	IH 2798/00 re	Ductus deferens, Nebenhoden, kein Tumor (s. Zeile 28!)	positiv
20	IH 406/00 I	Seminom, TIN	positiv
21	IH 279/01	ausgebrannter Tumor, TIN	positiv
22	IH 118/01	Seminom	positiv
23	IH 2844/00	Seminom	positiv
24	IH 2028/00	Seminom	positiv
25	IH 1391/00	embryonales Karzinom, Chorionkarzinom	positiv
26	IH 2330/00 III	hochmalignes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom	positiv
27	IH 2653/00	älterer kompletter Infarkt, zellarm, Sklerose, kein Tumor	positiv
28	IH 2798/00 li	Ductus deferens, Nebenhoden, kein Tumor (s. Zeile 19!)	positiv
29	IH 2479/99	embryonales Karzinom, Dottersacktumor, reifes und unreifes Teratom	positiv
30	IH 592/00	regressiv verändertes Seminom, TIN	positiv
31	IH 112/00	Seminom	negativ
<b>Lymphknoten- gewebe</b>			
32	IH 953/99	anaplastisches großzelliges Lymphom	positiv
33	IH 1969/99	follikuläres Lymphom	positiv
34	IH 1513/99	Plasmozytom	positiv
35	IH 2469/98	EBV-assoziierte Lymphadenitis	positiv
36	IH 16/99	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	positiv
37	IH 79/98	Burkitt-Lymphom	positiv
38	IH 115/98	follikuläres Lymphom	positiv
39	IH 140/99	Burkitt-Lymphom	positiv
40	IH 969/99	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	positiv (schwach)

41	IH 648/98	granularzelliges T-Zell-Lymphom/T-CLL	positiv
42	IH 1092/98	anaplastisches großzelliges Lymphom (T-Typ)	positiv
43	IH 15/99	follikuläres Lymphom	positiv
44	IH 177/98	anaplastisches großzelliges Lymphom	positiv
45	IH 1450/99	follikuläres Lymphom	positiv
46	IH 2474/98	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	positiv
47	IH 1174/98	Hyperplasie des Lymphknotens	positiv
48	IH 996/98	Mantelzell-Lymphom	positiv
49	IH 120/98	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	positiv
50	IH 34/98	Immunozytom	positiv
51	IH 1030/98	Hyperplasie des Lymphknotens	positiv
52	IH 1267/99	follikuläres Lymphom	positiv
53	IH 1279/99	follikuläres Lymphom	positiv
54	IH 1216/99	peripheres T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom	positiv
55	IH 931/99	Chronisch-lymphatische Leukämie der B-Zellreihe	positiv
56	IH 911/99	Plasmozytom	positiv
57	IH 1134/99	Chronisch-lymphatische Leukämie der B-Zellreihe	positiv
58	IH 1238/99	Chronisch-lymphatische Leukämie der B-Zellreihe	positiv

### Mammagewebe

59	E 16637/01	invasives, muzinöses Mammakarzinom	positiv
60	E 7605/01	mischdifferenziertes Mammakarzinom, DCIS	positiv
61	E 5558/01	fibrozystische Mastopathie, duktales Hyperplasie, Papillomatose	positiv
62	E 6754/01	Fibrose, kein Tumor	positiv
63	E 6755/01	Fibrose, kein Tumor	positiv
64	E 5258/01	invasives duktales Mammakarzinom	positiv
65	E 12080/01	mischdifferenziertes Mammakarzinom	positiv
66	E 12348/01	invasives duktales Mammakarzinom	positiv
67	IH 2741/00	invasives duktales Mammakarzinom, DCIS	positiv
68	IH 2756/00	invasives duktales Mammakarzinom	positiv
69	IH 1166/01	invasives duktales Mammakarzinom	positiv
70	IH 1172/01	mischdifferenziertes Mammakarzinom, atypische lobuläre Hyperplasie	positiv
71	IH 1185/01	fibröse Mastopathie	positiv

### Hirntumore

72	TB 74	Glioblastom	positiv
73	TB 110	Glioblastom	positiv
74	TB 152	Glioblastom	positiv
75	TB 155	Glioblastom	positiv
76	TB 105	Glioblastom	positiv
77	TB 27	anaplastisches Astrocytom	positiv
78	TB 34	Glioblastom	positiv
79	TB 71	anaplastisches Astrocytom	positiv
80	TB 26	Glioblastom	positiv
81	TB 132	Glioblastom	positiv
82	TB 80	Glioblastom	positiv
83	TB 154 I	Glioblastom	positiv
84	TB 135	Glioblastom	positiv
85	TB 102	anaplastisches Astrocytom	positiv
86	TB 83	Glioblastom	positiv

