



Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Fachgebiet Protein Modelling

# Identifizierung transkriptionell aktivierter humaner endogener Retroviren (HERVs) in Tumorerkrankungen

Ingmar-Ernst Göttesdorfer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Frischmann

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. I. Antes
2. apl. Prof. Dr. Chr. Leib-Mösch

Die Dissertation wurde am 18.03.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 21.12.2015 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1 Retroviren .....	7
1.2 Humane endogene Retroviren (HERVs) .....	8
1.3 Klassifizierung und Nomenklatur von HERVs .....	10
1.4 Repräsentative HERV-Gruppen .....	11
1.4.1 HERV-W .....	11
1.4.2 HERV-E .....	12
1.4.3 ERV-9 .....	12
1.4.4 HERV-K .....	13
1.4.4.1 HML-2 .....	13
1.4.4.2 HML-6 .....	15
1.4.5 HERV-L .....	15
1.5 Einfluss von HERVs auf die Wirtsgenexpression .....	16
1.5.1 Promotorfunktion .....	16
1.5.2 Enhancerfunktion .....	16
1.5.3 Alternatives Spleißen .....	17
1.5.4 Intergenes Spleißen .....	17
1.5.5 Polyadenylierung .....	18
1.5.6 Nichtkodierende RNAs (ncRNAs) .....	18
1.6 HERVs und ihre Rolle in humanen Erkrankungen .....	19
1.6.1 HERVs und neurologische Erkrankungen .....	20
1.6.2 HERVs und Autoimmunerkrankungen .....	21
1.6.3 HERVs und Tumorerkrankungen .....	22
1.6.3.1 Mechanismen der HERV-vermittelten Tumorentstehung .....	23
1.6.3.1.1 Insertionsmutagenese .....	23
1.6.3.1.2 HERV-LTR vermitteltes onkogenes Potential .....	23
1.6.3.1.3 Onkogene HERV-Produkte .....	24
1.6.3.2 HERVs in Urothelkarzinom .....	25
1.6.3.3 HERVs in Mammakarzinomen .....	26
1.7. HERVs als Biomarker, oder als Antigen für eine Anti-Krebs-Immuntherapie .....	27
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>

## INHALTSVERZEICHNIS

2.1 Material .....	29
2.1.1 Gebrauchsfertige Reaktionsenzyme (Kits) .....	29
2.1.2 Oligonukleotide .....	29
2.1.2.1 MOP-Primer („Mixed oligonucleotide Primers“) für die Multiplex-PCR .....	29
2.1.2.2 Oligonukleotide („capture probes“) des Retrovirus-spezifischen Microarrays (Retroarray).....	30
2.1.2.3 Antisense Kontrolloligomere zur Qualitätssicherung des Microarrays .....	37
2.1.2.4 PCR-Primer für konventionelle PCRs .....	37
2.1.2.4.1 Primer für die Kontroll-PCR nach dem DNase-Verdau.....	37
2.1.2.4.2 Primer für die quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR) .....	37
2.1.2.4.3 Primervarianten für die Locusbestimmung per cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung.....	38
2.1.2.5 Primervarianten für die Locusbestimmung per „Next Generation“ Sequenzierung (Amplikon-Sequenzierung) .....	38
2.1.3 Bakterienmedien .....	41
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	41
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien.....	42
2.1.6 Enzyme und Proteine .....	43
2.1.7 Sonstige Labormaterialien.....	43
2.1.8 Geräte .....	44
2.1.9 Software und Datenbanken .....	44
2.1.10 Gewebeproben.....	45
2.2 Methoden .....	46
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	46
2.2.1.1 RNA-Isolierung aus humanen Gewebeproben.....	46
2.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	46
2.2.1.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	47
2.2.1.3.1 PCR mit der Taq-Polymerase .....	47
2.2.1.3.2 PCR mit der Pfu-Polymerase.....	48
2.2.1.3.3 PCR mit dem Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim)...	49
2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese.....	50
2.2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	50
2.2.1.6 DNase Verdau von RNA.....	50
2.2.1.7 cDNA-Synthese (Reverse Transkription) .....	51
2.2.1.8 TA-Klonierung .....	51
2.2.1.9 Transformation von <i>E.coli</i> Bakterien mittels Hitzeschock .....	52

## INHALTSVERZEICHNIS

2.2.1.10 Blau-Weiß-Selektion .....	52
2.2.1.11 Kultivierung und Ernten von XL10-Gold <i>E.coli</i> Bakterien .....	53
2.2.1.12 Isolierung von Plasmid- DNA aus bakteriellen Zellen.....	53
2.2.1.13 Restriktionsverdau.....	53
2.2.1.14 Sequenzierung nach Sanger .....	54
2.2.1.15 Retrovirus-spezifischer Microarray (RetroArray) .....	54
2.2.1.15.1 Multiplex-PCR.....	55
2.2.1.15.2 Vorbereitung der Microarray-Objektträger.....	56
2.2.1.15.3 Auftragen/„Spotten“ der „capture probes“.....	57
2.2.1.15.4 Nachbehandlung der „gespotteten“ Objektträger .....	57
2.2.1.15.5 Vorhybridisierung.....	58
2.2.1.15.6 Kontrollhybridisierung vorhybridisierter Objektträger mit antisense Kontroll-Oligonukleotiden .....	58
2.2.1.15.7 Hybridisierung von Microarray-Objektträgern mittels Deckglas-Methode .....	58
2.2.1.15.8 Waschen und Trocknen von hybridisierten Microarray-Objektträgern ..	59
2.2.1.15.9 Scannen und Auswerten der Microarray-Objektträger .....	59
2.2.1.16 Quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR).....	60
2.2.1.16.1 Relative qRT-PCR .....	61
2.2.1.16.2 Absolute qRT-PCR .....	62
2.2.1.16.2.1 Generierung von Standardplasmiden für eine absolute qRT-PCR. 62	
2.2.1.16.2.2 Erstellen einer Eichkurve für eine absolute qRT-PCR.....	62
2.2.1.17 Locusbestimmung .....	63
2.2.1.17.1 Locusbestimmung mittels cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung .....	63
2.2.1.17.2 Locusbestimmung mittels „Amplikon Next Generation Sequenzierung (NGS)“ („Second Generation“ Sequenzierung).....	63
2.2.1.17.2.1 Amplikon-Generierung .....	64
2.2.1.17.2.2 Amplikon-NGS mit dem Roche 454 GS FLX+ (Titanium Sequencing Kit XLR70) System durch die Firma GATC .....	65
2.2.2 Bioinformatische Methoden .....	66
2.2.2.1 Datenprozessierung der Amplikon-Sequenzen.....	66
2.2.2.2 Qualitätsanalyse.....	66
2.2.2.3 Sortieren der Amplikon-Sequenzen .....	66
2.2.2.4 „Mapping“ und Auswertung der Amplikon-Sequenzen .....	67
<b>3. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>68</b>

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>69</b>
4.1 Urothelkarzinomstudie .....	69
4.1.1 HERV Transkription in gesundem und malignem Urothelgewebe.....	69
4.1.1.1 Erstellung von HERV-Transkriptionsprofilen von Urothelgewebe mittels Microarray-Analysen .....	69
4.1.1.2 Quantifizierung der HERV-K(HML-2) Transkription in Urothelgewebe mittels absoluter qRT-PCR.....	74
4.1.2 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-Loci in Urothelgewebe mittels „Next Generation“ Sequenzierung (NGS) .....	77
4.1.2.1 Identifizierung transkriptionell aktiver ERV-9 Loci in Urothelgewebe.....	81
4.1.2.2 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-W Loci in Urothelgewebe.....	84
4.1.2.3 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-K(HML-6) Loci in Urothelgewebe .....	87
4.1.2.4 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-K(HML-2) Loci in Urothelgewebe .....	88
4.1.3 Quantifizierung der HERV-Transkription in Urothelgewebe unter Einbeziehung der relativen Transkriptionsraten der mittels NGS als transkriptionell aktiv identifizierten HERV-Loci .....	90
4.1.3.1 Quantifizierung der ERV-9 Transkriptzahlen unter Einbindung transkriptionell aktiver ERV-9 Loci.....	90
4.1.3.2 Quantifizierung der HERV-W Transkription unter Einbindung transkriptionell aktiver HERV-W Loci.....	93
4.1.3.3 Quantifizierung der HERV-K(HML-6) Transkription unter Einbindung transkriptionell aktiver HML-6 Loci.....	95
4.1.3.3 Quantifizierung der HERV-K(HML-2) Transkription unter Einbindung transkriptionell aktiver HML-2 Loci.....	98
4.2. Brustkrebsstudie .....	100
4.2.1 HERV-Transkription in gesundem und malignem Brustdrüsengewebe.....	100
4.2.1.1 HERV-Transkriptionsprofile von Brustdrüsengewebe erstellt mittels Microarray-Analysen .....	100
4.2.1.2 Quantifizierung der HERV-K(HML-2) Transkriptzahlen in Brustdrüsengewebe mittels absoluter qRT-PCR.....	104
4.2.2 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-Loci in Brustdrüsengewebe anhand von cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung.....	107
4.2.2.1 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-K(HML-6) Loci in Brustdrüsengewebe .....	107

## INHALTSVERZEICHNIS

4.2.2.2 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-K(HML-2) Loci in Brustdrüsengewebe .....	109
4.2.3 Charakterisierung des HERV-K(HML-2) ERVK-5 Locus .....	111
4.2.3.1 Chromosomale Lokalisierung und ORF-Analyse des HERV-K(HML-2) ERVK-5 Locus .....	111
4.2.3.2 Quantifizierung der HERV-K(HML-2) ERVK-5 Transkription in Brustdrüsengewebe mittels absoluter qRT-PCR .....	112
4.2.4 Verknüpfung klinischer Tumorparameter mit Ergebnissen der HERV-K(HML-2) und HERV-K(HML-2) ERVK-5 Transkription .....	115
4.2.4.1. Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus in Brustdrüsengewebe .....	116
4.2.4.1.1 Östrogenrezeptorstatus in Verbindung mit der HERV-K(HML-2) Transkription .....	116
4.2.4.1.2 Progesteronrezeptorstatus in Verbindung mit der HERV-K(HML-2) Transkription .....	117
4.2.4.1.3 Progesteronrezeptorstatus in Verbindung mit der ERVK-5 Transkription .....	118
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>119</b>
5.1 Trend zu einer in malignem Urothelgewebe verminderten HERV-Transkription .....	120
5.2 Kein präferenziell tumorspezifisch aktiver ERV-9, HERV-W, HERV-K(HML-6) oder HERV-K(HML-2) Locus in Urothelgewebe identifizierbar .....	122
5.3 Erhöhte HERV-Aktivität, insbesondere der HERV-K(HML-2) Gruppe, in malignem Brustdrüsengewebe .....	124
5.4 Identifizierung des potentiellen Brustdrüsentumormarkers ERVK-5 .....	125
5.5 Signifikant höherer Anstieg der HERV-K(HML-2) und ERVK-5 Transkription in Progesteron- bzw. Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomen .....	127
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>130</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>132</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>134</b>
8.1 Zusätzliche Abbildungen .....	134
8.2 Zusätzliche Tabellen .....	142
<b>9. Abkürzungen .....</b>	<b>144</b>

## INHALTSVERZEICHNIS

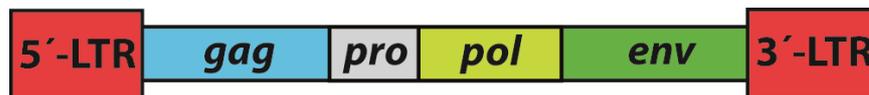
<b>10. Literatur .....</b>	<b>147</b>
<b>11. Danksagung .....</b>	<b>164</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Retroviren

Eine der wichtigsten Gruppe von Viren sind die sogenannten Retroviren, die die Familie der *Retroviridae* repräsentieren. Eine Besonderheit von Retroviren stellt ihr einzigartiger Replikationsmechanismus dar. Nach der erfolgreichen Infektion der Wirtszelle wird vom viralen, einzelsträngigen RNA-Genom, durch ein viruseigenes Enzym, der Reversen Transkriptase (RT), ein doppelsträngiges DNA-Molekül synthetisiert. Dieses DNA-Zwischenprodukt wird anschließend in das Wirtsgenom integriert und wird als Provirus bezeichnet (Review: Coffin *et al.* 1997).

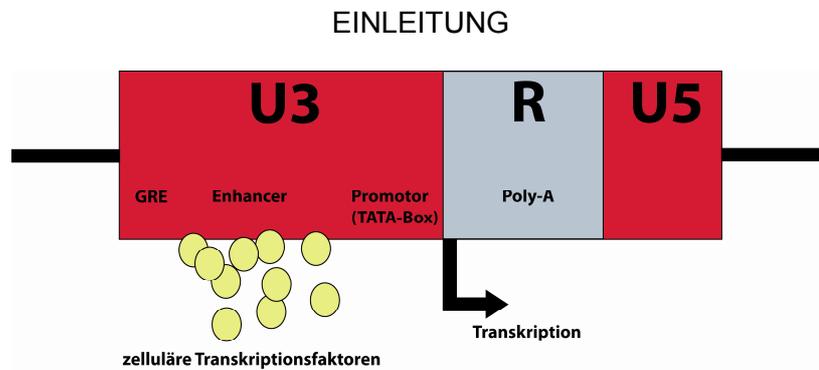
Aufgrund von Unterschieden in der Morphologie, dem Genomaufbau und des Infektionsmechanismus werden Mitglieder der *Retroviridae* in zwei Unterfamilien, den *Spumaretrovirinae* und den *Orthoretrovirinae*, unterteilt. Die *Orthoretrovirinae* gliedern sich wiederum in sechs verschiedene Gattungen, die Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- und Lentiviren. Die Unter-Familie der *Spumaretrovirinae* hingegen besteht nur aus einem einzigen Genus, den Spumaviren, oder auch Foamyviren genannt (Review: Coffin *et al.* 1997). Trotz dieser Unterteilung besitzen Retroviren im Grunde dieselbe genomische Organisation (Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines proviralen Retrovirus-Genoms.**

Die retroviralen Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env* werden von den regulatorischen LTR- („Long Terminal Repeat“) Regionen flankiert. Die LTR-Regionen werden erst nach der Reversen Transkription gebildet.

Das retrovirale Genom besteht aus den vier Hauptgenen *gag*, *pro*, *pol* und *env*. *Gag* kodiert für die Strukturproteine (Matrix-, Kapsid und Nukleokapsid Proteine). *Pro* kodiert für die virale Protease und *Pol* für die Enzyme Reverse Transkriptase, RNase H und Integrase. *Env* hingegen ist für die Bildung der Hüllproteine verantwortlich (Review: Coffin 1992). Das integrierte Provirus wird am 5'- und 3'-Ende von je einem Long Terminal Repeat (LTR) flankiert. Diese bestehen aus drei Untereinheiten (U3, R und U5) die verschiedene regulatorische Funktionen besitzen (Abb. 1.2).



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines retroviralen LTRs.**

LTRs werden in die Bereiche U3, R und U5 unterteilt. Neben dem Promotor mit der TATA-Box, dem Enhancer, einem GRE-Element („Glucocorticoid Response Element“) und diversen Transkriptionsfaktorbindestellen ist auch das Poly-Adenylierungs-Signal, welches sich im 3'-LTR befindet, angegeben. Im R-Abschnitt des 5'-LTRs befindet sich zudem der Transkriptions-Startpunkt.

Die U3-Region („unique 3'“) enthält neben Promotor- und Enhancersequenzen auch Transkriptionsfaktorbindestellen. Im R-Bereich („redundant“) am 5'-Ende des LTRs liegt der eigentliche Transkriptionsstart. Am Übergang des R-Bereiches zum U5-Bereich („unique 5'“) am 3'-Ende des LTRs befindet sich zudem noch ein Polyadenylierungssignal. Dieses dient zur Stabilisierung und zur verbesserten Translation der viralen mRNA durch das Anhängen eines poly(A)-Schwanzes. Die LTRs werden erst während der Reversen Transkription, der Umwandlung des viralen RNA-Genoms zu einem DNA-Molekül, gebildet und sind daher nur Bestandteil des proviralen DNA-Genoms. Die lineare Struktur der viralen DNA-Zwischenstufe mit den beiden flankierenden LTRs ist essentiell für deren Integration als Provirus in das Wirtsgenom (Review: Coffin *et al.* 1997).

Neben den exogenen Retroviren, dessen bekannteste Vertreter das HI-Virus 1 (HIV-1; humanes Immundefizienz-Virus) ist, existieren auch sogenannte endogene Retroviren (ERVs).

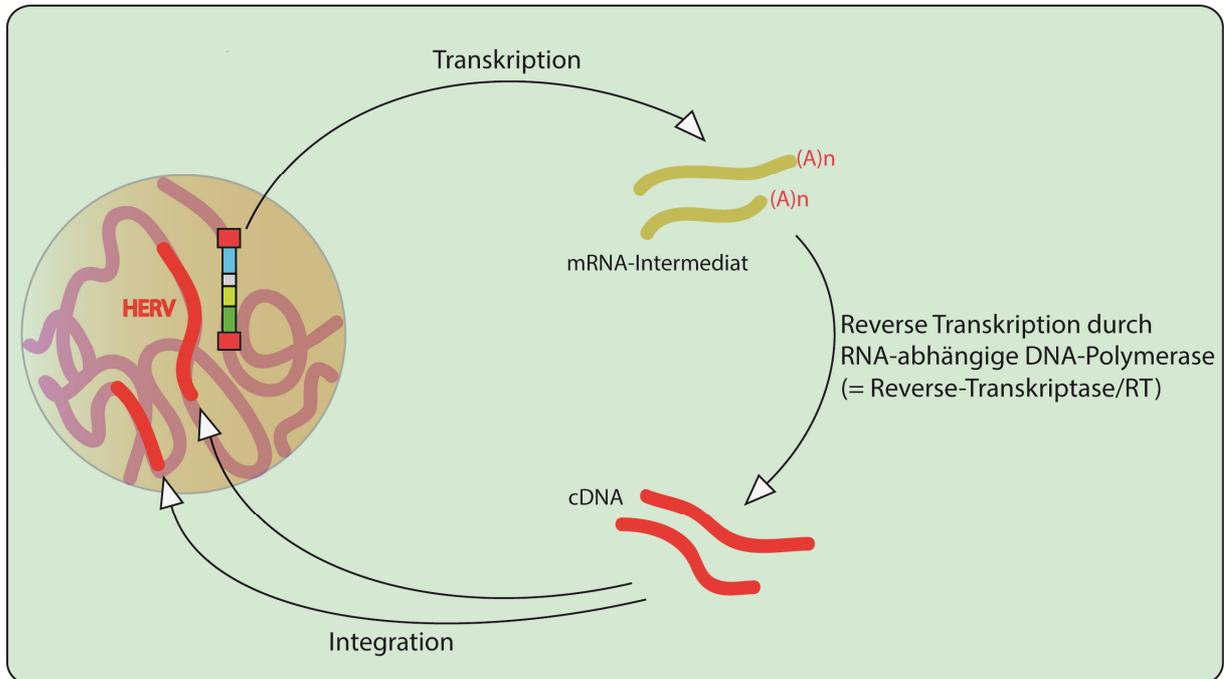
## 1.2 Humane endogene Retroviren (HERVs)

Im Zuge des Humangenomprojektes zeigte sich, dass ca. 8-9% des menschlichen Genoms aus retroviralen Sequenzen, sogenannten humanen endogenen Retroviren (HERVs), bestehen (Review: Mager *et al.* 2003). Man nimmt an, dass diese von Infektionen mit exogenen Retroviren abstammen, die zum größten Teil bereits vor ca. 150 bis 40 Millionen Jahren in Primatenvorfahren des Menschen stattfanden (Smit 1993, Review: Sverdlov 2005). Da hierbei in seltenen Fällen auch Zellen der Keimbahn infiziert wurden, konnten diese Proviren gemäß den Mendelschen Vererbungsregeln an Nachkommen weitergegeben

## EINLEITUNG

werden. Im Laufe der Zeit wurden die retroviralen Sequenzen genetisch fixiert und zu einem festen Teil des humanen Genoms (Review: Sverdlov 2005).