87	TB 59	Germinom	positiv
<b>Nierengewebe</b>			
88	IH 1378/01	xanthogranulomatöse Pyelonephritis	positiv (schwach)
89	IH 1062/01	Nierenzellkarzinom	positiv
90	IH 820/01	Onkozytom	positiv
91	IH 1376/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	positiv
92	IH 1304/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	positiv
93	IH 817/01	Nierenzellkarzinom	positiv
94	IH 1186/01	Urothelkarzinom	positiv
95	IH 1184/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	positiv
96	IH 770/01	Nierenzellkarzinom	positiv
97	IH 969/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	positiv
98	IH 1302/01	hellzelliges Nierenzellkarzinom	positiv
99	IH 863/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	positiv
100	IH 1496/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	positiv
101	IH 822/01	klarzelliges Nierenzellkarzinom	positiv
<b>Melanom</b>			
102	H 99-1321	Lentigo-maligna-Melanom	Positiv (stark)
103	H 99-2113	noduläres Melanom	positiv
104	H 01-0322	superfiziell spreitendes Melanom	positiv
105	H 01-0710	noduläres Melanom	positiv
106	H 01-0107	noduläres Melanom	positiv
107	H 99-1352	Melanom	positiv (schwach)
108	H 01-0842	superfiziell spreitendes Melanom	positiv
109	H 01-0554	superfiziell spreitendes Melanom	positiv
110	H 01-0493	Lentigo-maligna-Melanom	positiv
111	H 01-0794	superfiziell spreitendes Melanom	positiv
112	H 99-1608	superfiziell spreitendes Melanom	positiv
113	H 01-0466	Lentigo-maligna-Melanom	positiv (schwach)
114	H 01-0685	superfiziell spreitendes Melanom	positiv

Die Gewebeprobe sind mit einer fortlaufenden Nummer (Spalte „Nr.“; GCT=Gruppe der testikulären Keimzelltumoren) und der Identifikationsnummer aus der jeweiligen Klinik (Spalte „Proben-Nr.“) versehen. In der Spalte “Diagnose” sind die Diagnosen nach histopathologischer Untersuchung dargestellt. Die Spalte “Ergebnis” zeigt das Ergebnis der  $\beta$ -Actin-PCR.

Abbildung 16 HERV-K TypII cORF-Sequenzen.

H99-1321 (c2b5) – Melanom (LMM)  
 ATGAAACCCATCAGAGATGCAAAAAGAAAAAGCAACCTCCCGGGAGACGGAGACACCACAGTCGAGCACCCGTTGACTCACAAGATGAACAAAAATGGTGACGTCAGAAAGAACA  
 GATGAAGTTGCCATCCCAAAGAAAGCAGAGCCGCAACTTTGGGCACAACTAAAGAAAGCTGACGCAGTTAGCTACAAAAATATCTAGAGAACAACAAGGTTGACACAAAA  
 CCCAGAGATATGCTTGCAGCCTTGATGATGTTATCAACGGTGGTAAAGTCTCCCTATGCCCTGCAGGAGCAGCTGCAGCTAACTATACCTACTGGGCCCTATGTGC  
 CTTTCCCGCCCTTAATTCGGGCAGTCACATGGATGGATAAATCCCTATAGAAAGTATATGTTAATGATAGCGTATGGGTACCTGGCCCCACAGATGATCGCTGCCCTGCC  
 AAACCTGAGGAAGAAGGATGATGATAAAATATTTCCATTTGGGTATCGTTATCCCTCCTATTTGCCCTAGGAGAGCACCAAGGATGTTTAAATGCCCTGCAGTCCAAAAATTG  
 GTTGGTAGAAGTACCTACTGTGTCAGTCCCATCAG**AGATGCAAAAGAAAAGGGCCCTCCACAGATG** // TCTGCAGGTGTACCCAAACAGCTCCGAAGACAGACGGACCAT  
 CGAACAACGGCCATGATGACGATGGCGGNTTTTGTGCAAAAAGAAAAAGGGGAAAATGTGGGNAAAAACAAGAGATCAGATGTTACTGTGTCTGG

H99-1321 (c1h4) – Melanom (LMM)  
 ATGAAACCCATCAGAGATGCAAAAAGTAAAGCACCTCCCGGGAGACGGAGACACCgCAGTCGAGCACCCGTTGACTCACAAGATGAACAAAAATGGTGACGTCAGAAAGAACA  
 GATGAAGTTGCCATCCCAAAGAAAGCAGAGCCGCAACTTTGGGCACAACTAAAGAAAGCTGACGCAGTTAGCTACAAAAATATCTAGAGAACAACAAGGTTGACACAAAA  
 CCCAGAGATATGCTTGCAGCCTTGATGATGTTATCAACGGTGGTAAAGTCTCCCTATGCCCTGCAGGAGCAGCTGCAGCTAACTATACCTACTGGGCCCTATGTGC  
 CTTTCCCGCCCTTAATTCGGGCAGTCACATGGATGGATAAATCCCTATAGAAAGTATATGTTAATGATAGCGTATGGGTACCTGGCCCCACAGATGATCGCTGCCCTGCC  
 AAACCTGAGGAAGAAGGATGATGATAAAATATTTCCATTTGGGTATCGTTATCCCTCCTATTTGCCCTAGGAGAGCACCAAGGATGTTTAAATGCCCTGCAGTCCAAAAATTG  
 GTTGGTAGAAGTACCTACTGTGTCAGTCCCATCAGTACATTAATCAATG // TCTGCAGGTGTACCCAAACAGCTCCGAAGATACAGGGACCATCGAGAACGGGCC  
 ATGATTAACGATGGCGGTTTGTGCAAAAAGAAAAAGGGGAAAATGTGGGNAAAAACAAGAGATCAGATGTTACTGTGTCTGGTGT

E12348/01 (b2h5) – duktales Mammakarzinom  
 ATGAAACCCATCAGAGATGCAAAAAGAAAAAGCACCTCCCGGGAGACGGAGACACCACACAGTCGAGCACCCGTTGACTCACAAGATGAACAAAAATGGTGACGTCAGAAAGAACA  
 GATGAAGTTGCCATCCCAAAGAAAGCAGAGCCGCAACTTTGGGCACNACTNAAAGAGCTGACGCAGTTAGCTACAAAATATCTAGAGNACACCAGGTTGACACCAA  
 NCCCCGAGAGATATGCTGCNTGCAGCCTTGATGATGATGATCAACNNGGGTAAAGTCTCCCTATGNCTGCAGGAACAACCTGCAGCTTANTATANTACTAGGGCCCTATG  
 TGGCCTTCCNNCCCTTANINCNG. NAGTCCCATTTGGTGG. TAACTCCNTNAGNAGTNNTGN**TTATGATAGCGGTA**TGGGTACCTNGGCCCCCAGATGATCGCC**CTG**  
 GCCTGGCCAA**A**CTNAAGGAAAAAANGGATTAATANAAAATNTTTCCCTTGGGATCGGTATCCNCCNATTTGCCNANGGGGAGCACCCCGGTGTTTTTATGGCTNGGGN  
 NCCAAAAATTGGGTGGGGNAAAAANCNCTGGTNNGNCCCCCTGGNGNATTTCCCTTTTNCATGTGTNGGGGGTGNCCCCAAAAACNTCCTTAAAGAAAAANCGNNCCCTTN  
 CGAAAAANGGCCCTTNTTTACAANTGGGNTTTTNTCAAAAAAAAANGGGNAANTGNGGNAAAAACAAGAAAAATCAAAATTTGTCNCGTGTCT

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ II cORF-Sequenzen. Die fortlaufende Sequenz ist in Großbuchstaben angegeben, die Schnittstelle zwischen erstem und zweitem Exon ist mit „//“ gekennzeichnet. Austausch zur Sequenz von 99-1321 (c2b5), einem Melanom mit typischer HERV-K II cORF-Sequenz, sind in fettgedruckten Buchstaben angegeben. Dies betrifft auch einen variablen Sequenzabschnitt am Ende des ersten Exons. Die Sequenzen sind mit den Identifikationsnummern der einzelnen Fälle versehen, in Klammern sind der Klon und die Platte des Versuchs zur Identifikation der einzelnen Sequenz angegeben.





Abbildung 16 HERV-K Typ II rec/cORF-Sequenzen.