Der große Anteil von HERVs am menschlichen Genom ist jedoch nicht nur auf stetige Neuinfektionen mit exogenen Retroviren zurückzuführen (Belshaw *et al.* 2004). Vielmehr sind HERVs dazu in der Lage sich durch Retrotransposition innerhalb des Genoms zu vermehren (Belshaw *et al.* 2005) (Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3: Mechanismus der Retrotransposition eines HERV-Elementes.**

mRNA-Transkripte, des im Wirtsgenom integrierten HERV-Elements, werden durch die RT in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgt durch die Integrase an anderer Stelle ein erneuter Einbau in das Wirtsgenom (Abbildung modifiziert nach W. Seifarth).

Hierbei wird die mRNA eines HERV-Elementes durch eine Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben und durch ein Integrase-Enzym an anderer Stelle des Genoms integriert. Dadurch konnten Tausende Kopien einzelner HERV-Elemente im menschlichen Genom verbreitet werden.

Trotz ihres Ursprunges und dem zu exogenen Retroviren homologen genomischen Aufbau (vgl. Abb. 1.1/1.2) sind HERVs normalerweise nicht mehr in der Lage zu retrotransponieren oder infektiöse Viruspartikel zu bilden. Dies liegt vor allem daran, dass im Laufe der Evolution die Gene der HERVs im Gegensatz zu tierischen ERVs durch Mutationen, Deletionen und Insertionen so verändert wurden, dass diese meist nicht mehr für funktionelle Proteine kodieren. Dennoch konnte in diversen Publikationen gezeigt werden, dass viele HERV-Elemente immer noch transkribiert werden und einige auch noch für funktionale Proteine kodieren (Stauffer *et al.* 2004, Forsman *et al.* 2005, Seifarth *et al.* 2005, Muradrasoli

*et al.* 2006). Manche dieser HERV-Proteine haben sogar essentielle zelluläre Funktionen übernommen (Review: Dupressoir *et al.* 2012).

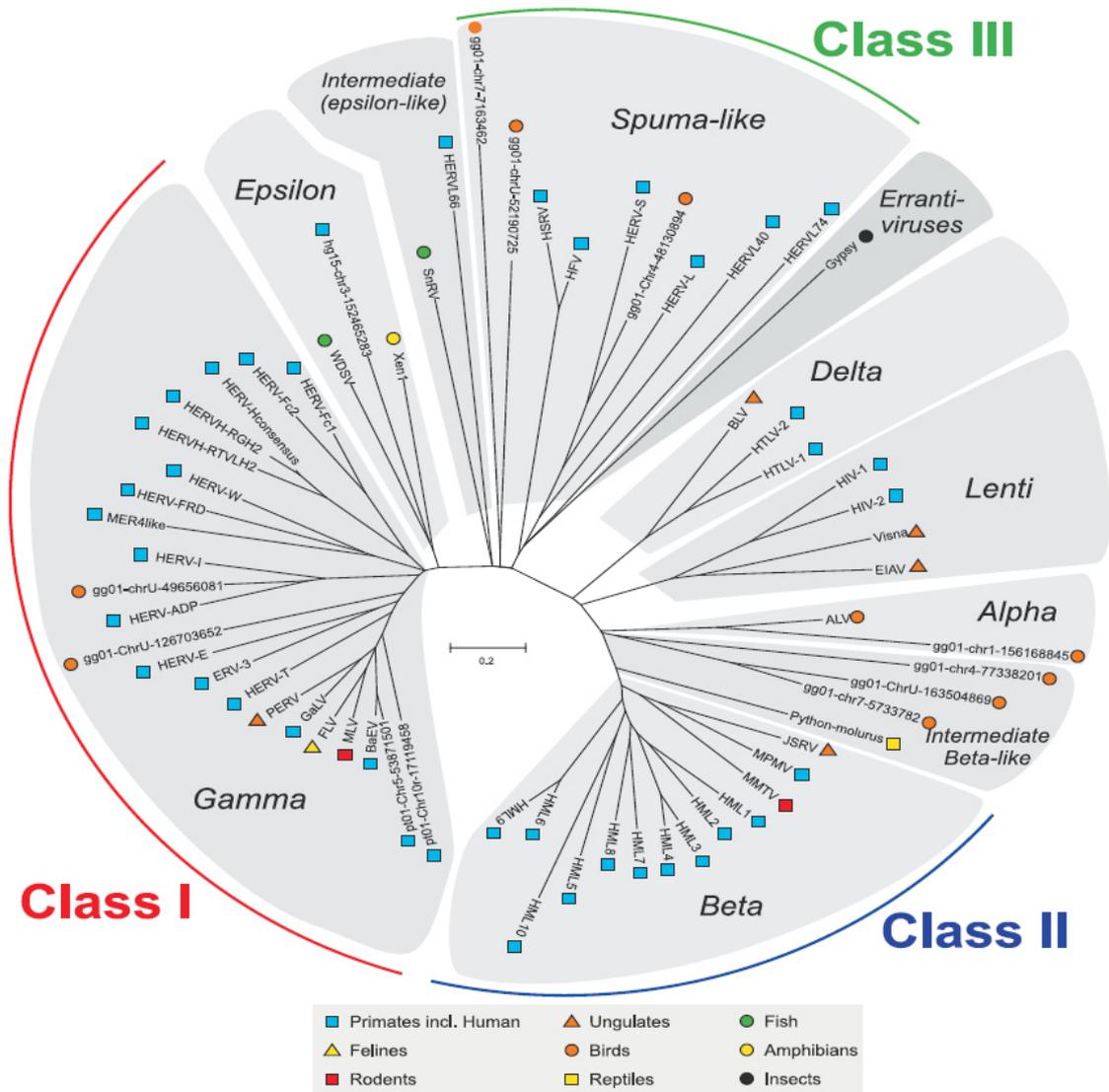
### 1.3 Klassifizierung und Nomenklatur von HERVs

HERVs werden analog zu exogenen Retroviren in drei Klassen unterteilt, den Gamma-Retroviren (Klasse I), den Beta-Retroviren (Klasse II) und den Spumavirus-Verwandten Viren (Klasse III). Diese Einteilung erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien im *pol*-(RT)-Bereich zu dem exogener Retroviren, da dieser als der am besten konservierte, retrovirale Genombereich gilt (Xiong *et al.* 1988, Review: Griffiths 2001, Review: Mager *et al.* 2003). Ein typischer exogener Vertreter der Gamma-Retroviren ist das murine Leukämievirus (MLV), der Beta-Retroviren das Maus-Mamma-Tumorvirus (MMTV) und der Spumavirus-Verwandten das Humane Spumaretrovirus (HSRV) (Jern *et al.* 2005). HERV-Elemente die mit den exogenen Alpha-, Delta-, Epsilon- oder Lentiviren verwandt sind, wurden bisher nicht identifiziert.

Die drei HERV-Klassen werden zudem weiter in verschiedene Gruppen (veraltet: Familien) unterteilt. Hierbei werden HERV-Elemente, gemäß der Aminosäure eingeteilt, mit der die tRNA beladen ist, die bei der cDNA-Synthese als Primer dient und an die Primerbindestelle (PBS) bindet. Dabei wird die HERV-Gruppe entsprechend dem Einbuchstabencode für Aminosäuren benannt. Bei Elementen der HERV-K Gruppe beispielweise bindet an die PBS eine mit Lysin beladene tRNA. Mittlerweile wurden jedoch auch HERV-Elemente entdeckt, die sich trotz der identischen Aminosäurebeladung der tRNA phylogenetisch unterscheiden und deshalb in verschiedene HERV-Gruppen eingeordnet werden. Somit ist die Einteilung der HERVs in die einzelnen Gruppen nicht immer nachvollziehbar und teilweise verwirrend.

**Abbildung 1.4 (auf der nächsten Seite): Einteilung der HERVs in drei Klassen (Jern *et al.* 2005).** Gezeigt ist die Verwandtschaft von exogenen und endogenen Retroviren anderer Spezies mit HERVs.

## EINLEITUNG



## 1.4 Repräsentative HERV-Gruppen

### 1.4.1 HERV-W

Die HERV-W Gruppe wird zur HERV-Klasse I gezählt und besitzt daher Sequenzähnlichkeiten zu Gammaretroviren. Elemente dieser Gruppe wurden erstmals im Plasma von Multiple Sklerose (MS) Erkrankten entdeckt und daher anfänglich als Multiple Sklerose assoziiertes Retrovirus (MSRV) bezeichnet (Perron *et al.* 1997, Blond *et al.* 1999). Der Großteil der HERV-W Elemente sind sogenannte solitäre LTRs (ca. 1100), die durch Rekombination aus einem Provirus entstanden sind und somit nur aus einem LTR bestehen (Review: Mager *et al.* 2003). Des Weiteren existieren ca. 650 provirale HERV-W Loci, von

## EINLEITUNG

denen jedoch fast alle aufgrund von Deletionen, Punktmutationen und Insertionen defekt sind. Bei 180 dieser Elemente fehlen zudem die U3-Region des 5'- und die U5-Region des 3'-LTRs, oder gar größere Sequenzbereiche im 5'-Bereich des proviralen Genoms. Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese Elemente durch eine L1-vermittelte („Long interspersed element (LINE) -1“) Retrotransposition im humanen Genom verbreitet wurden. Bei L1-Elementen handelt es sich um eine Gruppe von Retrotransposons, die zwar keine LTR-Regionen besitzen aber für eine aktive RT kodieren (Costas 2002, Pavlicek *et al.* 2002, Review: Mager *et al.* 2003, Belshaw *et al.* 2005, Schmitt *et al.* 2013).

Dennoch kann es zur Transkription und teilweise auch zur Translation einiger HERV-W Elemente kommen. So konnte die Arbeitsgruppe um Seifarth *et al.* bei der Untersuchung der HERV-Transkription mittels HERV-spezifischen Microarrays in 17 von 19 verschiedenen humanen Geweben HERV-W Transkripte nachweisen (Seifarth *et al.* 2005). Es ist ebenfalls belegt, dass ein HERV-W Element auf Chromosom 7 für ein intaktes, 80 kDa großes Env-Protein kodiert. Dieses Protein, auch als Syncytin-1 bekannt, vermittelt die Zell-Zellfusion von Cytotrophoblasten zu Syncytiotrophoblasten der Plazenta und trägt somit maßgeblich zur Palzentabildung bei (Blond *et al.* 2000, Mi *et al.* 2000, Frendo *et al.* 2003).

### 1.4.2 HERV-E

Ein weiterer Vertreter der HERV-Klasse I ist die HERV-E Gruppe, die ca. 250 provirale Elemente und gut 1000 solitäre LTRs umfasst (Review: Mager *et al.* 2003) und erstmals 1981 von Martin *et al.* beschrieben wurde (Martin *et al.* 1981). Es gibt Hinweise darauf, dass HERV-E Env-Proteine, ähnlich wie Env-Proteine der HERV-W Gruppe, eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Plazenta spielen könnten, da sie ebenfalls in Syncytiotrophoblasten und dem vaskulären Endothel exprimiert werden (Kitamura *et al.* 1994). Eine weitere wichtige Rolle von HERV-E Elementen ist, dass sie nachweislich an der Regulation humaner Gene beteiligt sind (Schulte *et al.* 1996, Schulte *et al.* 2000, Landry *et al.* 2003, Gosenca *et al.* 2012). So konnte gezeigt werden, dass ein HERV-E Element die gewebespezifische Expression des Amylasegens in den Speicheldrüsen steuert (Ting *et al.* 1992).

### 1.4.3 ERV-9

Die Gruppe ERV-9 gehört ebenfalls zur HERV-Klasse I und besteht aus bis zu 300 proviralen und etwa 5000 solitären LTR-Elementen (Review: Mager *et al.* 2003). Sie wurde erstmals 1991 in einer humanen embryonalen cDNA Bibliothek nachgewiesen (La Mantia *et*

## EINLEITUNG

*al.* 1991). Mittlerweile ist bekannt, dass ERV-9 Elemente in fast allen humanen Gewebearten transkriptionell aktiv sind und teilweise eine Auswirkung auf die Expression zelluläre Gene haben können (Seifarth *et al.* 2005). So steht die Expression des Zinkfingergens *ZNF80* unter der Kontrolle eines vorgeschalteten ERV-9 LTRs (Di Cristofano *et al.* 1995).

### 1.4.4 HERV-K

HERV-K Elemente gehören zur HERV-Klasse II, den Beta-Retrovirus-verwandten HERVs, und wurden 1982 von Callahan *et al.* erstmals beschrieben, als eine mit MMTV verwandte, provirale Sequenz aus dem humanen Genom isoliert wurde (Callahan *et al.* 1982). HERV-K wird in zehn Gruppen (HML-1 bis HML-10) aufgrund von Sequenzhomologien unterteilt (Medstrand *et al.* 1993, Andersson *et al.* 1999). Die Bezeichnung HML leitet sich hierbei aus der vorher genannten Sequenzhomologie zum MMTV her und steht sinngemäß für „human endogenous mouse mammary tumor virus (MMTV)-like“ (Medstrand *et al.* 1993). Es existieren ca. 6400 solitäre HERV-K LTRs und mindestens 550 provirale HERV-K Loci (Review: Mager *et al.* 2003). Der Großteil der HERV-K(HML) Gruppen ist zudem in einer Vielzahl von menschlichen Gewebetypen transkriptionell aktiv (Medstrand *et al.* 1993, Seifarth *et al.* 2005). Zwei der wichtigsten und am besten untersuchten HML-Gruppen sind hierbei HML-2 und HML-6.

#### 1.4.4.1 HML-2

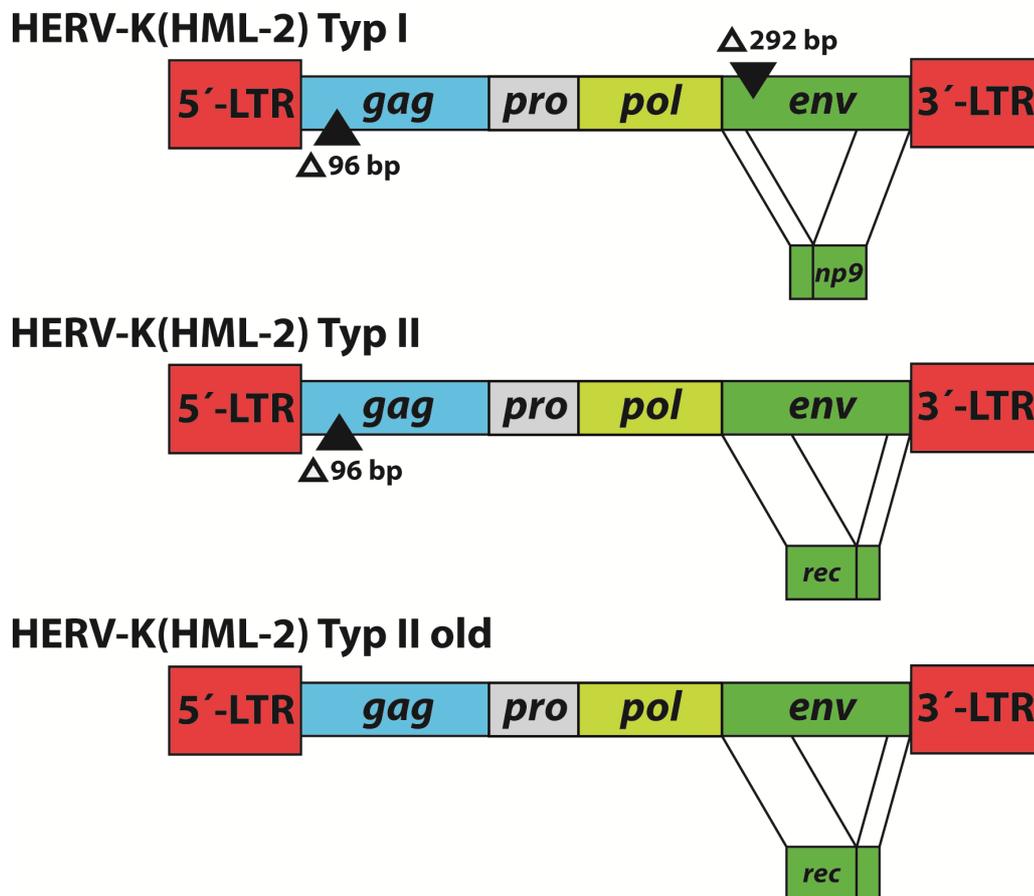
Die HML-2 Gruppe ist die mit Abstand Interessanteste, da sie neben älteren Elementen, die bereits vor ca. 35 Millionen Jahren endogenisiert wurden, die evolutionär jüngsten Proviren aufweist. Deshalb besitzen HML-2 Elemente häufig noch intakte offene Leserahmen (ORFs) für alle retroviralen Gene (Löwer *et al.* 1993, Mayer *et al.* 1998, Belshaw *et al.* 2005, Subramanian *et al.* 2011). Aufgrund dessen kann in Teratokarzinom- und Melanom-Zelllinien die Entstehung von nicht-infektiösen retroviralen Partikel beobachtet werden (Boller *et al.* 1993, Löwer *et al.* 1993, Bieda *et al.* 2001, Muster *et al.* 2003, Buscher *et al.* 2005). Insgesamt sind bisher ca. 91 provirale Elemente und 944 solitäre HML-2 LTRs bekannt (Subramanian *et al.* 2011). Ca. 27 dieser HML-2 Elemente liegen in der menschlichen Population polymorph vor (Hughes *et al.* 2004, Macfarlane *et al.* 2004, Belshaw *et al.* 2005, Review: Moyes *et al.* 2007, Marchi *et al.* 2014, Wildschutte *et al.* 2014). Dies bedeutet, dass diese Elemente nicht bereits vor Jahrmillionen in das Genom von Primatenvorfahren des Menschen integrierten, sondern erst deutlich später, nachdem sich die Hominidenlinie

## EINLEITUNG

bereits von der Schimpansenlinie abgespalten hatte. Ob in der menschlichen Population heute noch ein infektiöses HML-2 Virus existiert ist nicht bekannt, jedoch denkbar. So gelang es zwei Arbeitsgruppen durch die Einführung weniger Mutationen ein HML-2 Element *in vitro* so zu verändern, dass es zur Bildung voll funktionsfähiger, infektiöser retroviraler HML-2 Partikel kam (Dewannieux *et al.* 2006, Lee *et al.* 2007).