IH79/98 (1/18) – Burkittlymphom

ATGAAACCCATCGGAGATGCAAAAAGAAAGCACCCTCCGGGAGACGGAGACACCAGTTCGAGCACCCGTTGACTCACAAAGATGAACAAAAATGGTGACGTGAGAAAGAACAGAT  
GAAAGTTGCCATCCACAAAGAGCAGAGCCGCAACTTGGGCACAACTAAAAGAAAGTGCAGCTAGCTACAAAAATATCTAGAGAAACACAAAAGGTGACACAAAAACCCAG  
AGAGTATGCTGCTGCAGCCTTGATGATTTATCAACGGTGGTAAAGTCCCTATGCCTGCAGGAGCAGTGCAGTAACTATACCTACTGGGCCATGTCCTTTCCCG  
CCCTAAATTCGGCAGTCACATGGATGGATAATCCTATAGAAAGTATATGTTAAATGATAGCGTATGGGTACCTGCCCCACAGATGATCGCTGCCCTGCCAAAACCTGAGGA  
AGAAAGGATGATGATAAAATATTTCCATGGGTATCGTTATCCCTCTATTTGCCCTAGGGAGAGCACAGGATGTTAAATGCTGCCGTTCCAAAATTTGGTTGGTAGAAGTAC  
CTACTGTCAATCCCATCAGTAGATTCACATG//TCTGCAGGTGTACCCAAACAGTCCGAAAGAGACAGCCATCGAGAACGGGCCATGATGACGATGGCGGT  
TTTGTGAAAAAGAAAAGGGGAAAATGTGGGAAAAAGCAAGAGATCAGATTTCTACTGTGTGTAGAAAAAGTAGACATGGGAGACTCCATTTTGTATTGTACTA  
AGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGTAA

IH34/98 (3/64) - Immunozytom

ATGAAACCCATCGGAGATGCAAAAAGAA (GGGCCCTCACGGGAGATGGTAAAC) CAGTCACATGGATGATAATCCCTATAGAAAAATATATGTTAAATGATAGTATGGGTAC  
CTGGACCCATAGATGATCGCTGCCCTGCCAAAACCTGAGGAAAGAGGATGATAAAATATTTCCATTTGGGTATCGTTATCCCTCTATTTGCCCTAGGGAGAGCACCCAGGA  
TGTTAAATGCTGCAGTCCAAAAATGGTTGGTAGAAAGTACCTACTGTCAAGTCCCATCAGTAGATTCACATG//TCTGCAGGTGTACCCAAACAGTCCGAAAG  
ACAGCCACATCGAGAACGGGCCATGATGACGATGGCGGTTTGTGAAAAAGAAAAGGGGAAAATGTGGGAAAAAGCAAGAGATCAGATTTGTTACTGTGTGTAG  
AAAGAAAGTAGACATGGGAGACTCCATTTGTTATGTGTAAAGAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGTAA

IH2469/98 (2/27) – Mononukleose

ATGAGCCCATCGGAGATGCAAGAAAAAGCACCTCCGGCGGAGACGGAGACACCACAGCGGAGCACCCGTTGACTCACAAAGATGAACAAAAATGGTGACGTGAGAAAGAACAGAT  
GAAAGTTGCCATCCACAAAGAGCAGAGCCGCAACTTGGGCACAACTAAAAGAAAGTGCAGCTAGCTACAAAAATCTAGAGAAACACAAAAGGTGACACAAAAACCCAG  
AGAGTATGCTGCTGCAGCCTTGATGATTTGATCAGCGGTGGTAAAGTCTCCCTATGCCCTGCAGGAGCAGTGCAGTAACTATACCTACTGGGCCATGTCCTTTCCCG  
CCCTAAATTCGGCAGTCACATGGATGGATAATCCTATAGAAAGTATATGTTAAATGATAGCGTATGGGTACCTGGCCCCACAGATGATCGCTGCCCTGCCAAAACCTGAGGA  
AGAAAGGATGATGATAAAATATTTCCATTTGGGTATCGTTATCCCTCTATTTGCCCTAGGGAGAGCACAGGATGTTAAATGCTGCAGTCCAAAAATGGTTGGTAGAAGTAC  
CTACTGTCAATCCCATCAGTAGATTCACATG//TCTGCAGGTGTACCCAAACAGTCCGAAAGAGACAGCCATCGAGAACGGGCCATGATGACGATGGCGGT  
TTTGTGAAAAAGAAAAGGGGAAAATGTGGGAAAAAGCAAGAGATCAGATTTCTACTGTGTAGAAAAAGTAGACATGGGAGACTCCATTTTGTATTGTACTA  
GAAAAATCTTCTGCCTTGAGATTCGTAA

Die Abbildung zeigt die HERV-K Typ II rec/cORF-Sequenzen einiger repräsentativer Fälle. Die fortlaufende Sequenz ist in Großbuchstaben angegeben, die Schnittstelle zwischen erstem und zweiten Exon ist mit „//“ gekennzeichnet. Austausch zur Sequenz von 99-1321 (c2b5), einem Melanom mit typischer HERV-K II rec/cORF-Sequenz, sind in fettgedruckten Buchstaben angegeben. Dies betrifft auch einen variablen Sequenzabschnitt am Ende des ersten Exons. Die Sequenzen sind mit den Identifikationsnummern der einzelnen Fälle versehen, in Klammern sind der Klon und die Platte des Versuchs zur Identifikation der einzelnen Sequenz angegeben.