Die HML-2 Gruppe wird zudem in zwei verschiedene Typen unterteilt. Typ II Elemente exprimieren das akzessorische Protein Rec (früher cORF), das funktionelle Ähnlichkeiten zum HTLV (humanes T-Zell-Leukämie-Virus) Protein Rex und zum HIV-1 Protein Rev aufweist (Magin *et al.* 1999, Macfarlane *et al.* 2004). Typ I Proviren besitzen hingegen eine 292-bp große Deletion im *env*-Genabschnitt, wodurch kein Rec exprimiert werden kann. Stattdessen wird das alternative Protein Np9 gebildet (Ono *et al.* 1986; Armbruster *et al.* 2002). Beide Proteine sind möglicherweise bei der Entstehung von diversen Krebs-Erkrankungen beteiligt (Review: Hohn *et al.* 2013).

Durch ein weiteres, evolutionär bedingtes Deletionsereignis unterscheidet man zwischen einer alten und einer modernen Typ-II-Variante. Die moderne Variante weist im *gag*-Bereich des proviralen Genoms eine 96 bp große Deletion auf. Alle im Menschen polymorph vorliegenden Elemente gehören zur modernen, also evolutionär jüngeren HML-2 Variante (Mayer *et al.* 1998, Reus *et al.* 2001).



## EINLEITUNG

### **Abbildung 1.5 (auf der vorhergehenden Seite): Schematischer Aufbau der proviralen Retrovirus-Genome verschiedener HERV-K(HML-2) Typen.**

Die Typ I Proviren der HERV-K(HML-2) Gruppe weisen eine 292 bp große Deletion ( $\Delta$  292 bp) im *env*-Gen auf und kodieren dadurch für das Protein Np9. Bei Typ II Proviren fehlt diese Deletion, wodurch es zur Bildung des Rec-Proteins kommen kann. Zusätzlich werden bei den Typ II Elemente zwischen einer evolutionär jüngeren (HERV-K(HML-2) Typ II) und einer evolutionär älteren Variante (HERV-K(HML-2) Typ II old; häufig HERV-K(OLD) genannt) unterschieden. In der jüngeren Variante liegt im Gegensatz zur Älteren eine 96 bp große Deletion ( $\Delta$  96 bp) im *gag*-Bereich vor.

#### **1.4.4.2 HML-6**

Retrovirale Elemente der HML-6 Gruppe wurden erstmals 1993 durch Medstrand *et al.* in humanen Lymphozyten nachgewiesen (Medstrand *et al.* 1993). Man geht davon aus, dass im humanen Genom ca. 50 provirale Kopien und rund 400 solitäre LTRs existieren (Review: Mager *et al.* 2003). HML-6 Transkripte konnten bisher in einer Vielzahl humaner Gewebearten, wenn auch mit unterschiedlichen Aktivitätsgraden, detektiert werden (Medstrand *et al.* 1993, Okahara *et al.* 2004, Seifarth *et al.* 2005). Insgesamt ist bisher relativ wenig über die HML-6 Gruppe bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass eine Aktivität der HML-6 Gruppe von klinischer Relevanz sein könnte. So wurden in einigen Brustkrebspatientinnen generell erhöhte HML-6 Transkriptzahlen, und/oder erhöhte Transkriptzahlen einzelner HML-6 Elemente beobachtet (Yin *et al.* 1999, Frank *et al.* 2008).

#### **1.4.5 HERV-L**

Die HERV Klasse III, zu der die HERV-L Gruppe gezählt wird, ist mit einem geschätzten Alter von ca. 100-150 Millionen Jahren die evolutionär älteste HERV-Klasse (Smit 1993, Benit *et al.* 1999). Das erste HERV-L Element wurde 1995 von Cordonnier *et al.* beschrieben (Cordonnier *et al.* 1995). Heute schätzt man, dass im menschlichen Genom mindestens 6000 solitäre LTRs und 200 provirale Kopien vorliegen (Review: Mager *et al.* 2003). Die Transkription von HERV-L Elementen scheint gewebespezifisch reguliert zu sein, da Seifarth *et al.* mittels HERV-spezifischen Microarrays, HERV-L Transkripte nur im Gewebe der Haut, der Plazenta, der Schilddrüse, des Uterus und des Zervix nachweisen konnten (Seifarth *et al.* 2005). Dementsprechend zeigen auch transfizierte HERV-L LTRs in Haut-, Uterus- und Zervix-Zelllinien eine besonders hohe Promotor- und/oder Enhanceraktivität (Schön *et al.* 2009). Auch die gewebespezifische Expression des  $\beta$ -Galaktosyltransferasegens ( $\beta$ -3GAL-T5) im Darm wird durch ein HERV-L LTR vermittelt (Dunn *et al.* 2003, Dunn *et al.* 2005).

## 1.5 Einfluss von HERVs auf die Wirtsgenexpression

Im humanen Genom existieren Zehntausende von HERV-LTRs, die, aufgrund der in ihnen enthaltenen regulatorischen Elemente (vgl. Abb. 1.2), die Expression benachbarter zellulärer Gene beeinflussen können. Dies kann durch mehrere verschiedene Mechanismen geschehen (Review: Mager *et al.* 2003).

### 1.5.1 Promotorfunktion

HERV-LTRs dienen nicht nur als Promotoren retroviraler HERV-Gene, sondern können auch die Expression zellulärer Wirtsgene beeinflussen. Hierbei können sowohl der 5'- als auch der 3'-LTR eines HERV-Elements, sowie solitäre LTRs, die Transkription benachbarter Gene induzieren (Medstrand *et al.* 2001, Landry *et al.* 2002). Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Expression des Apolipoproteins CI (APOC1) in der Leber durch ein 300 bp entferntes, dem nativen Promotor des Gens vorgeschalteter, solitärer HERV-E LTR. Hierbei dient der LTR nicht als Enhancer, sondern als alternativer Promotor, der zusätzlich zum nativen Promotor aktiv ist und für ca. 15% der gesamten *APOC1*-Transkription verantwortlich ist (Medstrand *et al.* 2001).

### 1.5.2 Enhancerfunktion

HERV-LTRs können auch eine Enhancerfunktion übernehmen, wodurch eine gewebespezifische Expression von zellulären Genen vermittelt werden kann. Diese wird häufig durch die Bereitstellung von Transkriptionsfaktorbindestellen innerhalb des HERV-LTRs reguliert (vgl. Abb.1.2). Neben der oben beschriebenen Speicheldrüsen-spezifischen Expression des Amylase-Gens (vgl. 1.4.2) wird auch das Hormon Leptin, welches hauptsächlich in Adipozyten gebildet wird, unter der Kontrolle eines solitären HERV-K(HML-8) LTRs (MER11A) in der Plazenta exprimiert. Die Enhancerfunktion wird dabei durch drei unabhängige Protein-Bindedomänen, die innerhalb eines 60 bp großen regulatorischen DNA-Abschnittes des LTRs lokalisiert sind, vermittelt. An diese können Transkriptionsfaktoren wie SP1 sowie plazentaspezifische Faktoren binden (Bi *et al.* 1997).

### 1.5.3 Alternatives Spleißen

Ein weiterer Mechanismus, wie HERVs die Expression zellulärer Gene modulieren bzw. beeinflussen können, ist über alternatives Spleißen. Die meisten HERV-Elemente besitzen in ihrem 5'-LTR eine starke Spleißdonor-Stelle (SD) die normalerweise für das subgenomische Spleißen der *env*-Transkripte essentiell ist. Aufgrund von Mutationen oder Deletionen innerhalb der DNA-Sequenz des dazugehörigen retroviralen Spleißakzeptors (SA), kann es zu alternativem Spleißen kommen (Revie: Mager *et al.* 2003). Hierbei wird statt des eigentlichen viralen SA eine SA-Stelle innerhalb des Exons eines abwärtsgelegenen zellulären Gens verwendet, wodurch es zur Entstehung von Hybridtranskripten kommt. So wurde in der Prostatakarzinom Zelllinie PC3 ein alternativ gespleißtes Transkript des zytosolischen Calcium-bindenden-Proteins Calbindin entdeckt (Liu *et al.* 1991). Ein ca. 7 kb aufwärts gelegener 5'-LTR eines HERV-H Elementes spleißt hierbei an das zweite Exon des Calbindin-Gens (*CALB1*). Dadurch kommt es zur Bildung eines verkürzten HERV-H-Calbindin Fusionsproteins, das möglicherweise zum malignen Phänotyp der PC3-Krebszelllinie beitragen könnte (Gebefügi, unpubliziert).

### 1.5.4 Intergenes Spleißen

Beim intergenen Spleißen kommt es zur Entstehung eines Hybridtranskriptes zweier benachbarter zellulärer Gene, die normalerweise nicht in Verbindung zueinander stehen. Dies wird häufiger in humanen Tumoren beobachtet, bedingt durch die allgemeine genetische Instabilität entarteter Zellen. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Fusion der *BCR* (Bruchpunkt Cluster Region) und *ABL* (Abelson murines leukämisches virales Onkogen-Homolog 1) Gene (auch als „Philadelphia-Chromosom“ bekannt) in chronisch myeloischer Leukämie (CML) (Nowell *et al.* 1960). Seltener kann auch durch ein HERV-Element intergenes Spleißen ausgelöst werden. So ist bekannt, dass das in Teratokarzinom-Zellen entdeckte PLA2L-Hybridtranskript, das aus Exons des *HHLA1* (HERV-H LTR assoziiertes 1) Gens und des benachbarten *OC90* (Otoconin-90) Gens besteht, von einem stromaufwärts gelegenen HERV-H LTR-Promotor aus initiiert wird (Feuchter-Murthy *et al.* 1993, Kowalski *et al.* 1999). Normalerweise werden *HHLA1* und *OC90* unabhängig voneinander von zwei unterschiedlichen zellulären Promotoren aus exprimiert (Kowalski *et al.* 1999).

### 1.5.5 Polyadenylierung

Neben der Steuerung der Transkription einzelner Wirts-Gene, können HERV-LTRs auch die 3'-Enden von nicht-viralen, zellulären Transkripten mittels Polyadenylierung prozessieren. Dabei werden mehrere Adenin-Nukleotide durch die Poly(A)-Polymerase an die 3'-Enden von prä-mRNAs gehängt (der sogenannte Poly(A)-Schwanz). Dieser führt zur Stabilisierung von mRNAs und trägt zur Verbesserung der Translation bei. Um eine Polyadenylierung zu initiieren werden Polyadenylierungssignale, also spezielle DNA-Sequenzmotive benötigt, die ebenfalls in den LTRs von HERV-Elementen zu finden sind (vgl. Abb. 1.2).

Liegen HERV-Elemente innerhalb von Introns zellulärer Gene, kann es, durch eine HERV vermittelte Polyadenylierung, zu einem verfrühten Abbruch der Transkription des Genes kommen, indem einige zelluläre Exons durch Sequenzbereiche des LTRs und das Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes ersetzt werden. Die so verkürzten zellulären mRNAs können wiederum in Proteine translatiert werden, die andere Funktionen aufweisen als das Wildtyp-Protein. Als Beispiel zu nennen ist hier das *LEPR* (Humaner Leptin Rezeptor) -Gen, dessen Transkription teilweise vorzeitig durch ein HERV-K(HML-2) Element abgebrochen wird (Kapitonov *et al.* 1999). Das in die *LEPR*-Gensequenz integrierte retrovirale Element führt dazu, dass das Exon 20 des *LEPR* durch 67 Aminosäuren der HML-2 LTR-Region ersetzt wird. Das längere Wildtyp LEPR-Protein liegt membrangebunden vor und spielt eine wichtige Rolle im JAK/STAT-Signalweg, während das verkürzte Protein dazu nicht mehr in der Lage ist. Vielmehr nimmt man an, dass es als lösliches Protein für den Transfer, die Beseitigung und die Konzentrationsregulation des freien Leptins im Blut notwendig ist (Kapitonov *et al.* 1999).

Des Weiteren sind eine Vielzahl polyadenylierter, zellulärer Transkripte bekannt, deren Expression von HERV-LTRs vermittelt wird, deren Funktion aber noch unklar ist, da sie keine Geninformationen tragen und somit zu den nichtkodierenden RNAs (ncRNAs) gezählt werden (Mager 1989, Tomita *et al.* 1990, Goodchild *et al.* 1992, Baust *et al.* 2000).

### 1.5.6 Nichtkodierende RNAs (ncRNAs)

Der Großteil (ca. 98%) humaner RNAs bestehen aus sogenannten ncRNAs (Mattick 2001). Unter ihnen befinden sich zum Beispiel rRNAs, tRNAs, aber auch regulatorische RNAs wie miRNAs, siRNAs, piRNAs, snoRNAs, etc. (Girard *et al.* 2006, Review: Witzany 2009). Man vermutet, dass eine Vielzahl der natürlichen ncRNAs von HERV-Elementen stammen, die z.B. über RNA-Interferenz (RNAi) oder mittels epigenetischer Modulation, die Expression und

## EINLEITUNG

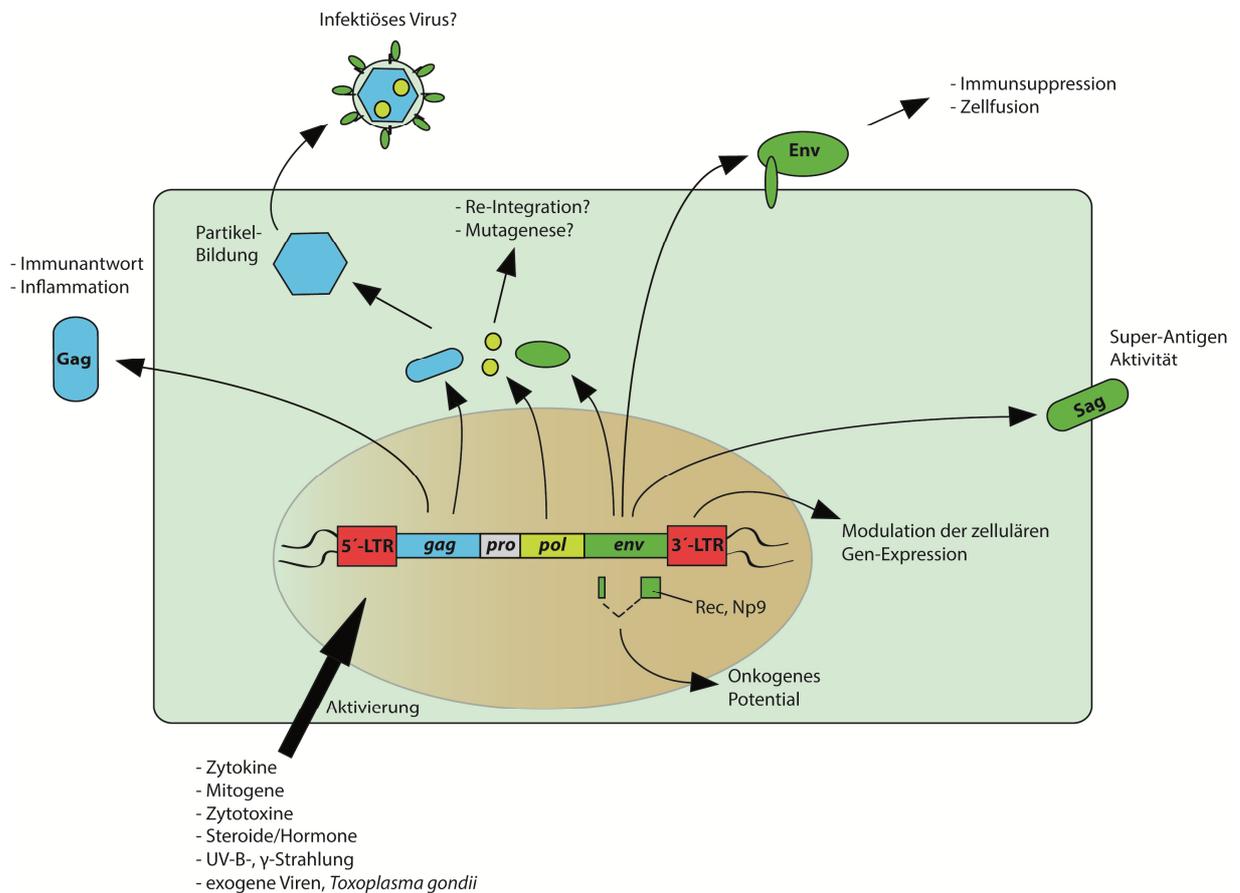
Translation zellulärer Gene regulieren (Conley *et al.* 2008, Gosenca *et al.* 2012, Ha *et al.* 2014).

Gosenca *et al.* identifizierten in Karzinomzellen des Urothels eine antisense ncRNA die antagonistisch die Transkription des *PLA2G4A* (Phospholipase A2, Gruppe IVA) -Gens, welches für die zytosolische Phospholipase A2 (cPLA2) kodiert, reguliert. Die ncRNA wird dabei von einem HERV-E Element gebildet, welches in umgekehrter Orientierung innerhalb des *PLA2G4A*-Gens liegt (Gosenca *et al.* 2012).