## 7 Literaturverzeichnis

- Allsopp RC, Harley CB (1995) Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Experimental Cell Research* 219: 130-136
- Arbuthnot P, Kew M (2001) Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *International Journal of Experimental Pathology* 82: 77-100
- Ariumi Y, Yamaoka S, Lin JY, Hirota M, Masui O, Taya Y, Shimotohno K (2000) HTLV-1 tax oncoprotein represses the p53-mediated trans-activation function through coactivator CBP sequestration. *Oncogene* 19: 1491-1499
- Armbruster V, Sauter M, Krautkraemer E, Meese E, Kleiman A, Best B, Roemer K, Müller-Lantzsch N (2002) A Novel Gene from the Human Endogenous Retrovirus K Expressed in Transformed Cells. *Clinical Cancer Research* 8: 1800-1807
- Aufiero B, Schneider RJ (1990) The hepatitis B virus X-gene product trans-activates both RNA polymerase II and III promoters. *The EMBO Journal* 9: 497-504
- Avantaggiati M, Natoli G, Balsano C, Chirillo P, Artini M, Collepardo DD, Levrero M (1993) The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements. *Oncogene* 8: 1567-1574
- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM (1987) Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *The Journal of Virology* 61: 962-971
- Ballard DW, Bohnlein E, Lowenthal JW, Wano Y, Franza BR, Greene WC (1988) HTLV-1 tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. *Science* 241: 1652-1655
- Bardwell VJ, Treisman R (1994) The POZ domain: a conserved protein-protein motif. *Genes & Development* 8: 1664-1677
- Bland KI (1999) The 1999 James Ewing lecture: in pursuit of molecules of oncogenesis and neoplastic therapy. *Annals of Surgical Oncology* 6: 528-541
- Boese A, Sauter M, Galli U, Best B, Herbst H, Mayer J, Kremmer E, Roemer K, Müller-Lantzsch N (2000) Human endogenous retrovirus protein rec/cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Oncogene* 19: 4328-4336
- Boshoff C, Whitby D, Hatzioannou (1995) Kaposi's sarcoma-associated herpes virus in HIV-negative Kaposi's sarcoma. *Lancet* 345: 1043-1044

- Brinkley BR, Geopfert TM (1998) Supernumerary centrosomes and cancer: Boveri's hypothesis resurrected. *Cell motility and the cytoskeleton* 41: 281-288
- Bronson DL, Fraley EE, Fogh J, Kalter SS (1979) Induction of retrovirus particles in human testicular tumor (Tera 1) cell cultures: an electron microscope study. *Journal of the National Cancer Institute (USA)* 63: 337-339
- Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE (2004) Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nature Genetics* 36: 647-652
- Cannon MJ, Pellette PE (2001) Effect of order of infection with human immunodeficiency virus and human herpesvirus 8 on the incidence of Kaposi's sarcoma. *The Journal of infectious diseases* 183: 1304-1305
- Carbone A, Gloghini A, Zagonel V, (1996) Expression of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 in nonendemic Burkitt's lymphoma. *Blood* 87: 1202-1204
- Chellappan SP, Hiebert S, Mudryi M, Horowitz JM, Nevins JR (1991), The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65: 1053-1061
- Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY, Waxman S, Zelent A (1993) Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukemia. *The EMBO journal* 12: 1161-1167
- Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT (1992) Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89: 5799-5803
- Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP (2004) Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature Genetics* 36: 653-659
- Dukers DF, Meij P, Vervoort MBHJ, Vos W, Scheper RJ, Meijer CJLM, Bloemena E, Middeldorp JM (2000) Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *Journal of Immunology* 165: 663-670
- Fehrmann F, Laimins LA (2003) Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 22: 5201-5207