### 1.6 HERVs und ihre Rolle in humanen Erkrankungen

Die Aktivität von HERVs wird mit einer ganzen Reihe von humanen Erkrankungen in Verbindungen gebracht: Autoimmunerkrankungen, Erkrankungen des zentralen Nervensystems und Krebs (Review: Portis 2002, Review: Colmegna *et al.* 2006, Review: Moyes *et al.* 2007, Review: Balada *et al.* 2009, Review: Perron *et al.* 2010, Review: Christensen 2010, Review: Romanish *et al.* 2010, Review: Antony *et al.* 2011, Review: Mullins *et al.* 2012). Zwar ist ein Großteil von HERV-Elementen aufgrund von Mutationen, Insertionen und Deletionen, aber auch epigenetischen Faktoren wie repressiver DNA-Methylierung oder verschiedener Chromatinmodifikationen inaktiv (Mikkelsen *et al.* 2007, Reiss *et al.* 2007, Maksakova *et al.* 2008, Stengel *et al.* 2010), dennoch können einige HERV-Elemente Transkripte, virale Proteine oder sogar retrovirale Partikel bilden (Faff *et al.* 1992, Boller *et al.* 1993, Ruprecht *et al.* 2008). Transkriptionell inaktive HERVs können außerdem durch diverse äußere Einflüsse (re-)aktiviert werden. So ist bekannt, dass Zytokine, Mitogene, Toxine, Steroidhormone aber auch Infektionen mit exogenen Retroviren, wie z.B. HIV-1, CMV (Cytomegalievirus), oder auch Umwelteinflüsse wie UVB- oder Röntgenstrahlung zu einer verstärkten Transkription ganzer HERV-Gruppen, sowie einzelner proviraler Elemente in diversen Gewebetypen führen können (vgl. Abbildung 1.6) (Hohenadl *et al.* 1999, Sutkowski *et al.* 2001, Review: Balada *et al.* 2009, Toufaily *et al.* 2011, Lee *et al.* 2012, Agoni *et al.* 2013, Assinger *et al.* 2013, Gonzalez-Hernandez *et al.* 2014, Vincendeau *et al.* 2014 unter Revision).

## EINLEITUNG



**Abbildung 1.6: HERV-vermittelte Mechanismen die zur Entstehung von Krankheiten beitragen können.**

Inaktive HERV-Elemente können durch verschiedene Stimuli reaktiviert werden. Dargestellt sind die daraus resultierenden Mechanismen die zur Entstehung von Krankheiten führen können (Abbildung nach Review: Moyes *et al.* 2007 verändert).

### 1.6.1 HERVs und neurologische Erkrankungen

Neurologische Erkrankungen wie Multiple Sklerose (MS) oder psychische Störungen wie Schizophrenie und bipolare Störungen sind sehr komplexe Krankheiten, deren Entstehung bis heute nicht gänzlich geklärt ist. Neben genetischen Ursachen und Umwelteinflüssen wird auch eine Dysregulation von HERV-Elementen als möglicher Auslöser dieser Erkrankungen vermutet (Review: Yolken *et al.* 1995, Review: Yolken *et al.* 2000, Review: Christensen 2010, Review: Douville *et al.* 2014).

Tatsächlich können bei psychischen Erkrankungen diverse Hinweise für eine Beteiligung von HERV-Elementen gefunden werden. Neben einer erhöhten Transkription der HERV-K(HML-2) und ERV-9 Gruppen wird vor allem eine aberrante Expression der HERV-W Gruppe häufiger in psychisch Erkrankten beobachtet (Karlsson *et al.* 2001, Frank *et al.* 2005, Huang *et al.* 2006). So sind in *post mortem* Gehirn-Biopsien von an Schizophrenie, bzw. an

## EINLEITUNG

bipolarer Störung leidenden Erkrankten, deutlich weniger HERV-W Gag-Proteine enthalten, als in Gehirnproben einer gesunden Kontrollgruppe (Weis *et al.* 2007). Karlsson *et al.* hingegen zeigten, dass sich im Blutplasma von Patienten mit Erstdiagnose erhöhte HERV-W Transkriptzahlen nachweisen lassen (Karlsson *et al.* 2004).

In Gehirnbiosien als auch in PBMCs („peripheral blood mononuclear cells“) von MS Patienten lässt sich ebenfalls eine erhöhte HERV-W *env*-Transkriptionsaktivität feststellen (Mameli *et al.* 2007). Auch die Expression des Syncytin-1 Proteins, das von einem HERV-W Element kodiert wird (vgl. 1.4), kann in transgenen Mausmodellen unter anderem zur Demyelinisierung und zum Verlust von Oligodendrocyten führen, bzw. eine Entzündungsreaktion verursachen (Antony *et al.* 2004, Antony *et al.* 2007). Bei MS handelt es sich aber nicht nur um eine neurologische Erkrankung sondern auch um eine Autoimmunerkrankung.

### 1.6.2 HERVs und Autoimmunerkrankungen

Die Annahme, dass HERVs an der Ätiopathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind, gründet hauptsächlich auf der Entdeckung, dass sich retrovirale Antigene oder retrovirale Antikörper häufig im Erkrankungsherd betroffener Patienten nachweisen lassen. Man vermutet, dass HERVs über verschiedene Mechanismen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie MS oder Lupus, beitragen können. Ein denkbarer Mechanismus ist, dass exprimierte retrovirale Proteine oder Partikel, aufgrund der sogenannten molekularen Mimikry, eine Autoimmunreaktion auslösen. Molekulare Mimikry wird häufig von pathogenen Bakterien, Viren und Parasiten genutzt, um einer Immunantwort des Wirtes zu entgehen. Hierbei weisen Proteine/Moleküle der Pathogene Strukturähnlichkeiten zu bestimmten wirtseigenen Proteinen/Molekülen auf, wodurch diese als körpereigen angesehen und unter anderem nicht durch das Immunsystem des Wirtes angegriffen werden (Review: Elde *et al.* 2009). Die Expression immunogener HERV-Proteine, die aufgrund molekularer Mimikry Strukturähnlichkeiten zu zellulären Proteinen aufweisen, aber vom Immunsystem als fremd angesehen werden, könnten andererseits Kreuzreaktionen auslösen. Immunzellen, die gegen die HERV-Proteine gerichtet sind, könnten dann auch die zu den HERV-Proteinen ähnlichen zellulären Proteine attackieren.

So weist das erste in Lupus erythematoses entdeckte Autoantigen U1snRNP, ein Protein des Spleißosoms, eine hohe Homologie und immunologische Kreuzreaktivität zu konservierten p30 Gag-Proteinen von Klasse I HERVs auf (Query *et al.* 1987). Gegen das p30 Gag-Protein gerichtete Antikörper könnten so fälschlicherweise auch das U1snRNP

## EINLEITUNG

Antigen binden, wodurch dann eine Immunantwort bzw. Entzündungsreaktion ausgelöst wird.

Desweiteren könnte eine Expression von HERVs Auswirkungen auf die Regulation des Immunsystems selbst haben. Eine Vielzahl von HERV-Elementen liegt in Sequenzabschnitten von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) -Genen (Review: Andersson *et al.* 1998, Kulski *et al.* 1999). MHC-Proteinkomplexe sind körpereigene Antigene, die auf der Oberfläche von Zellen lokalisiert sind und essentiell für die Unterscheidung zwischen fremden und körpereigenen Zellen durch das Immunsystem sind. Ein Einfluss auf die Expression der MHC-Proteine durch HERV-LTRs könnte Autoimmunreaktionen induzieren.

Manche HERV-Peptide könnten auch als Superantigene (SAG) wirken, die eine starke Aktivierung von T-Lymphozyten bewirken, wodurch es zu einer unkontrollierten Zytokinfreisetzung und dadurch zu einer zellschädigenden Entzündungsreaktion kommt (vgl. Abb. 1.6). Conrad *et al.* identifizierten in Typ-I-Diabetes Patienten ein in den Langerhans-Inseln der Pankreas exprimiertes HERV-K18 Env-Protein (IDDMK<sub>1,2</sub>22) (Conrad *et al.* 1997). Durch eine Interferon- $\alpha$  vermittelte Überexpression des Proteins können verschiedene Subtypen von T-Lymphozyten stimuliert werden, die möglicherweise eine Insulinitis verursachen (Luppi *et al.* 2000, Stauffer *et al.* 2001). Im Zuge dieser Entzündungsreaktion könnten die insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans-Inseln zerstört werden.

### 1.6.3 HERVs und Tumorerkrankungen

Seit der Entdeckung des Rous-Sarkoma Virus (RSV) durch Francis Peyton Rous weiß man, dass Retroviren onkogenes Potential besitzen und Krebs verursachen können (Rous 1910, Rous 1911). Mittlerweile sind auch humanpathogene exogene Retroviren, wie HTLV-1, HTLV-2 und HIV-1 bekannt. Die nahe Verwandtschaft und die hohe Sequenzhomologie verschiedener HERV-Gruppen zu den in Mäusen Tumor-induzierenden exogenen Retroviren MMTV und MLV legen nahe, dass auch HERVs als Tumorausache in Frage kommen könnten. Tatsächlich wird in vielen Tumorzelllinien und in verschiedenen Tumorarten wie Leukämien, Melanomen, Keimbahnzelltumoren, aber auch Mammakarzinomen eine erhöhte Expression von RNA und Proteinen verschiedener HERV-Gruppen beobachtet (Review: Brodsky *et al.* 1993, Muster *et al.* 2003, Menendez *et al.* 2004, Büscher *et al.* 2006, Frank *et al.* 2008, Contreras-Galindo *et al.* 2008, Golan *et al.* 2008, Review: Ruprecht *et al.* 2008, Review: Romanish *et al.* 2010). Wieso es genau zu einer Aktivierung von HERV-Elementen in Tumorerkrankungen kommt, ist noch nicht ganz klar, jedoch gibt es Hinweise für eine Aktivierung durch epigenetische Veränderungen (Review: Romanish *et al.* 2010, Goering *et al.*

## EINLEITUNG

*al.* 2011, Trejbalova *et al.* 2011). So wird häufiger eine Demethylierung von HERV-Elementen in malignen Zellen, wie z.B. in Hals-Kopf-Karzinomen, beobachtet (Szapkowski *et al.* 2009). Bis heute ist auch unklar, ob HERVs die Entstehung von Tumoren induzieren können oder nur durch die Vermittlung von Selektionsvorteilen zur Entwicklung und Ausbreitung von Tumoren beitragen. Insgesamt sind mehrere Mechanismen denkbar, wie HERVs die Entstehung von Tumoren begünstigen oder auslösen können.

### **1.6.3.1 Mechanismen der HERV-vermittelten Tumorentstehung**

#### **1.6.3.1.1 Insertionsmutagenese**

Durch die Retrotransposition retroviraler Elemente können zelluläre Gene abgeschaltet oder aber auch ihre Expression induziert werden. So kann die Integration eines HERV-Elements in die DNA-Sequenz eines Tumorsuppressorgens zu dessen Inaktivierung führen, da z.B. dessen ORF damit zerstört wird. Kommt es andernfalls zu einer Insertion in der Nähe eines Onkogens, besteht die Möglichkeit, dass HERV-LTRs, durch Promotorinsertion oder Bereitstellung zusätzlicher Transkriptionsfaktorbindestellen, zu dessen verstärkter Expression führen. Allerdings sind HERVs, im Gegensatz zu endogenen Retroviren (ERV) der Maus, aufgrund von Mutationen und Deletionen vermutlich nicht mehr in der Lage zu retrotransponieren (Maksakova *et al.* 2006). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass innerhalb der menschlichen Population noch HERV-Elemente existieren, die zu einer Retrotransposition oder Neuinfektionen in der Lage sind (Belshaw *et al.* 2004, Belshaw *et al.* 2005, Belshaw *et al.* 2005, Katzourakis *et al.* 2005).

#### **1.6.3.1.2 HERV-LTR vermitteltes onkogenes Potential**

Obwohl eine Onkogenese durch HERV-Insertionen recht unwahrscheinlich ist, können vor allem epigenetische Aktivierungen von HERV-LTRs durch DNA-Demethylierung oder Chromatinmodifikationen zur Entstehung von Tumoren beitragen. Dies liegt daran, dass regulatorische LTR-Regionen von HERVs die Expression benachbarter zellulärer Gene beeinflussen können (vgl. 1.5.1 und 1.5.2). Dabei kann es auch dazu kommen, dass LTR-Promotoren zu einer verstärkten Expression von benachbarten (Proto)Onkogenen führen. So zeigten Tomlins *et al.*, dass in einer Prostata-Zelllinie ein HERV-K LTR als zusätzlicher Promotor die Expression des *TMPRSS2-ETS* Fusions-Gens, welches möglicherweise zur malignen Veränderung von Prostata-Zellen beiträgt, induziert (Tomlins *et al.* 2007). Weitere

## EINLEITUNG

Studien berichten, dass in mehreren Tumorzelllinien die Krebs-assoziierten Gene *DNAJC15* (*MCJ*) und *GSDML* über alternative HERV-LTR Promotoren verstärkt transkribiert werden (Sin *et al.* 2006, Sin *et al.* 2006). Lamprecht und Kollegen hingegen konnten zeigen, dass es auf Grund einer epigenetischen Aktivierung eines LTR-Elements (THE1B) in Hodgkin's Lymphoma Zellen zur aberranten *CSF1R* („myeloid-specific proto-oncogene colony-stimulating factor 1 receptor“) Transkription kommt, die dort maßgeblich zum pathogenen Phänotyp beiträgt (Lamprecht *et al.* 2010; Review: Lamprecht *et al.* 2010).

Ferner gibt es Hinweise dafür, dass es in Tumorzellen generell häufiger zur „Domestizierung“ von HERV-LTR Promotoren als alternative Transkriptionsinitiatoren für die Expression zellulärer Gene kommt (Simon *et al.* 1994). Auch eine Enhanceraktivität des HERV-LTRs könnte zu einer verstärkten, oder Gewebe-untypischen Expression einzelner (Proto-)Onkogene führen (vgl. 1.5.2).

Über eine LTR-induzierte Expression zellulärer antisense Transkripten und miRNAs kann auch indirekt die Regulation zellulärer Gene so beeinflusst werden, dass es zur malignen Transformation einzelner Zellen kommen könnte (Conley *et al.* 2008, Hakim *et al.* 2008, Gogvadze *et al.* 2009).

### 1.6.3.1.3 Onkogene HERV-Produkte

Auch die Expression retroviraler Proteine kann die Entstehung von Tumoren begünstigen. Dabei sind vor allem die, von der HERV-K(HML-2) Gruppe exprimierten, Proteine Rec und Np9 zu nennen (vgl. Abb. 1.5). Galli *et al.* zeigten, dass das in Keimbahntumorzellen überexprimierte Rec-Protein die normale Entwicklung der Keimbahnzellen stört und in einem transgenen Mausmodell zu einem Karzinom *in situ* führt (Galli *et al.* 2005). Mittlerweile ist bekannt, dass sowohl Np9 als auch Rec mit dem Transkriptionsfaktor PLZF (promyelotisches Zinkfingerprotein) direkt interagieren und diesen dadurch inaktivieren. Aktives PLZF ist für die transkriptionelle Reprimierung des Onkogens *c-MYC* notwendig. Durch die Inaktivierung von PLZF kommt es somit zu einer *c-Myc* Akkumulation und zur Dysregulation *c-Myc*-abhängiger Gene, was in einer verstärkten Zellproliferation und verbesserten Zellvitalität resultiert (Denne *et al.* 2007). Np9 kann zusätzlich auch mit dem Liganden des Numb-Proteins X interagieren (Armbruster *et al.* 2004). Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle im Notch-Signalweg, der wiederum über eine laterale Inhibition maßgeblich an der Differenzierung von Zellen beteiligt ist. Ferner wird häufiger eine Überexpression von Np9 mRNA und Proteinen in transformierten Zellen, vor allem in Leukämiezellen, beobachtet (Armbruster *et al.* 2002, Chen *et al.* 2013). Die gezielte Ausschaltung Np9s führt zur Inhibierung, eine Überexpression zur Erhöhung der Proliferation

## EINLEITUNG

von Leukämie Zellen. Zudem aktiviert Np9 nicht nur den Notch-, sondern auch noch die ERK- und AKT-Signalwege, die beide häufig an der Entstehung von Krebszellen beteiligt sind (Chen *et al.* 2013). Zusätzlich kommt es im Zuge einer Np9-Überexpression zum Anstieg von  $\beta$ -Catenin, einem Signaltransduktionsprotein, das essentiell für das Überleben von leukämischen Zellen ist (Chen *et al.* 2013).

HERV-Env Proteine besitzen ein fusogenes Potential, wie man am Beispiel Syncytin-1 erkennen kann (vgl. 1.4.1 und Abb. 1.5). Normalerweise ist die Expression des Syncytin-1 Proteins plazentaspezifisch, jedoch wurde auch in einigen Krebsarten, darunter auch Brustkrebs, eine Syncytin-1 Expression nachgewiesen. Daher vermutet man, dass dort eine Syncytin-1 vermittelte Zellfusion zur Transformation oder zur Metastasierung der Zellen beitragen kann (Duelli *et al.* 2003, Bjerregaard *et al.* 2006). Neben Syncytin-1 existiert auch noch das HERV-H Element kodierte Syncytin-2, welches ebenfalls in der Plazenta exprimiert wird. Dieses besitzt eine immunsuppressive Wirkung und trägt möglicherweise zum Schutz des Fötus vor dem Immunsystem der Mutter bei (Mangeney *et al.* 2007, Review: Dupressoir *et al.* 2012). Für entartete Zellen würde eine Expression des Syncytin-2 Proteins einen erheblichen Selektionsvorteil bedeuten, da diese vom Immunsystem nicht entdeckt und attackiert werden könnten (Review: Kassiotis 2014; vgl. Abb. 1.6).

Auch die HERV vermittelte Entstehung aberranter, onkogener Fusionsproteine durch alternatives/intergenes Spleißen oder durch Polyadenylierung könnte zur Entartung von Zellen führen (vgl. 1.5.4, 1.5.5, 1.5.6). So konnte die Arbeitsgruppe um Lock *et al.* zeigen, dass in DLBCL („diffuse large B-cell lymphoma“) -Zellen ein chimäres Transkript, bestehend aus einem HERV-LTR-Promotor und dem *FABP7* („fatty acid-binding protein“) -Gen, gebildet wird. Das daraus resultierende aberrante Protein LTR2-FABP7 unterscheidet sich in seiner Funktion vom nativen, normalerweise nur im Gehirn exprimierten, FABP7 Protein und beeinflusst die Zellproliferation und das Zellwachstum von DLBCL-Zellen (Lock *et al.* 2014). Nicht nur HERV-Proteine besitzen onkogenes Potential. Die Expression von regulatorischen HERV ncRNAs können ebenfalls zelluläre Gene negativ beeinflussen, sodass es zur malignen Transformation von Zellen kommen kann (Gosenca *et al.* 2012; vgl. 1.5.6).