- Feitelson MA (1999) Hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *J Cell Physiol* 181: 188-202
- Franchini G (1995) Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood* 86: 3619-3639
- Frattini MG, Laimins LA (1994) The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204: 799-804
- Gatza ML, Watt JC, Marriott SJ (2003) Cellular Transformation by the HTLV-I Tax Protein, a Jack-of-All-Trades. *Oncogene* 22: 5141-5149
- Gonzalez-Amaro R, Garcia-Monzon C, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yague E, Pivel JP, Lopez-Cabrera M, Fernandez-Ruiz E, Sanchez-Madrid F (1994) Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *The Journal of experimental medicine* 179: 841-848
- Hamadi I, Steinhart H, Pahl C (2000) Identification of a nasopharyngeal carcinoma using Epstein-Barr virus diagnosis. *HNO* 48: 314-317
- Hanahan D, Weinberg R (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
- Harley CB (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation Research* 256: 271-282
- He LZ, Guidez F, Tribioli C, Peruzzi D, Ruthardt M, Zelent A, Pandolfi PP (1998) Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with corepressor determine differential responses to RA in APL. *Nature Genetics* 18: 126-135
- Helt AM, Funk JO, Galloway DA (2002) Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *The Journal of virology* 76: 10559-10568
- Herbst H, Sauter M, Müller-Lantzsch N (1996) Expression of Human Endogenous Retrovirus K Elements in Germ Cell and Trophoblastic Tumors. *The American journal of pathology* 149: 1727-1735
- Hoatlin ME, Zhi Y, Ball H, Silvey K, Melnick A, Stone S, Arai S, Hawe N, Owen G, Zelent A, Licht JD (1999) A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood* 94: 3737-3747
- Hong SH, David G, Wong CW, Dejean A, Privalsky ML (1997) SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and

- PLZF RAR $\alpha$  oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 94: 9028-9033
- Hostager BS, Catlett IM, Bishop GA (2000) Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling. The Journal of biological chemistry 275: 15392-15398
- Howley PM, Lowy DR (2001) Fields BN, Knipe JB, Howley PM (eds). Lippincott/The Williams&Wilkins Co: Philadelphia, PA Virology 2: 2197-2229 (zitiert aus Fehrmann F, Laimins LA (2003) Oncogene 22: 5201-5207)
- Hu KQ, Vierling JM, Siddiqui A (1990) Transactivation of HLA-DR gene by hepatitis B virus X gene product. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 87: 7140-7147
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1993) Localisation of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. Molecular and cellular biology 13: 4918-4927
- Huvos AG (1998) James Ewing: Cancer man. Annals of diagnostic pathology 2: 146-148
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature (Lond.) 409: 860-922
- Kinzler KW and Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 87: 159-170
- Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. Nature 380: 79-82
- Krieg AM (1997) Human endogenous retroviruses. Science and Medicine pp 34-43
- Lam N, Sugden B (2003) LMP1, a viral relative of the TNF receptor family, signals principally from intracellular compartments. The EMBO journal 22: 3027-3038
- Larsson E, Kato N, Cohen M (1989) Human endogenous proviruses. Current topics in microbiology and immunology 148: 115-132 (zitiert aus Löwer R, Boller K, Hasenmaier B, Korbmacher C, Müller-Lantsch N, Löwer J, Kurth R (1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 90: 4480-4484)
- Lee DK, Kim BC, Brady JN, Jeang KT, Kim SJ (2002) Human T-cell lymphotropic virus type I tax inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking the

- association of Smad protein with Smad-binding element. *The Journal of biological chemistry* 277: 33766-33775
- Leib-Mösch C, Brack-Werner R, Werner T, Bachmann M, Faff O, Erfle V, Hehlmann R (1990) Endogenous retroviral elements in human DNA. *Cancer Research* 50: 5636-5642
- Li JY, English MA, Ball HJ, Yeyati PL, Waxman S, Licht JD (1997) Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *The Journal of biological chemistry* 272: 22447-22455
- Lin W, Lai CH, Tang CJ, Huang CJ, Tang TK (1999) Identification and gene structure of a novel human PLZF-related transcription factor gene, TZFP. *Biochemical and biophysical research communications* 264: 789-795
- Little RF, Guitierrez M, Jaffe ES (2001) HIV-associated non-Hodgkin lymphoma: incidence, presentation and prognosis. *JAMA* 285: 1880-1885
- Liu JP (1999) Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB* 13: 2091-2104
- Löwer R, Boller K, Hasenmaier B, Korbmacher C, Müller-Lantzsch N, Löwer J, Kurth R (1993) Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 4480-4484
- Löwer R, Löwer J, Kurth R (1996) The virus in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 5177-5184
- Luber B, Burgelt E, Fromental C, Kanno M, Koch W (1991) Multiple simian virus 40 enhancer elements mediate the trans-activating function of the X protein of hepatitis B virus. *Virology* 184: 808-813
- Lucito R, Schneider RJ (1992) Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *The Journal of virology* 66: 983-991
- Mahe Y, Mukaida N, Kuno K, Akiyama N, Ikeda N, Matsushima K, Murakami S (1991) Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor kappa B and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. *The Journal of biological chemistry* 266: 13759-13763