### 1.6.3.2 HERVs in Urothelkarzinom

Als Urothelkarzinom werden maligne Tumoren des Nierenbeckens, der Harnröhre, des Harnleiters und der Harnblase bezeichnet. Dabei sind der Großteil (über 90%) der Urothelkarzinome Tumore der Harnblase (Review: Bankl 2000). In Deutschland werden pro Jahr ca. 28500 Neuerkrankungen diagnostiziert, wobei Männer meist 2-3 Mal so häufig betroffen sind wie Frauen. 5500 Menschen sterben jedes Jahr in Deutschland in Folge eines

## EINLEITUNG

Urothelkarzinoms (Kaatsch *et al.* 2013). Neben chronischen Entzündungen und einigen Toxinen (z.B. Benzidin) gelten vor allem Teerprodukte, die als Abfallstoffe beim Rauchen entstehen und meist über den Urin ausgeschieden werden, als Hauptursache. Der Krankheitsverlauf ist meist gravierend, da es bereits frühzeitig zur Metastasierung über das Lymphsystem und später über das Blutsystem in Leber, Lunge und Knochen kommt.

Bisher gibt es nur wenig Anhaltspunkte, ob bzw. inwieweit HERVs an der Entstehung von Urothelkarzinomen beteiligt sind. In benignem Urothelgewebe von Rauchern kann im Vergleich zu Nichtrauchern z.B. eine erhöhte Transkription der HERV-E(4-1) und HERV-K(HML-6) Gruppe beobachtet werden (Gabriel *et al.* 2010). Ferner führte eine *in vitro* Behandlung von Urothelzellen mit Urin von Rauchern zu einer erhöhten Transkription der HERV-E(4-1), HERV-K(HML-6) und HERV-T(S71-TK1) Gruppen, während hingegen die Behandlung mit Urin von Nichtrauchern zu keinem Anstieg der HERV-Transkription führte (Gabriel *et al.* 2010).

Eine andere Studie konnte zeigen, dass in 62 von 82 untersuchten Urothelkarzinom-Gewebeproben das HERV-W kodierte Syncytin-1, im Vergleich zu dazugehörigen, gesunden Urothelgewebeproben, überexprimiert war. Zudem bestätigten Syncytin-1 Überexpressionsversuche in immortalisierten humanen Urothel-Epithelzellen und *in vivo* Tumor-Xenotransplantations Versuche in Mäusen das onkogene Potential einer Syncytin-1 Überexpression (Yu *et al.* 2013). Als Hauptursache der erhöhten Syncytin-1 Expression in Urotheltumorproben, konnte zudem eine Punktmutation im 3'-LTR des für Syncytin-1 kodierenden HERV-W Elementes identifiziert werden. Diese Mutation ermöglicht scheinbar die Bindung des Transkriptionsfaktors c-Myb an den LTR, wodurch es zur Aktivierung der LTR-Promotoraktivität kommt (Yu *et al.* 2013). Dies lässt darauf schließen, dass insbesondere die Überexpression von Syncytin-1 zur Entstehung von Urothelkarzinomen beitragen kann.

Auch die Expression der regulatorisch wirkenden ncRNA eines HERV-E(4-1) proviralen Elementes, welches die Expression von cPLA2 reguliert könnte zur Entstehung von Urotheltumoren beitragen (Gosenca *et al.* 2012; vgl. 1.5.6).

### 1.6.3.3 HERVs in Mammakarzinomen

Eine der weltweit am häufigsten auftretenden Krebserkrankung bei Frauen sind Mammakarzinome, maligne Tumorerkrankungen der Brustdrüse. Mit jährlich über 70000 diagnostizierten Neuerkrankungen und einer jährlichen Sterberate von mehr als 17400 Fällen ist Brustkrebs die am häufigsten diagnostizierte und die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen in Deutschland (Kaatsch *et al.* 2013). Aufgrund von Fortschritten in

## EINLEITUNG

der Diagnostik und der medizinischen Behandlung, kommt es heutzutage immer frühzeitiger zur Erkennung und zur effektiveren Behandlung von malignen Brusttumoren. Dadurch hat sich die Anzahl der Mammakarzinom-Erkrankungen seit den 70iger Jahren mehr als verdoppelt, während die Mortalität rückläufig ist (Katalinic *et al.* 2006).

Ein Großteil der Mammakarzinome tritt sporadisch auf, jedoch existieren auch viele verschiedene Risikofaktoren wie Fettleibigkeit, hoher Alkohol- und Zigarettenkonsum, hormonelle Störungen aber auch genetische Prädispositionen, die die Entstehung von Brusttumoren fördern können (Review: McPherson *et al.* 2000, Reynolds *et al.* 2004, Review: De Pergola *et al.* 2013). Ca. 5% aller Brustkrebsfälle sind auf vererbte Mutationen, z.B. in den Proto-Onkogenen *BRCA1* und *BRCA2* („Breast-Cancer-Genes A1/A2“), oder dem Tumorsuppressorgen *p53*, zurückzuführen (Malkin *et al.* 1990, Antoniou *et al.* 2003, Becker *et al.* 2006).

Aufgrund der nahen Verwandtschaft von HERVs, speziell der HERV-K(HML) Gruppen mit dem MMT-Virus, welches Mammakarzinome in Mäusen verursacht, vermutet man schon lange, dass HERVs an der Entstehung von Brusttumoren beteiligt sein könnten. Dabei zeigen vor allem provirale Elemente der HERV-K(HML-2) und (HML-6) Gruppen häufig eine Tumor-assoziiert erhöhte Transkription und/oder Expression. Für die HML-6 Gruppe konnte bisher nur in einzelnen, bzw. in einer Teilmenge von Brustkrebspatientinnen Tumor-assoziiert erhöhte Transkriptzahlen beobachtet werden (Yin *et al.* 1997, Frank *et al.* 2008). Für die HML-2 Gruppe hingegen konnten neben einer tumorspezifisch erhöhten Transkription auch eine erhöhte RT-Aktivität und Env-Proteinexpression oder erhöhte Anti-Env-Protein Antikörpertiter entdeckt werden (Wang-Johanning *et al.* 2001, Wang-Johanning *et al.* 2003, Ejthadi *et al.* 2005, Contreras-Galindo *et al.* 2008, Golan *et al.* 2008, Wang-Johanning *et al.* 2008, Wang-Johanning *et al.* 2012, Wang-Johanning *et al.* 2014). Da sogar im Serum von Brustkrebspatientinnen erhöhte HML-2 Transkriptzahlen, Proteinmengen und Antikörper gegen HML-2 Env-Proteine nachweisbar sind, könnte die tumorspezifische Aktivität von HML-2 Elementen als Biomarker in der Krebsdiagnostik oder HML-2 Proteine/Peptide als Antigene für eine Antikörper basierte Krebstherapie verwendet werden (Golan *et al.* 2008, Wang-Johanning *et al.* 2014).

### **1.7. HERVs als Biomarker, oder als Antigen für eine Anti-Krebs-Immuntherapie**

Die häufig beobachtete Tumor-assoziierte HERV-Expression in Krebserkrankungen deutet auf die Möglichkeit hin HERV-Transkripte und/oder Proteine als Biomarker in der Diagnostik,

## EINLEITUNG

oder gar als Antigen für eine Krebs-Immuntherapie zu verwenden. In der Tat existieren einige Anhaltspunkte die diese Möglichkeiten unterstützen. Schiavetti und Kollegen identifizierten das HERV-K(HML-2) kodierte Antigen HERV-K-MEL, das hauptsächlich in Tumorzellen der Haut exprimiert wird. Das von HLA-A2 Molekülen präsentierte antigene Peptid stammt von gespleißten HERV-K-MEL *env*-Transkripten (Schiavetti *et al.* 2002). Ferner führt die Präsentation des HERV-K-MEL Antigens dazu, dass zytolytische T-Lymphozyten stimuliert werden die das Antigen erkennen. In einem *in vitro* Versuch konnten so stimulierte T-Lymphozyten Zellen einer Melanomzelllinie, die ebenfalls das HERV-K-MEL Antigen tragen, spezifisch lysieren (Schiavetti *et al.* 2002).

Aufgrund der CpG-Demethylierung des 5'LTRs eines HERV-H Elementes auf Chromosom Xp22.3 kommt es zu dessen Env-Überexpression in colorektalen, gastrischen und pankreatischen Tumoren (Wentzensen *et al.* 2004, Wentzensen *et al.* 2007). Mullins *et al.* untersuchten daraufhin inwieweit retrovirale Peptide (RVPs), die von diesem proviralen HERV-Xp22.3 ORF gebildet werden könnten, als Antigene für eine Immuntherapie nutzbar wären (Mullins *et al.* 2012). Tatsächlich konnten verschiedene RVPs von HLA-A2.1 Molekülen einer T2-Hybridoma-Zelllinie gebunden und präsentiert werden. Zudem konnten RVP präsentierende CD40 B-Zellen effektiv INF $\gamma$ -produzierende, zytotoxische T-Lymphozyten stimulieren, die wiederum zur spezifischen Lyse von RVP präsentierenden T2-Hybridoma-Zellen imstande waren.

Eine andere Studie konnte zeigen, dass das Wachstum und die Proliferation verschiedener Brusttumorzelllinien, die HERV-K(HML-2) Env-Proteine überexprimieren und auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, durch die Behandlung mit einem monoklonalen anti-HERV-K(HML-2)-Env Antikörper gehemmt werden. Durch die Behandlung kam es zudem zur Aktivierung des TP53 Signalweges und zur Apoptose der Tumorzellen. In *in vivo* Mausversuchen führte eine Behandlung mit dem gleichen Antikörper zur signifikanten Reduzierung der Größe von xenotransplantierten, humanen Brusttumoren. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass in 66% von 223 primären Brusttumoren von Brustkrebspatientinnen HERV-K(HML-2) Env-Proteine exprimiert werden, wobei eine Expression mit einem höheren Risiko einer Lymphknoten-Metastasierung assoziiert ist (Wang-Johanning *et al.* 2012).

All diese Entdeckungen deuten drauf hin, dass sowohl HERV-Transkripte, als auch HERV-Proteine das Potential haben als Biomarker einer Brustkrebserkrankung, oder als Ziel einer Anti-Krebstherapie verwendet zu werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gebrauchsfertige Reaktionsenzyme (Kits)

Name	Hersteller
Expand High Fidelity Enzyme Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
GoTaq PCR System	Promega, Mannheim
Pfu DNA Polymerase	Fisher Scientific, Schwerte
LC480 DANN Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
Nucleo Spin Plasmid	Machery-Nagel, Düren
Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up	Machery-Nagel, Düren
pegGOLD HP total RNA Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pGEM®-T Vektor Systeme	Promega, Mannheim
RQ1 DNase Kit	Promega, Mannheim
Superscript™ II First-Strand Synthesis	Invitrogen, Karlsruhe

#### 2.1.2 Oligonukleotide

##### 2.1.2.1 MOP-Primer („Mixed oligonucleotide Primers“) für die Multiplex-PCR

MOP-Oligonukleotide die eine Cy3-Fluoreszenz Markierung aufweisen wurden zur Stabilisation in 10mM PO<sub>4</sub><sup>-</sup> Puffer gelöst. Die 45 bp langen „capture probes“ die 5'-terminal mit Cy3 modifiziert sind wurden auf eine Konzentration von 100µM mit 3xSSC Puffer eingestellt. Für das Auftragen („spotten“) auf den Objektträger („slide“) wurde eine 384-Well Platte jeweils mit 34 µl capture probes, gemischt mit 12 µl 20xSSC Puffer, befüllt. Die Cy3-Oligonukleotide die als Lokalisationsoligonukleotide verwendet wurden, wurden aus 60 µl Cy3-Oligonucleotid, 195 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und 45 µl 20xSSC gemischt. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

## MATERIAL UND METHODEN

### Übersicht über die MOP-Primermischungen:

HERV Gruppe	Orientierung	Quelle	5'-Modifikation	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Degeneration
<b>CHA MOP-Primer Mischung (MOP-CHA)</b>					
Type C	For	(Shih <i>et al.</i> 1989)	–	GGAGAATGGAAAGTGYTRCCMCARGG	8
	Rev		Cy3	GGAGAACAGCAGSAKGTCCATCCAYGTA	8
HERV-I	For	M92067	–	GGAGAATKKACMSKMYTRCYCARGGG	1072
HERV-L	Rev	G895836	Cy3	GGAGAAAAMWKRYCATCMAYRTAMTG	8192
HERV-H	For	AF026252	–	GGAGAAGTACTGCTGCAAAGCTTCA	–
	Rev		Cy3	GGAGAACACACGATCGGCAGGGAGA	–
RGH2	For	D11078	–	GGAGAAGTAATGCTGCAAGGTTTC	–
	Rev		Cy3	GGAGAAGAAGAACATCACCAATATA	64
HERV-F	For	Z94277	–	GGAGAARTMCTMCMYCARGGGTT	–
	Rev		Cy3	GGAGAAAAGGAGGTCTCTAGATAT	–
HIV-1	For	K02013	–	GGAGAAGTCTTCCACAGGGATGG	–
	Rev		Cy3	GGAGAAATACAAATCATCCATGTA	–

HERV Gruppe	Orientierung	Quelle	5'-Modifikation	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Degeneration
<b>housekeeping Gen Mischung (MOP-HKG)</b>					
β-Aktin	For	E01094	–	ATGATGATATCGCCGCTCG	–
	Rev		Cy3	CATGTCGTCCCAGTTGGTGACG	–
Ubiquitin	For	U49869	–	GTTGGCTTTCTTGGGTGAGCTTG	–
	Rev		Cy3	AAGAGTACGGCCATCTTCCAGCTG	–
RPL19	For	NM_000981	–	CCCGAATGCCAGAGAAGG	–
	Rev		Cy3	CTTCCTTGGTCTTAGACCTG	–
GAPDH	For	NM_002046.1	–	AGTCAACGGATTTGGTCGTATTGGG	–
	Rev		Cy3	ACGTACTCAGCGCCAGCATCG	–
HPRT	For	NM_000194	–	GTGATGATGAACCAGGTATGACCTTG	–
	Rev		Cy3	CTACAGTCATAGGAATGGATCTATCAC	–

### 2.1.2.2 Oligonukleotide („capture probes“) des Retrovirus-spezifischen Microarrays (Retroarray)

#### Übersicht über die capture probes:

Retrovirus Klasse	Gruppe	RepBase Name	GenBank-ID	Lokalisierung auf dem Microarray
Klasse I Retroviren (Gamma-Retrovirus-verwandte Sequenzen)	HERV-I	HERV-I	HERV-I( M92067)	b3-D
		HERVIP10F	HERV-IP-T47D (U27241)	b3-E
		Seq65 (AP000842)		b3-F
	HERV-S	HERV18	HERV-S (Z84470)	b2-A
			Seq77 (AC005040)	b2-B
	HERV-T	HERVS71	S71pCRTK6 (U12969)	a4-B
S71pCRTK1 (U12970)			a4-A	

## MATERIAL UND METHODEN

	HERV-FRD	MER50I	ERV-FRD (U27240) HS49C23 (Z93019) HERV-Z (Z69907)	b3-A b3-B b3-C
	HERV-R	HERV-R	ERV3 (AC004609)	d2-A
	HERV-E	HERV-E	E4-1 (M10976) Seq32 (AC010636)	b4-A b4-B
	HERV-H	HERV-H	RGH2 (D11078) HERV_H (AF026252) Seq66 (AL359740)	c3-A c3-B c3-C
	HERV-F	HERVH48I HERV FH19I HERV FH21	HERV-F2 (AC002416) HERV-F (Z94277) HERV-Fb (AC00378)	a2-A a2-B a2-C
	HERV-W	HERV17	HERV-W (AF009668)	d3-F
	ERV9	HERV9 HERV17 HERV9 HERV FH	Seq64 (AC005253) Seq63 (AC018926) ERV9 (X57147) Seq59 (AC005397) Seq60 (AL135749)	d3-A d3-B d3-C d3-D d3-E

Retrovirus Klasse	Gruppe	RepBase Name	GenBank-ID	Lokalisierung auf dem Microarray
<b>Klasse II Retroviren (β-Retrovirus- verwandte Sequenzen)</b>	HML-1	HERVK14I	HML-1 (U35102) Seq29 (S77579)	a3-A a3-B
	HML-2	HERVK	HERV-K10 (M14123) HERV-K2.HOM (U87592) HERV-K(HP1) (U87588) HERV-K(D1.2) (U87595) HERV-K10 (U39937)	c1-B c1-C c1-D c1-E c1-F
	HML-3	HERVK9I	Seq26 (AC073115) Seq34 (AL592449) HML-3 (U35236) HERV1 (S66676) Seq43 (AF047595)	d1-B d1-C d1-D d1-E d4-A
	HML-4	HERVK13I	Seq10 (AF047591) HERV-K-T47D (AF020092)	d1-F d4-B
	HML-5	HERVK22I	HML-5 (U35161)	c1-F
	HML-6	HERVK3I	HML-6 (U60269) Seq38 (AC010328) Seq56 (AC018558)	a3-C a3-D a3-E
	HML-7	HERVK11DI	NM WV7 (AP003171)	c3-F
	HML-8	HERVK11I	NM WV3 (AL513321)	c3-E
	HML-9	-	NM WV9 (AC025569)	c3-D

## MATERIAL UND METHODEN

	HML-10	HERVKC4	HERV-KC4 (U07856) Seq31 (AL162734)	c2-A c2-B
--	--------	---------	---------------------------------------	--------------

Retrovirus Klasse	Gruppe	RepBase Name	GenBank-ID	Lokalisierung auf dem Microarray
Klasse III Retroviren (Spumavirus verwandte Sequenzen)	HERV-L	HERV-L =MLT2	HERV-L (G895836)	b1-B
			Seq39 (AC091914)	b1-C
			Seq45 (AC006971)	b1-D
			Seq51 (AL353741)	b1-E
			Seq58 (AL590730)	b1-F

Weitere capture probes	Gruppe	RepBase Name	GenBank-ID	Lokalisierung auf dem Microarray
Humane „housekeeping“ Gene			Ubiquitin U49869)	a1-B
			GAPD (NM_002046.1)	a1-C
			RPL19 (NM_000981)	a1-D
			β-Actin (E01094)	a1-E
			HPRT (NM_000194)	a1-F
Mouse mammary tumor virus (MMTV)	Murines endogenes Retrovirus		MMTV (M1512)	c4-A
Moloney murine leukemia virus (MoMLV)	Moloney murines Leukämievirus		MoMLV (J02255)	b2-C
Lokalisierungspunkte	Cy3-markierte Oligomere			a1-A c1-A c4-B b1-A d1-A

### Sequenzen der capture probes:

HERV-Gruppe	capture probe Name	Quelle	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	Lokalisierung auf dem Microarray
<b>Klasse I Retroviren</b>				
HERV-I	HERV-I-1	M92067 (Maeda <i>et al.</i> 1990)	TTCATGGATTACCCCAACCTTTTGG GTCAAATTTTGAACAAGTG	b3-D
	HERV-I-2		CTAGACAAAGTTTCTGTCCAAAAC AATTATGCCTGCTTCAATAT	
	ERV-FTD-1	U27241 (Seifarth <i>et al.</i> 1995)	TTCACAGACTCCCCTAATATTTTGG GTGAAATTTTGAACAAGC	b3-E
	ERV-FTD-2		ATTAGAAAAAGTTTTCATTCCAGAA CAAATATGCCTTCTCCAG	
	SEQ65-1	Herrmann, 1998 (pers. comm.)	AGACTCCCCTAATCTTTTGGCCAA ATTTTGAACAAGTGTTAG	b3-F
	SEQ65-2		AAAAAGTGGTCATCCCAAAGCAAAT ATGCTTGCTCTAGTACATG	
HERV-S	HERV-S-1	Z84470 (Tristem 2000)	TATGTGCATAGCCCCACCATTGTC ATGGTTTTGTGCCATGGAC	b2-A
	HERV-S-2		TTAGCCGCCTGGAATTGTCCAAAAG GGGTCAGCCTGTTTCATTAT	

## MATERIAL UND METHODEN

	SEQ77-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	TGGAAGGGAGGACTTGAGCACATTC TTAAATGT	b2-B
	SEQ77-2		GGCTCCTGTAATTTTTAACACATTC ACACATGCTA	
HERV-T	S71pCRTK6-1	U12969 (Haltmeier <i>et al.</i> 1995)	TTTAAAAATTCGCCACCCTTTTTG GGGAAGCCCTCCAACAAGAT	a4-B
	S71pCRTK6-2		CTTCTACCATTCTGAGCCAGTCCCC TTAACTGTAACCTTCTTCA	
	S71pCRTK1-1	U12970 (Haltmeier <i>et al.</i> 1995)	TTTAAAACTCCCCTACCCTTTTTG GGGAAGCCCTCCAACAGGAT	a4-A
	S71pCRTK1-2		CTTATACCATTCTGAGCCAGTAACC CTCACTGCACCTCTCTCCAG	
HERV-FRD	ERV-FRD-1	U27240 (Seifarth <i>et al.</i> 1995)	TTCAGAGATAGTCCCCATTTGTTG GGCAAGCCTTGCTAGATA	b3-A
	ERV-FRD-2		TTTGAGGACCTAAGTCTTTATATG GAAGGGCATCTCCTACAG	
	HS49C23-1	Z93019 (Tristem 2000)	TTTACCGAAGCCCTTCATATTTTT CCCAAACATTGCATCAGGAA	b3-B
	HS49C23-2		TTGGCACTACAATTCGTCAAAAT CTACTCTCATTCAATACATA	
	HERV-Z-1	Z69907 (Tristem 2000)	TTTAGGGATAGTCCCCATCCATTG GGAATGCGTTGGCAAAATAA	b3-C
	HERV-Z-2		TTAAGGGAACCTACAGTTAACAAATG GATCTCTCCTACAATATGTG	
HERV-R	HERV- R(ERV3)-1	HERV-R AC004609	TTCAAAAACCTCTTACAATCTTTG AGGAAGCACTGGCCTCAAAC	d2-A
	HERV- R(ERV3)-2		CTCAAGGCCTATACCCTGCCAAATG ATAACTGTGCCCTGTTCAG	
HERV-E	HERVE41-1	M10976 (Repaske <i>et al.</i> 1985)	TTCAAGAACTCCCCACCATTCTTG GGGAGGCGTTGGCTCGAGA	b4-A
	HERVE41-2		CCTCCAGAAGTTTCCCACCAGAGAC CTAGGCTGCGTGTGCTCC	
	SEQ32-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	TTCAAGAACTCCCTTACTATCTTCG GGGAGGCTCTGACTTGAGAC	b4-B
	SEQ32-2		TTGCAAAAGTTTCTGCTAAAGACC TAGGCTATGCTTGTCTCTG	
HERV-H	RGH2-1	HERV-H(RGH2) D11078	TTCAGGGGCAGCCCTTATTATTTCA GCCAAGCTCTTCTCATGAT	c3-A
	RGH2-2		TTACTTTCTTCCACCCTCCACTT CTCACCTTATTCAATATATT	
	HERV-H AF026252-1	AF026252 (Lindeskog <i>et al.</i> 1998)	TTCACAGACAGCCCCATTACTTCA GTCAAGCCCAATTTCTTCC	c3-B
	HERV-H AF026252-2		TTATCTGTTACCTATCTCCGCATAA TTCTCATAAAAAACACAGTG	
	SEQ66-1	Hohenadl 1998 (pers. comm.)	TTCAGAGACAGCCCCATTACTTTA GTCAAGCTCTTCTCATGAT	c3-C
	SEQ66-2		CTACTTTCTTCCATCCATCTGTTT CTCACCTTATTCAATATATG	
HERV-F	HERV-F2-1	AC002416 (Tristem 2000)	TTCAGAAACAGCCCCACCATTTTG GGCAGGCCCTTGCTCATGAC	a2-A
	HERV-F2-2		CTCTGTATCTTATCCCTAAAACCGT CCACTCTCCTTCAATATGTT	
	HERV-F-1	Z94277 (Tristem 2000)	TTTAGAGACGGCCCTCACTATTTCA GTCAGGCACCTCAGTTGGAC	a2-B
	HERV-F-2		CTTTCCCAACTACCTCTATGATCCA GCATCTTGCTTACGACGAG	
	HERV-Fb-1	HERV-Fb AC000378 = HERV-XA (Tristem 2000)	TTCCAGGATAGCCTTCTTTTCTTCG GGCAAGCCCTAGCCCAAGAC	a2-C
	HERV-Fb-2		CTTGCCTCCTGGATCTTTCCCCCA GCCGCCTTCTTCAATATCTA	
HERV-W	HERV-W-1	AF009668 (Blond <i>et al.</i> 1999) (MSRV)	TTCAGGGATAGCCCCATCTATTTG GCCAGGCATTAGCCCAAG	d3-F
	HERV-W-2		ACTTGAGTCAATTCTCATACCTGGA CACTCTTGCTTCAATATCTA	
	SEQ64-1	Herrmann	TTTAGAGATAGCCCTCACCTGTTG GCCAAGCATTGGCCAAGA	d3-A

## MATERIAL UND METHODEN

ERV-9	SEQ64-2	1998 (pers. comm.)	TTTAAGTCACTTCTTGCACCCAGG TACCCTAATTCCTCAATAT	
	SEQ63-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	TTCAGGGATAGCTCCCATCTATTTG GCCAGGCATTAACCCGAG	d3-B
	SEQ63-2		ACTTAAGCCAGTTCTCATACGTGGA CACTCTTGTCCTTTGGTA	
	ERV9-1	HSERV9, X57147 (La Mantia <i>et al.</i> 1991)	TTTAGGGATAGCCCTCATCTGTTT GTCAGGCCCTAGCCAAA	d3-C
	ERV9-2		GATCTAGGCCACTTCTCAAGTCCAG GCACTCTGGTCTTCAA	
	SEQ59-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	TTTAGGGATAGCCCTCATCTGTTT GTCAGGCACAGGCCAAG	d3-D
	SEQ59-2		ATCTAGTTCACTTCTCAAGTCCAGG CACTCTGGTTGTTTCAGTAC	
	SEQ60-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	TTTAGGGACAGCCCTCACTATTTCG GTCAGGCACTTCAATTAG	d3-E
SEQ60-2	ACCTCTCCCAGCTACATCTNCC YNGCATCTTGCTTCAGTA			

HERV-Gruppe	capture probe Name	Quelle	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Lokalisierung auf dem Microarray
<b>Klasse II Retroviren</b>				
HML-1	SEQHML1-1	U35102 (Medstrand <i>et al.</i> 1993)	ATGCTAAATAGCCCAACTGTTTGT AAACTTATGTCAGAAAGCTA	a3-A
	SEQHML1-2		TTAAGCCAGTTAGAGAACAGTTAA AAAATGTTATATCATCCATT	
	MOP 29-1	S77579 (Lefebvre <i>et al.</i> 1995)	ATGTTAAATAGCCCAACTATTTGTC AAACCTATGTTGGGAAAGTT	a3-B
	MOP 29-2		ATTAAGCCAGTTAGAGAACAGTTTT AAAAATGTTATAGTATTCAT	
HML-2	HERV-K10-1	M14123 (Ono <i>et al.</i> 1986)	ATGCTTAATAGTCCAACATTTTGT AGACTTTTGTAGGTCGAGCT	c1-B
	HERV-K10-2		CTTCAACCAGTTAGAGAAAAGTTTT CAGACTGTTATATATTCAT	
	HERV-K(HML-2-HOM)-1	AF298587, (Mayer <i>et al.</i> 1999)	ATGCTTAATAGTCCAACATTTTGT AGACTTTTGTAGGTCGAGCT	c1-C
	HERV-K(HML-2-HOM)-2		CTTCAACCAGTTAGAGAAAAGTTTT CAGACTGTTATATATTCAT	
	HERV-K(HP1)-1	U87588, (Zsiros <i>et al.</i> 1998)	ATGCTTAATAGTCCAACATTTTGT AGACTTTTGTAGGTCGTGCT	c1-D
	HERV-K(HP1)-2		CTTTAACCAGTTAGAGACAAGTTTT CAGACTGTTATATATTCAT	
	HERV- (D1.2)-1	U87595 (Zsiros <i>et al.</i> 1998)	ATGCTTAATAGTCCAACATTTTGT AGACTTTTGTAGCTCAAGTT	c1-E
	HERV- (D1.2)-2		CTTCAACCAGTTAGAGACAAGTTTT CAGACTGTTATATATTCAT	
	HERV-K U39937-1 = HERV-K10	U39937 (Li <i>et al.</i> 1995)	ATGCTTAATAGTCCAACATTTTGT AGACTTTTGTAGGTCGAGCT	c1-F
	HERV-K U39937-2 = HERV-K10		CTTCAACCAGTTAGAGAAAAGTTTT CAGACTGTTATATATTCAT	
HML-3	SEQ26-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	CGTGTTAAACAGTCCGACTATTTGC CAGAAGTATGTGGGGCAAG	d1-B
	SEQ26-2		CAATTGAATCTACTCGTAAAAAATT TTCACAGTGTACATTATTC	
	SEQ34-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	ATGTTAAATGGTCCCACAATTTGCC AGACATATGTGGGGCAAGCA	d1-C
	SEQ34-2		CTTGAACTTACTCATAAAAAATTTT CAGTGTTACATTATTCATA	
	SEQHML3-1	U35236	ATGTTAAACAGTCCAACAATTTGCC	d1-D

## MATERIAL UND METHODEN

	SEQHML3-2	(Medstrand <i>et al.</i> 1993)	AGACTTATATGGGCAAGCAA TTGAACCTACTCTTAAAAAATTTTC ACAGTGTTACATTATTCATT	
	HERV1SLE S66676-1	S66676 (Kalden <i>et al.</i> 1993)	ATGATAAACAGTCCAACAATTTGCC AGGCATATGTAGGGCAAAC	d1-E
	HERV1SLE S66676-2		AAWTGAACCTACYTGTAAAAAATTT TCAGTGTTACATTATTCATT	
	SEQ43-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	ATGTTAAACAGTCCAACAATTTGCC AGATGTACGTGTTGCAAGC	d4-A
	SEQ43-2		AATTGAACCTACTTGTAAAAAATTT TTGGTGTTACATNTTTCNTTA	
HML-4	SEQ10-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	ATGCTTAATAGTCCCCTACTATTTGTC AGTATTTTGTGGGGGTGTGC	d1-F
	SEQ10-2		TTCAACCTGTCAGGGATTCAGTTTC CCCGATGTTACATCGTTTAC	
	HERV-K- T47D-1	AF020092 (Seifarth <i>et al.</i> 1995)	CATGCTTAATAGTCCCCTACTATTTGT CAGTATTTTGTGGGGCGTGT	d4-B
	HERV-K- T47D-2		GCTTCAACCTGTCAGGGATTCAGTTT CCCCGATGTTACATCGTTCA	
HML-5	SEQHML5-1	U35161 (Medstrand <i>et al.</i> 1993)	ATGCTGAACAGTCCCTACCATGTGTC AGTAACATGTAAATCAAGCT	c1-F
	SEQHML5-2		TTGCTCCCCAGTAGAAAAATAATTT CTAATTGCAAGATTATTCAT	
HML-6	HERV-K(HML- 6)-1	U60269 (Medstrand <i>et al.</i> 1997)	ATGCTTAACAGTCTTACGCTATGTC AGCATTTTGTAGGACAGGCA	a3-C
	HERV-K(HML- 6)-2		TTAAGAAGCCTCGGAATATGTTTC CTACTGCTTACATCATTTCAT	
	SEQ38-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	ATGCTCAACACCTACGTTAAGTCAG CATTTTGTAGGAAGAGCATT	a3-D
	SEQ38-2		AAAGGACTCTCAGAATATGTTTCCC ACTGCCTACATCGTTCATTA	
	SEQ56-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	ATGCTTAACAGCATTATATCAGCAT GTTGTAGGATAGGCATTAATA	a3-E
	SEQ56-2		GGTGCCTCTGAATATGTTTCCCACA GCCTACATCCGTCATTATAT	
HML-7	HML7-1	NMWV7 (HERVK11DI)	ATGATTAACAGTCCCTACTATTTGTC AGTTGTTTGTCCGTTACTGT	c3-F
	HML7-2	Rebase (Jurka 2000)	GTTACAACCTATCCGACAGACTTTT AAAAATAATTACATTCTTCAT	
HML-8	HML8-1	NMWV3 (HERVK11)	ATGCTAAATAGCCCTACAATCTGCC AGCTTTATGTTGGACAAGTG	c3-E
	HML8-2	Rebase (Jurka 2000)	CTTTCACCAGTTCGAGCCCCAATTT CCCAGGCCATATTTCTTCAT	
HML-9	HML9-1	AC025569 nt 93650-	ATGATAAATAGCCCCTACTACATGTC GCTTTACGTACTTGAAGCCT	c3-D
	HML9-2	93890 Rebase (Jurka 2000)	TACTTTCTGTGCGTCCATCCTTCCC CCAGGCAAAAAATCTTCCAC	
HML-10	HERV-KC4 U07856-1	U07856, (Dangel <i>et al.</i> 1994)	ATGTTAAATAGTCCCACAGTTTGTGC AAACTTTTGTAGGCAGAAGCT	c2-A
	HERV-KC4 U07856-2		ATCCAGCCTGTAGAGATCAGTTTC CAGATTTGTGCAGCAAAAAG	
	SEQ31-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	ATGTTAAACAGTTCACAGTTTGTGC AAACTTTTGTAGGCAAAGCT	c2-B
	SEQ31-2		ATCCAGCTAGTTAGAGATCAATTT CAGATTGTTACATCATTTCAT	

MATERIAL UND METHODEN

HERV-Gruppe	capture probe Name	Quelle	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Lokalisierung auf dem Microarray
<b>Klasse III Retroviren</b>				
HERV-L	HERV-L G895836-1	G895836 (Cordonnier <i>et al.</i> 1995)	TATATCAACTCTCCGGCTTTGTGTC ATAATCTTATTCAGAGTGAT	b1-B
	HERV-L G895836-2		CTTGATCACTTTTCACTGCCACAAG ATATCACACTGGTCCATTAC	
	SEQ39-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	GTATATCAACTCTCCAGCTTTGTGT CATCATCTTATTCAGAGATA	b1-C
	SEQ39-2		CCTTGATCACTTTTCACTTCTGCAA GATATCATGCTGGTCCATTA	
	SEQ45-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	TATATCAGTTATCTGGCTTTGTGAC GTAATCTTATTTGGAGAGAT	b1-D
	SEQ45-2		CTAGATAACTTTTCACTTCCACAAG ATATCACACTGGTCCACTAC	
	SEQ51-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	TGTATCAACTCTCTGGCTTTGTGTC ATAATCTTACCTGGAGACAT	b1-E
	SEQ51-2		CTTGATCGCTTTTGTCTCCACNAG ATATCACACTGGTCCATTAT	
	SEQ58-1	Herrmann 1998 (pers. comm.)	TATATCAACTCTCCAGTTTTGTGTC ATAGTCTTAGTCAGAGAGAC	b1-F
	SEQ58-2		CTTGATCACTTTTGTCTCCATAAG ACATCACACTGGCCATTAC	

Gruppe	Name	Quelle	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Lokalisierung auf dem Microarray
<b>weitere Oligonukleotide</b>				
Humane housekeeping Gene	bact-1 (exon)	human beta actin E01094	ATGCCCCCGGGCCGTCTTCCCCTC CATCGTGGGGCGCCCCAGGC	a1-E
	bact-2 (exon)		GCCCAGAGCAAGAGAGGCATCCTCA CCCTGAAGTACCCCATCGAG	
	ubi-1 (exon)	Human ubiquitin U49869	GGTGGACGTGGTTGGTGATTGGCAG GATCCTGGTATCCGCTAACA	a1-B
	ubi-2 (exon)		AAATGCAGATCTTCGTGAAAACCTT TACCGGCAAGACCATCACCC	
	RPL19	RPL19 NM_000981	CACATCCACAAGCTGAAGGCAGACA AGGCCCGCAAGAAGCT	a1-D
	GAPD-1	GAPD NM_002046.1	ACTCTGGTAAAGTGGATATTGTTGC CATCAATGACCCCTTCATTG	a1-C
	GAPD-2		ATGTTCCAATATGATTCCACCCATG GAAATTCATGGCACCGTC	
	HPRT-1	human HPRT NM_000194	GGAAAGGGTGTATTTCCTCATGGA CTAATTATGGACAGGACTGA	a1-F
	HPRT-2		AGGGGGGCTATAAATTCTTTGTGTA CCTGCTGGATTACATCAAAG	
MMTV	MMTV-1	MMTV (M15122) (Moore <i>et al.</i> 1987)	ATGAAAAATAGCCCTACTTTATGTC AAAAATTTGTGGACAAAGCT	c4-A
	MMTV-2		ATATTGACTGTAAGGGATAAATACC AAGACTCATATATGTGCAT	
MoMLV	MLV-1	MoMLV (J02255) (Van Beveren <i>et al.</i> 1981)	TTCAAAAACAGTCCCACCTGTTTG ATGAGGCACTGCACAGAGAC	b2-C
	MLV-2		CTAGCAGACTCCGGATCCAGCACC CAGACTTGATCCTGCTACAG	
Lokalisierungs-Oligonukleotide			TGGAAAGTGTACCACAAGG  (Markierung: 5'-NH <sub>2</sub> -C6-Seq-Cy3-3')	a1-A c1-A c4-B