- Masao Matsuoka (2003) Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia  
Oncogene 22: 5131-5140
- McKusick VA (1985) Marcella O'Grady Boveri (1865-1950) and the chromosome  
theory of cancer. Journal of medical genetics 88: 31-40
- Melbye M, Frisch M (1998) The role of human papillomaviruses in anogenital cancers.  
Seminars in cancer biology 8: 307-313
- Melnick A, Licht JD (1999) Deconstructing a disease: RAR $\alpha$ , its fusion partners and  
their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. Blood 93: 3167-  
3215
- Miaw SC, Choi A, Yu E, Kishikawa H, Ho IC (2000) ROG, repressor of GATA,  
regulates the expression of cytokine genes. Immunity 12: 323-333
- Miyake H, Suzuki T, Hirai H, Yoshida M (1999) Trans-activator Tax of human T-cell  
leukemia virus type 1 enhances mutation frequency of the cellular genome.  
Virology 253: 155-161
- Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P and Botchan MR (1990)  
Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by  
complex formation with the E2 transactivator. Science 250: 1694-1699
- Mori N, Morishita M, Tsukazaki T, Giam CZ, Kumatori A, Tanaka Y, Yamamoto N  
(2001) Human T-cell leukemia virus type I oncoprotein Tax represses Smad-  
depending transforming growth factor beta signaling through interaction with  
CREB-binding protein/p300. Blood 97: 2137-2144
- Müller-Lantzsch N, Sauter M, Weiskircher A, Kramer K, Best B, Buck M, Grässer F  
(1993) Human endogenous retroviral element K (HERV-K) encodes a full-length  
gag homologous 73-kDa protein and a functional protease. AIDS research and  
human retroviruses 9: 343-350
- Ono M, Yasunaga T, Miyata T, Ushikubo H (1986) Nucleotide sequence of human  
endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome.  
The Journal of virology 60: 589-598
- Plumelle Y, Panellati G (2000) Adult T-cell leukemia-lymphoma linked to HTLV-1. La  
revue de médecine interne (la Société nationale française de médecine interne) 21  
(Suppl 4): 441-442



- Pullen SS, Miller HG, Everdeen DS, Dang TT, Crute JJ, Kehry MR (1998) CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry* 37: 11836-11845
- Randhawa P, Demetris AJ, Nalesnick MA (1995) Epstein-Barr virus-encoded RNA expression as a risk factor for the development of posttransplantation lymphoproliferative disease. *Hepatology* 21: 1752-1754
- Reid AE, Koziel MJ, Aiza I (1999) Hepatitis C virus genotypes and viremia and hepatocellular carcinoma in the United States. *The American journal of gastroenterology* 94: 1619-1626
- Reddel RR (1998) A reassessment of the telomere hypothesis of senescence. (Review) *Bioessays* 20: 977-984
- Renan MJ (1993) How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Molecular carcinogenesis* 7: 139-146
- Sasco AJ (1996) Screening of undifferentiated carcinoma of the nasopharynx. *Bulletin du cancer* 83: 344-351
- Sauter M, Roemer K, Best B, Afting M, Schommer S, Seitz G, Hartmann M, Müller-Lantzsch N (1996) Specificity of Antibodies Directed against Env Protein of Human Endogenous Retroviruses in Patients with Germ Cell Tumors. *Cancer research* 56: 4362-4365
- Sauter M, Schommer S, Kremmer E, Remberger K, Dölken G, Lemm I, Buck M, Best B, Neumann-Haefelin D, Müller-Lantzsch N (1995) Human Endogenous Retrovirus K10: Expression of Gag Protein and Detection of Antibodies in Patients with Seminomas. *The Journal of virology* 69: 414-421
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495-505
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314: 111-114

- Seto E, Yen TS, Peterlin BM, Ou JH (1988) Trans-activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by the hepatitis B virus X protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85: 8286-8290
- Seto E, Zhou DX, Perlin BM, Yen TS (1989) Trans-activation by the hepatitis B virus X protein shows cell-type specificity. *Virology* 173: 764-766
- Siegler G, Kremmer E, Gonnella R, Niedobitek G (2003) Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 (LMP1) and TNF receptor associated factors (TRAF): colocalisation of LMP1 and TRAF1 in primary EBV infection and in EBV associated Hodgkin lymphoma. *The Journal of clinical pathology: molecular pathology* 56: 156-161
- Sotlar K, Koveker G, Aepinus C (2001), Human papillomavirus Type 16-associated primary squamous cell carcinoma of the rectum. *Gastroenterology* 120: 988-994
- Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR (1992) Human papillomavirus 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Human pathology* 23: 117-128
- Stubenrauch F, Colbert AM, Laimins LA (1998) Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions. *The Journal of virology* 72: 8115-8123
- Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT (2001) Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* 15: 579-589
- Sutkowski N, Palkama T, Ciurli C, Sekaly RP, Thorley-Lawson DA, Huber BT (1996) An Epstein-Barr virus-associated superantigen. *Journal of Experimental Medicine* 184: 971-980
- Suzuki T, Uchida-Toita M, Yoshida M (1999) Tax protein of HTLV-1 inhibits CBP/p300-mediated transcription by interfering with recruitment of CBP/p300 onto DNA element of E-box or p53 binding site. *Oncogene* 18: 4137-4143
- Tang C-JC, Chuang C-K, Hu H-M, Tang TK (2001) The zinc finger domain of Tzfp binds to the tbs motif located at the upstream flanking region of the Aie1(aurora-C) kinase gene. *Journal of Biological Chemistry* 276: 19631-19639