## MATERIAL UND METHODEN

				b1-A
				d1-A

### 2.1.2.3 Antisense Kontrolloligomere zur Qualitätssicherung des Microarrays

Übersicht der antisense Kontrolloligomere:

Name	GeneBank-ID	Oligomer	Lokalisierung der Zielsequenz auf dem Microarray
antisense-HML-1	U35102	36-mer	a3-A
antisense-2HOM	U87592	36-mer	c1-C
antisense-HML-5	U35161	42-mer	c1-F
antisense-HERV-W	AF009668	42-mer	d3-F
antisense-MMTV	M1512	42-mer	c4-A

Sequenzen der antisense Kontrolloligomere:

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Markierung
antisense-HML-1	TAGCTTTCTGACATAAGTTTAAACAAACAGTTGGGCT	5'-Cy3-3'
antisense-2HOM	AGCTCGACCTACAAAAGTCTGACAAATAGTTGGACT	5'-Cy3-3'
antisense-HML-5	GTAAGGACAAGAGTGTCCAGGTATGAGAATTGACTCAA	5'-Cy3-3'
antisense-HERV-W	ATGAATAATCTTGCAATTAGGAAATTATTTTCTACTGGGGAG	5'-Cy3-3'
antisense-MMTV	CACAATATATGAGTCTTGGTATTTACTCCTTACAGTCAATAT	5'-Cy3-3'

### 2.1.2.4 PCR-Primer für konventionelle PCRs

#### 2.1.2.4.1 Primer für die Kontroll-PCR nach dem DNase-Verdau

Name	Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	GeneBank-ID	Zielbereich	Tm
HERV-L LTR	For	ATCTGGGTGGGCACCATCAAGTTA	X89211	HERV-L LTR U5	59°C
	Rev	TCTCACAATAGGCCATCTGCAAGC	X89211	HERV-L LTR U5	59°C

#### 2.1.2.4.2 Primer für die quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Name	Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Zielbereich
HML-2	For	GGCCATCAGAGTCTAAAC	<i>gag</i>
	Rev	CTGACTTTCTGGGGTGGCC	<i>gag</i>
ERV-9	For	CCTCAACTGTTTTAATGTCTTAGGGCGAGG	<i>pol</i>
	Rev	CCCTCATCTGTTTGGTCAGGCC	<i>pol</i>
HERV-W	For	TGAGTCAATTCTCATACCTG	<i>pol</i>
	Rev	AGTTAAGAGTTCTTGGGTGG	<i>pol</i>
HML-6	For	TGGMCTCTGTADBAATAGRTCTTA	<i>pol</i>
	Rev	CTTGRGSYAAAACYTTCAYTG	<i>pol</i>
HERV-E(4-1)	For	GGTGTCACTACTCAATACAC	<i>pol</i>

## MATERIAL UND METHODEN

	Rev	GCAGCCTAGGTCTCTGG	<i>pol</i>
ERVK-5	For	GGTACACTGCACGCAGTCATTGATG	<i>gag</i>
	Rev	ATCTAGTCTCAGCTCGGGCAGGC	<i>gag</i>
RPII	For	GCACCACGTCCAATGACAT	
	Rev	GTGCGGCTGCTTCATAA	

### 2.1.2.4.3 Primervarianten für die Locusbestimmung per cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung

#### HML-6-Primer:

Name	Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Zielbereich
HML6RTfw	For	TGGMCTCTGTADBAATAGRTCTTA	<i>gag</i>
HMLRTrv3	Rev	AACAATAGTTCCTAAGTATTAGTATGG	<i>gag</i>
HML6RTc16	Rev	AACAATAGTGCCTAAGTACTGGTATC	<i>gag</i>

Das Mischungsverhältnis der Rev-Primer HMLRTrv3:HML6RTc16 betrug 24:1 (Frank *et al.* 2008)

#### HML-2-Primer:

Name	Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Zielbereich
HML-2_1778_for1	For	CCCCAGAAAGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_1778_for2	For	TCTCCAGAGGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_1778_for3	For	CCCCAGAAAATCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_1778_for4	For	TCTCCAGAGGTGCAGTATAGA	<i>gag</i>
HML-2_2396_rev1	Rev	TTCCCAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>
HML-2_2396_rev2	Rev	TTCCCAGGCCCTGAGGCAA	<i>gag</i>
HML-2_2396_rev3	Rev	TTCCCTAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>

Da jeder Primer eine unterschiedliche Anzahl an HERV-Loci erkennt, kann es zu einer Über- bzw. Unterrepräsentation einzelner Loci nach der Amplifikation kommen. Um dies zu verhindern wurden die Primer, entsprechend der Anzahl der von ihnen erkannten Loci, gemischt. Dabei betrug das Mischungsverhältnis der Vorwärts-Primer (HML-2\_1778) for1:for2:for3:for4 10:3:2:1 bzw. der Rückwärts-Primer (HML-2\_2396) rev1:rev2:rev3 12:6:1 (Schmitt *et al.* 2013).

### 2.1.2.5 Primervarianten für die Locusbestimmung per „Next Generation“ Sequenzierung (Amplikon-Sequenzierung)

Die grau unterlegten vier Nukleotide dienen als probenspezifische Markierung (auch „Tag“ genannt) anhand derer die Sequenzen einer entsprechenden Gewebeprobe zugeordnet werden konnte. Dabei wurden die Tags so gewählt, dass sie in Verbindung mit dem

## MATERIAL UND METHODEN

entsprechenden Primer eine eindeutige Zuordnung ermöglichen. Zudem wurden soweit möglich Tags vermieden, die zur Ausbildung von Sekundärstrukturen oder zum Selbst-„Annealing“ der Primer führen könnten. Hierfür wurde jeder Primer inklusive der verwendeten Tags mit dem Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (Kibbe 2007) überprüft.

### HERV-K(HML-2):

Name	Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Zielbereich
HML-2_1_For	For	ACACCCCCAGAAAGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_2_For	For	AGAGCCCCAGAAAGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_3_For	For	ATATCCCCAGAAAGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_4_For	For	CGCGCCCCAGAAAGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_5_For	For	CTCTCCCCAGAAAGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_6_For	For	CACACCCCCAGAAAGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_7_For	For	TATACCCCCAGAAAGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_8_For	For	TGTGCCCCAGAAAGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_9_For	For	TCTCCCCCAGAAAGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_10_For	For	ATGCCCCCAGAAAGTCAGTATGGA	<i>gag</i>
HML-2_1_Rev	Rev	ACACTTCCCAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>
HML-2_2_Rev	Rev	AGAGTTCCCAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>
HML-2_3_Rev	Rev	ATATTTCCCAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>
HML-2_4_Rev	Rev	CGCGTTCCCAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>
HML-2_5_Rev	Rev	CTCTTTCCCAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>
HML-2_6_Rev	Rev	CACATTTCCCAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>
HML-2_7_Rev	Rev	TATATTTCCCAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>
HML-2_8_Rev	Rev	TGTGTTCCCAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>
HML-2_9_Rev	Rev	TCTCTTTCCCAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>
HML-2_10_Rev	Rev	ATGCTTTCCCAGGCTCTAAGGCAG	<i>gag</i>

### HERV-K(HML-6):

Name	Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Zielbereich
HML-6_1_For	For	ACACAAGATCTTTGGGTTTTGAA	<i>gag</i>
HML-6_2_For	For	AGAGAAGATCTTTGGGTTTTGAA	<i>gag</i>
HML-6_3_For	For	ATATAAGATCTTTGGGTTTTGAA	<i>gag</i>
HML-6_4_For	For	CGCGAAGATCTTTGGGTTTTGAA	<i>gag</i>
HML-6_5_For	For	CTCTAAGATCTTTGGGTTTTGAA	<i>gag</i>
HML-6_6_For	For	GAGAAAGATCTTTGGGTTTTGAA	<i>gag</i>
HML-6_7_For	For	TATAAAGATCTTTGGGTTTTGAA	<i>gag</i>
HML-6_8_For	For	TGTGAAGATCTTTGGGTTTTGAA	<i>gag</i>
HML-6_9_For	For	GTGTAAGATCTTTGGGTTTTGAA	<i>gag</i>
HML-6_10_For	For	ATGCAAGATCTTTGGGTTTTGAA	<i>gag</i>
HML-6_1_Rev	Rev	ACACCATGTTCTTCAACATTTTAA	<i>gag</i>
HML-6_2_Rev	Rev	AGAGCATGTTCTTCAACATTTTAA	<i>gag</i>
HML-6_3_Rev	Rev	ATATCATGTTCTTCAACATTTTAA	<i>gag</i>
HML-6_4_Rev	Rev	CGCGCATGTTCTTCAACATTTTAA	<i>gag</i>
HML-6_5_Rev	Rev	CTCTCATGTTCTTCAACATTTTAA	<i>gag</i>
HML-6_6_Rev	Rev	GTGTCATGTTCTTCAACATTTTAA	<i>gag</i>
HML-6_7_Rev	Rev	GCGCCATGTTCTTCAACATTTTAA	<i>gag</i>
HML-6_8_Rev	Rev	TGTGCATGTTCTTCAACATTTTAA	<i>gag</i>
HML-6_9_Rev	Rev	TCTCCATGTTCTTCAACATTTTAA	<i>gag</i>
HML-6_10_Rev	Rev	ATGCCATGTTCTTCAACATTTTAA	<i>gag</i>

## MATERIAL UND METHODEN

### HERV-W:

Name	Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Zielbereich
HERV-W_1_For	For	ACACGCACAGAAATAAACACCACTTCC	<i>env</i>
HERV-W_2_For	For	AGAGGCACAGAAATAAACACCACTTCC	<i>env</i>
HERV-W_3_For	For	ATATGCACAGAAATAAACACCACTTCC	<i>env</i>
HERV-W_4_For	For	CGCGGCACAGAAATAAACACCACTTCC	<i>env</i>
HERV-W_5_For	For	GAGAGCACAGAAATAAACACCACTTCC	<i>env</i>
HERV-W_6_For	For	CACAGCACAGAAATAAACACCACTTCC	<i>env</i>
HERV-W_7_For	For	TATAGCACAGAAATAAACACCACTTCC	<i>env</i>
HERV-W_8_For	For	GCGGCACAGAAATAAACACCACTTCC	<i>env</i>
HERV-W_9_For	For	TCTGCACAGAAATAAACACCACTTCC	<i>env</i>
HERV-W_10_For	For	ATGCGCACAGAAATAAACACCACTTCC	<i>env</i>
HERV-W_1_Rev	Rev	ACACGCTGCTAGGGAGTTAAGTTG	<i>env</i>
HERV-W_2_Rev	Rev	AGAGGCTGCTAGGGAGTTAAGTTG	<i>env</i>
HERV-W_3_Rev	Rev	ATATGCTGCTAGGGAGTTAAGTTG	<i>env</i>
HERV-W_4_Rev	Rev	CGCGGCTGCTAGGGAGTTAAGTTG	<i>env</i>
HERV-W_5_Rev	Rev	CTCTGCTGCTAGGGAGTTAAGTTG	<i>env</i>
HERV-W_6_Rev	Rev	GTGTGCTGCTAGGGAGTTAAGTTG	<i>env</i>
HERV-W_7_Rev	Rev	GATCGCTGCTAGGGAGTTAAGTTG	<i>env</i>
HERV-W_8_Rev	Rev	TGTGGCTGCTAGGGAGTTAAGTTG	<i>env</i>
HERV-W_9_Rev	Rev	AATTGCTGCTAGGGAGTTAAGTTG	<i>env</i>
HERV-W_10_Rev	Rev	ATGCGCTGCTAGGGAGTTAAGTTG	<i>env</i>

### ERV-9:

Name	Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Zielbereich
ERV-9_1_For	For	ACACAGACTTTGCTCTTTTCACATGC	<i>gag</i>
ERV-9_2_For	For	AGAGAGACTTTGCTCTTTTCACATGC	<i>gag</i>
ERV-9_3_For	For	ATATAGACTTTGCTCTTTTCACATGC	<i>gag</i>
ERV-9_4_For	For	CGCGAGACTTTGCTCTTTTCACATGC	<i>gag</i>
ERV-9_5_For	For	CTCTAGACTTTGCTCTTTTCACATGC	<i>gag</i>
ERV-9_6_For	For	CACAAGACTTTGCTCTTTTCACATGC	<i>gag</i>
ERV-9_7_For	For	TATAAGACTTTGCTCTTTTCACATGC	<i>gag</i>
ERV-9_8_For	For	TACGAGACTTTGCTCTTTTCACATGC	<i>gag</i>
ERV-9_9_For	For	TCTCAGACTTTGCTCTTTTCACATGC	<i>gag</i>
ERV-9_10_For	For	ATGCAGACTTTGCTCTTTTCACATGC	<i>gag</i>
ERV-9_1_Rev	Rev	ACACTGCTTCCTCTGGTATTTGAGA	<i>gag</i>
ERV-9_2_Rev	Rev	AGAGTGCTTCCTCTGGTATTTGAGA	<i>gag</i>
ERV-9_3_Rev	Rev	ATATGCTTCCTCTGGTATTTGAGA	<i>gag</i>
ERV-9_4_Rev	Rev	CGCGTGCTTCCTCTGGTATTTGAGA	<i>gag</i>
ERV-9_5_Rev	Rev	CTCTTGCTTCCTCTGGTATTTGAGA	<i>gag</i>
ERV-9_6_Rev	Rev	CACATGCTTCCTCTGGTATTTGAGA	<i>gag</i>
ERV-9_7_Rev	Rev	TATATGCTTCCTCTGGTATTTGAGA	<i>gag</i>
ERV-9_8_Rev	Rev	TGTGTGCTTCCTCTGGTATTTGAGA	<i>gag</i>
ERV-9_9_Rev	Rev	TCTCTGCTTCCTCTGGTATTTGAGA	<i>gag</i>
ERV-9_10_Rev	Rev	ATGCTGCTTCCTCTGGTATTTGAGA	<i>gag</i>

### HERV-E(4-1):

Name	Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Zielbereich
HERV-E_1_For	For	GAGATGTGGGTATAAGGTGTCCAAG	<i>gag</i>
HERV-E_2_For	For	AGAGTGTGGGTATAAGGTGTCCAAG	<i>gag</i>
HERV-E_3_For	For	ATATGTGGGTATAAGGTGTCCAAG	<i>gag</i>
HERV-E_4_For	For	CGCGTGTGGGTATAAGGTGTCCAAG	<i>gag</i>
HERV-E_5_For	For	GTGTGTGGGTATAAGGTGTCCAAG	<i>gag</i>
HERV-E_6_For	For	CACATGTGGGTATAAGGTGTCCAAG	<i>gag</i>
HERV-E_7_For	For	GCGCTGTGGGTATAAGGTGTCCAAG	<i>gag</i>
HERV-E_8_For	For	TGTGTGTGGGTATAAGGTGTCCAAG	<i>gag</i>
HERV-E_9_For	For	TCTCTGTGGGTATAAGGTGTCCAAG	<i>gag</i>

## MATERIAL UND METHODEN

HERV-E 10 For	For	ATGCTGTGGGTATAAGGTGTCCAAG	<i>gag</i>
HERV-E 1 Rev	Rev	ACACTGCTGCCAAGGCCCTCAAACA	<i>gag</i>
HERV-E 2 Rev	Rev	AGAGTGTGCTGCCAAGGCCCTCAAACA	<i>gag</i>
HERV-E 3 Rev	Rev	ATATGTGCTGCCAAGGCCCTCAAACA	<i>gag</i>
HERV-E 4 Rev	Rev	CGCGTGTGCTGCCAAGGCCCTCAAACA	<i>gag</i>
HERV-E 5 Rev	Rev	GAGATGTGCTGCCAAGGCCCTCAAACA	<i>gag</i>
HERV-E 6 Rev	Rev	CACATGTGCTGCCAAGGCCCTCAAACA	<i>gag</i>
HERV-E 7 Rev	Rev	TATATGTGCTGCCAAGGCCCTCAAACA	<i>gag</i>
HERV-E 8 Rev	Rev	GCGCTGTGCTGCCAAGGCCCTCAAACA	<i>gag</i>
HERV-E 9 Rev	Rev	TCTCTGTGCTGCCAAGGCCCTCAAACA	<i>gag</i>
HERV-E 10 Rev	Rev	ATGCTGTGCTGCCAAGGCCCTCAAACA	<i>gag</i>

### 2.1.3 Bakterienmedien

<b>LB-Agar</b>	LB-Medium +1,5% Agar (15 g/l)
<b>LB-Amp-IPTG-X-Gal-Platten</b>	LB-Agar 100 µg/ml Ampicillin 20 mM IPTG-Lösung 80 µg/ml X-Gal
<b>LB-Amp-Medium (nach Luria-Bertani)</b>	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 100 µg/ml Ampicillin ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> pH 7,5; autoklaviert
<b>SOC Vollmedium (Life Technologies, Invitrogen)</b>	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml 0,25 M KCl 5 ml 2 M MgCl <sub>2</sub> 20 ml 1 M Glucose ad 1 l mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> pH 7,0; autoklaviert

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>-Wasser angesetzt und entweder steril filtriert oder autoklaviert.