- Tao J, Wasick MA (2001) Epstein-Barr virus associated polymorphic lymphoproliferative disorders occurring in nontransplant settings. Laboratory investigation, journal of technical methods and pathology 81: 429-437
- Thierry F, Yaniv M (1987) The BPV1-EL trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. The EMBO journal 6: 3391-3397
- Twu JS, Chu K, Robinson WS (1989) Hepatitis B virus X gene activates kappa B-like enhancer sequences in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus-1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 86: 5168-5172
- Ustav M, Stenlund A (1991) Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. The EMBO journal 10:449-457
- Van Orden K, Giebler HA, Lemasson I, Gonzales, Nyborg JK (1999a) Binding of p53 to the KIX domain of CREB binding protein. Journal of biological chemistry 274: 26321-26328
- Van Orden K, Yan JP, Ulloa A, Nyborg JK (1999b) Oncogene 18: 3766-3772
- Vidalain PO, Azocar O, Servet-Delprat C, Rabourdin-Combe C, Gerlier D, Manie S (2000) CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. The EMBO journal 19: 3304-3313
- Wang HD, Trivedi A, Johnson DL (1997) Hepatitis B virus X protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription and increases cellular TATA-binding protein by activating the RAS signaling pathway. Molecular and cellular biology 17: 6838-6846
- Wano Y, Feinberg M, Hosking JB, Bogerd H, Greene WC (1988) Stable expression of the tax gene of type I human T-cell leukemia virus in human T-cells activates specific cellular genes involved in growth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 85: 9733-9737
- Weinberg RA (1995) Cell 81: 323-330 (zitiert aus Fehrmann F, Laimins LA (2003) Oncogene 22: 5201-5207)
- Weiss LM (2000) Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. Current oncology reports 2: 199-204
- Wilkinson DA, Mager DL, Leong JAC (1994) Endogenous human retroviruses. In JA Levy (ed.) The Retroviridae Plenum Press, New York 3: 465-535

- Yeyati PL, Shaknovich R, Boterashvili S, Li J, Ball HJ, Waxman S, Nason-Burchenal K, Dmitrovsky E, Zelent A, Licht JD (1999) Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* 18: 925-934
- Yoshida M (2001) Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annual review of immunology* 19: 475-496
- Zhang T, Xiong H, Kan LX, Zhang CK, Jiao XF, Fu G, Zhang QH, Lu L, Tong JH, Gu BW, Yu M, Liu JX, Licht J, Waxman S, Zelent A, Chen E, Chen SJ (1999) Genomic sequence, structural organization, molecular evolution and aberrant rearrangement of promyelocytic zinc finger gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 11422-11427
- Zimber-Strobl U, Strobl L, Hofelmayr H (1999) EBNA 2 and c-myc in B cell immortalization by Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Current Topics in microbiology and immunology* 246: 315-320

## **Danksagung**

Meinen herzlichen Dank möchte ich richten an Herrn Professor Herbst für seine herzliche Betreuung, seinen unerschütterlichen Optimismus und die zahlreichen Tassen Kaffee, Herrn Professor Müller-Lantzsch für die gute Zusammenarbeit und die Überlassung der Zelllinien, Frau Doktor Sauter für die gute Zusammenarbeit, ihr offenes Ohr und die Überlassung verschiedener Materialien, Herrn Professor Paulus und Herrn Doktor Rickert für die Überlassung der Gewebeproben, Herrn Professor Grabbe und Herrn Professor Metze ebenfalls für die Überlassung der Gewebeproben, Frau Doktor Ölmann für ihre Unterstützung, Lutz Ketteler, Anja Garcia und Petra Fischer sowie allen, die mich sonst noch unterstützt haben.