<b>NaBH<sub>4</sub>-Lösung-Reduktionslösung (für Microarray)</b>	Die Lösung wurde grundsätzlich kurz vor Gebrauch frisch angesetzt, da es zur Knallgasentwicklung (H <sub>2</sub> ) kommen kann!  (für bis zu 42 Objektträger:) NaBH <sub>4</sub> 2 g 1xPBS 600 ml 100% Ethanol 200 ml
<b>Vorhybridisierungslösung (für Microarray)</b>	6x SSC 15 ml (20x) 0,5% SDS 2,5 ml (10%) 1% BSA 0,5 g

## MATERIAL UND METHODEN

	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50 ml
<b>Hybridisierungslösung (für Microarray)</b>	3x SSC	150 µl (20x)
	0,2x SDS	20 µl (10x)
	50% Formamid	500 µl (100%)
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	230 µl
<b>SSC (20x) Puffer pH 7,0</b>	NaCl 3M	175,3 g
	NaCitrat 300mM	88,2 g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1l
<b>10x SDS-Puffer</b>	100 g Natriumdodecylsulfat in 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
<b>Waschlösung 1 (für Microarray)</b>	1x SSC	
	0,1% (w/v) SDS	
<b>Waschlösung 2 (für Microarray)</b>	0,1x SSC	
	0,1% (w/v) SDS	
<b>Waschlösung 3 (für Microarray)</b>	0,1x SSC	
<b>Ethanol (75-95%)</b>	100% Ethanol verdünnt mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
<b>Natrium-Acetat (3 M) Puffer, pH 5,2</b>	3 M Lösung, pH mit Essigsäure eingestellt	
<b>TAE-Puffer (50x): Tris Acetat EDTA Puffer</b>	2 M Tris-Acetat	
	1 mM Eisessig	
	0,1 M EDTA	
<b>DNA-Auftragspuffer für Gelelektrophorese</b>	15% Ficoll	
	5 mM EDTA	
	0,01% Bromphenolblau	
	0,01% Xylenxyanol	
<b>PBS-Puffer (Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung, pH 7,4)</b>	140 mM NaCl	
	5,4 mM KCl	
	9,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	
	2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
<b>Lösung für Agarosegele (1,0%)</b>	Agarose	1 g
	TAE-Puffer	100 ml
	Ethidiumbromid	5 µl

Nicht aufgelistete Puffer und Lösungen sind in den jeweiligen gebrauchsfertigen Reaktionssystem (Kits) enthalten und somit in deren Hersteller-Protokollen beschrieben.

### 2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
2-log-DNA Längenstandard	New England Biolabs, Schwalbach
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua bidest. (Milli-Q)	Millipore Water System, Eschborn
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
dNTPS (10 mM)	New England Biolabs, Schwalbach
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (absolut zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 1% (w/v in Aqua dest.)	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich, Steinheim

## MATERIAL UND METHODEN

Ficoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kalimuchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumborhydrid (NaBH <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNA <sup>later</sup>	Qiagen, Hilden
Tris-Acetat	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Roche Diagnostics, Mannheim
Xylenxyanol	Merck, Darmstadt

Nicht aufgelistete Reagenzien sind in den jeweiligen gebrauchsfertigen Reaktionssystem (Kits) enthalten und somit in deren Hersteller-Protokollen beschrieben.

### 2.1.6 Enzyme und Proteine

Name	Hersteller
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Restriktionsenzyme (diverse)	New England Biolabs, Schwalbach
RNase H (2 U/μl)	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
RNaseOUT™ [40 U/μl]	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
SuperScript™ II RT [50 U/μl]	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
T4 DNA Ligase [3 U/μl]	Promega, Mannheim
Pfu-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim

### 2.1.7 Sonstige Labormaterialien

Name	Hersteller
384 Well Platten mit Deckel, steril	Genetix Limited, New Milton, UK
96 Well-Platte	4titude Ltd., UK
Cellstar® Pipetten, diverse Größen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CSS-100 Silylierte Slides	ArrayIt-CEL-Associates, Los Angeles, USA
Deckgläser Lifter-Slip 22x22	Erie Scientific Company, Portsmouth, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon® Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	BD Falcon, Düren
Filter für Sterilfiltration	Millipore, Schwalbach
Filterpapier, Whatman	Schleicher und Schuell, Dassel
Fixogum	Marabu GmbH & Co. KG, Tamm
Hybridisierungskammer für Microarray	Greiner, Nürtingen
Lichtgeschützte Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
PCR Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pechiney Parafilm M PM996	Alcan Inc., Canada

## MATERIAL UND METHODEN

Pipetten Pipetman® Gilson	Gilson Inc., USA
Plastikkammer (für Hybridisierung)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Skalpell (steril)	Aesculap AG, Tuttlingen
Objektträger-Transportbox	Greiner, Nürtingen
Whatman Papier	Whatman, Maidstone, UK

Sonstige Verbrauchsmaterialien wurden von Becton Dickinson (Düren), Eppendorf (Hamburg), Gilson (Den Haag, Niederlande) oder Sarstedt (Newton, USA) bezogen.

### 2.1.8 Geräte

Name	Hersteller
Agarosegelapparaturen	Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
ChemiDoc Geldokumentationsanlage	BioRad, München
Elektrophorese Power PAC basic	BioRad, München
Eppendorf Mastercycler und Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage NewClassicML	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
GMS 418 Array-Scanner	Affymetrix, Santa Clara, USA
HERAEUS Pico17 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LaminAir Sterilwerkbank	Holten LaminairA/S, Allerød, Dänemark
LightCycler 480 System	Roche, Mannheim
Microgrid II Spotter	Biorobotics Digilab, Marlborough, USA
Mini Zentrifuge Sprout	Heathrow Scientific®, Vernon Hills, USA
MultiTron Schüttelinkubator	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
MS3basic Vortexer	IKA®-Werke, Staufen
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RCTbasic	IKA®-Werke, Staufen
Rotanta 460R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Scaltec SPO51 Waage	Sartorius AG, Göttingen
SmartSpec™ Plus Spectrofotometer	BioRad, München
Spectrafuge 24B Zentrifuge	Abimed Analysen-Technik, Langenfeld
Thermoblock TB2	Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator IL350 UV-Tisch	Bachofen Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Wasser-Schüttelbad	Köttermann Labortechnik, Hannover

### 2.1.9 Software und Datenbanken

Name	Hersteller
Adobe Acrobat CS3	Adobe systems, USA
Adobe Illustrator CS3	Adobe systems, USA
Adobe Photoshop CS3	Adobe systems, USA
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast</a>
Endnote X1	Thomson ISI ResearchSoft

## MATERIAL UND METHODEN

GeneCards®	<a href="http://www.genecards.org/">http://www.genecards.org/</a>
Google scholar	<a href="http://scholar.google.de/">http://scholar.google.de/</a>
ImaGene Version Software tool package	BioDiscovery Inc., Los Angeles, USA
Light Cycler 480 Software	Roche Diagnostics, Mannheim
Medline	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed</a>
Microsoft Office 2010	Microsoft Corp., USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corp., USA
Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotoools/oligocalc.html">http://www.basic.northwestern.edu/biotoools/oligocalc.html</a>
ORF Finder (Open Reading Frame Finder)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/</a>
Prism 4.0	GraphPad, San Diego, USA
SDSC Biology WorkBench	<a href="http://workbench.sdsc.edu/">http://workbench.sdsc.edu/</a>
Software Gel-Doc Quantity One	Version 2.4.1 Build 008 BioRad, München
UCSC Genome Bioinformatics	<a href="http://www.genome.ucsc.edu">http://www.genome.ucsc.edu</a>
UniProtKB	<a href="http://www.uniprot.org/help/uniprotkb">http://www.uniprot.org/help/uniprotkb</a>

### 2.1.10 Gewebeproben

#### Brustdrüsengewebe:

Humanes gesundes Brustdrüsengewebe, Brustdrüsentumorgewebe und Lymphknotenmetastasen wurden von Frau Dr. Beyhan Ataseven von der Frauenklinik des Rotkreuzklinikums in München bereitgestellt. Die Mammakarzinom-Proben wurden mit einem ca. 2 cm großen Sicherheitsabstand operativ entfernt. Aus diesem Bereich stammen die gesunden Gewebeproben. Bei Patientinnen bei denen bereits der Brusttumor in die Lymphknoten metastasiert hatte, wurden diese zudem mitentfernt. Insgesamt wurden 127 Gewebeproben von 59 Patientinnen bereitgestellt. Darunter befanden sich 59 Mamakarzinom Proben und 58 (ipsilateral) gesunde Brustdrüsengewebeproben und zehn Lymphknotenmetastasen.

Alle Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei -80°C bis zur RNA-Extraktion gelagert.

#### Urothelgewebe:

Humanes gesundes und malignes Urothelgewebe stammen von der Urologischen Klinik des Klinikums rechts der Isar in München und wurden von Dr. Dieter Hoffmann aus der Diagnostik des Institutes für Virologie bereitgestellt. Das gesunde Gewebe wurde ebenfalls aus dem umliegenden Gewebe des Tumors, welches als Vorsichtsmaßnahme mitentfernt wurde, gewonnen. Insgesamt wurden von 32 PatientInnen 63 Gewebeproben bereitgestellt, worunter sich 32 maligne und 31 gesunde Urothelgewebeproben befanden.

Alle Proben wurden direkt nach der operativen Entfernung in RNA $later$  (Qiagen, Hilden) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 RNA-Isolierung aus humanen Gewebeproben

Die Gesamt-RNA aus humanen Gewebeproben wurde mittels peqGOLD HP Total RNA Kit für fettreiches Gewebe (Peqlab, Erlangen) isoliert. Dieses basiert auf einer Phenol-Chloroform-Extraktion. Vor der Isolierung wurden die gefrorenen Gewebeproben mit einem Skalpell in ca. 4 mm große Blöcke geteilt. Falls die Proben in RNA $later$  gelagert waren, wurde dieses vor der Teilung der Probe abgenommen. Anschließend wurden die Gewebelöcke in je 1-2 ml peqGOLD Trifast Lysepuffer mit einem Glashomogenisator lysiert und homogenisiert. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben des Kits. Die Gesamt-RNA wurde jeweils in 25-30  $\mu\text{l}$   $70^{\circ}\text{C}$  warmen DEPC-behandeltem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  eluiert. Abschließend wurde die RNA-Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt (2.2.1.2).

#### 2.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die optische Dichte der gelösten Nukleinsäure-Präparation bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ( $\text{OD}_{260}$ ) mit dem Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, USA) gemessen. Die  $\text{OD}_{260}$  entspricht dabei dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Zur Ermittlung der Konzentration in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  wurde die gemessene  $\text{OD}_{260}$  für RNA mit dem Faktor 40 und für DNA mit dem Faktor 50 multipliziert. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei  $280 \text{ nm}$  ( $\text{OD}_{280}$ ) haben, kann aus dem Quotient der  $\text{OD}_{260}$  und der  $\text{OD}_{280}$  die Reinheit der Nukleinsäure-Präparationen bestimmt werden. Im Idealfall liegt der Quotient für reine DNA bei 1,8 und für reine RNA bei 2,0.

### 2.2.1.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Eine Polymerase Ketten Reaktion dient zur klonalen Amplifikation eines spezifischen Sequenz-Abschnittes einer DNA-Matrize. Für eine PCR-Reaktion wird die Matrize mit spezifischen Oligonukleotiden (Primern) und Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) gemischt. Durch Zugabe eines thermostabilen Polymerase-Enzymes, wie z.B. der Taq-Polymerase, und der zyklischen Wiederholung folgender Schritte, kommt es zur Amplifikation des gewünschten Sequenzbereiches.

Denaturierung:	Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA-Matrize durch Erhitzen
Annealing:	Anlagerung (Hybridisierung) der Primer an ihre komplementären Zielsequenzen unter Primer-spezifischen Temperaturen
Elongation:	Verlängerung des zur Matrize komplementären DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase in 5'-3'Richtung unter dNTP-Verbrauch

Die in einem Zyklus neu synthetisierte DNA wird jeweils in den darauffolgenden Zyklen wiederum als Matrize verwendet. Dadurch kommt es unter optimalen Bedingungen zu einer exponentiellen Amplifikation des Zielsequenzbereiches. Um unspezifische Primerbindungen zu minimieren wurde stets eine Annealingtemperatur verwendet die 3°C unter der nach Suggs (Suggs *et al.* 1981) berechneten Primerdissoziationstemperatur  $T_D$  lag.

$$T_D [^{\circ}\text{C}] = 4x(C+G) + 2x(A+T)$$

(C,G,A und T = Anzahl der Nukleotide)

#### 2.2.1.3.1 PCR mit der Taq-Polymerase

Die Taq-Polymerase besitzt keine Korrekturlese (proof reading) -Funktion weshalb es bei der Amplifikation einer DNA-Matrize per PCR häufig zu Sequenzfehlern in den amplifizierten DNA-Fragmenten kommen kann. War eine exakte DNA-Amplifikation der Sequenz nötig wurde deshalb keine Taq-Polymerase verwendet.

Für eine PCR mit der Taq-Polymerase wurde stets das GoTaq-PCR-System (Promega, Mannheim) verwendet.

## MATERIAL UND METHODEN

### PCR-Ansatz für die GoTaq-Polymerase:

5x GoTaq Reaktions-Puffer	5,0 µl
dNTPs (10 mM)	1,0 µl
Primer 5' (10 µM)	1,0 µl
Primer 3' (10 µM)	1,0 µl
GoTaq Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
DNA-Matrize (min. 200nM)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad Σ 25 µl

### PCR-Programm:

	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	30x
Annealing	variabel	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Kühlen	4 °C	∞	

PCR-Produkte wurden mit einer Agarosegelelektrophorese (2.2.1.4) analysiert und je nach Bedarf aus dem Gel extrahiert (2.2.1.5).

### 2.2.1.3.2 PCR mit der Pfu-Polymerase

Die Pfu-Polymerase besitzt eine proof reading Funktion, weshalb sie verwendet wurde wenn die Amplifikation exakter Sequenzen in einer PCR von Nöten war. Sie ist im Gegensatz zur Taq-Polymerase zwar weniger fehlerbehaftet jedoch auch langsamer.

### PCR-Ansatz für die Pfu-Polymerase:

10x Pfu-Polymerase Puffer mit MgSO <sub>4</sub>	5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
vorwärts Primer (10 µM)	1 µl
rückwärts Primer (10 µM)	1 µl
DNA-Matrize (min. 200nM)	4 µl
Pfu DNA-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad Σ 50 µl

## MATERIAL UND METHODEN

### PCR-Programm:

	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	40x
Annealing	variabel	30 s	
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	15 min	
Kühlen	4 °C	∞	

### 2.2.1.3.3 PCR mit dem Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim)

Das Expand High Fidelity PCR System enthält einen Enzymmix aus der Taq-DNA-Polymerase und einer speziellen DNA-Polymerase mit proof reading Aktivität. Zudem besitzt die letztere auch eine Terminaltransferase-Aktivität und hängt an die 5'-Enden der Amplifikate einzelne Adenine an. Diese eignen sich für eine TA-Klonierung (2.2.1.8).

### PCR-Ansatz für das Expand High Fidelity PCR System:

10x HighFidelity PCR Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
vorwärts Primer (10 µM)	1 µl
rückwärts Primer (10 µM)	1 µl
DNA-Matrize (min. 200nM)	2 µl
HighFidelity DNA-Polymerase-Mix (3,5 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad ∑ 50 µl

### PCR-Programm:

	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	40x
Annealing	variabel	45 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Kühlen	4 °C	∞	

### 2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Aufgrund ihrer negativen Ladungen wandern DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld zur Anode hin. Je kleiner die Fragmente sind desto schneller wandern diese durch die Agarosegelmatrix (Sambrook *et al.* 1989).

Je nach zu erwartender Länge der DNA-Fragmente wurden 1,5-2%ige Agarosegele verwendet. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr), einem in DNA interkalierenden Farbstoff, konnten die DNA-Banden anschließend durch UV- Bestrahlung visualisiert werden. Vor der Beladung des Gels wurden die Proben mit 1/6 Volumen Auftragspuffer gemischt. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese bei ca. 90 V für 50 min in 1x TAE Puffer. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein 2-log Längenstandard mitgeführt. Eine Analyse des Gels erfolgte abschließend mit der ChemiDoc Geldokumentationsanlage (BioRad, München) unter UV-Licht.

### 2.2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (2.2.1.4), wurden diese aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem Nukleo Spin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde abschließend mit 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> eluiert.

### 2.2.1.6 DNase Verdau von RNA

Um aus der präparierten RNA Verunreinigungen mit genomischer DNA zu entfernen wurden RNA Proben stets mit der RNase-freien DNase des RQ1 DNase Kits (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben verdaut.

#### Ansatz DNase Verdau:

Gesamt-RNA	1-2 µg
RQ1 DNase Puffer	1 µl
RNase-frei DNase (1U/µl)	2 µl
DEPC-behandeltes H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad ∑10 µl

## MATERIAL UND METHODEN

Der DNase Verdau wurde nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C durch Zugabe von 1 µl RQ1 DNase Stop Solution und 10-minütiger Inkubation bei 65°C gestoppt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Eliminierung von DNA-Kontaminationen wurde anschließend mit 0,5 µl der verdauten RNA eine Kontroll-PCR mit dem GoTaq-PCR System durchgeführt (2.2.1.3.1). Hierfür wurden HERV-L LTR spezifische Primer verwendet, die mehr als 6000 HERV-L LTRs im Genom amplifizieren.

Anschließend wurde der PCR Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.4). Hierbei konnte meist nur bei der Positivkontrolle, eine (650 bp) oder mehrere Banden nachgewiesen werden. Waren diese Banden auch in den DNase verdauten RNA Proben detektierbar, wurde der DNase Verdau wiederholt.

### **2.2.1.7 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)**

Die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde mit dem SuperScript II™ First Strand Synthesis System (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Verwendet wurde dazu nur DNA-freie RNA (2.2.1.6). Pro Ansatz wurden 7 µl DNase-verdaute RNA und 2 µl random Hexamer-Oligonukleotide als Primer verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben. Abschließend wurde zum RNA-Abbau im RNA-cDNA-Hybridstrang ein optionaler RNase-Verdau mit 0,5 µl RNase H (5 U/µl) bei 37°C für 20 min durchgeführt.

### **2.2.1.8 TA-Klonierung**

Die Methode der TA-Klonierung ermöglicht eine einfache Ligation von Zielsequenzen in einen bakteriellen Vektor, der wiederum einfach zu vervielfältigen und sequenzieren ist. Für die Amplifikation der Zielsequenzen wurde das Expand High Fidelity Polymerase System verwendet (2.2.1.3.3). Die 5' Adenin-Überhänge an den Amplifikaten, die aus der PCR hervorgehen, können sofort in einer „sticky-end“ Ligation in den bereits linearisierten pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim), der 3'-komplementäre einzelne Thymidin-Überhänge besitzt, eingefügt werden.

### Ansatz Ligation:

2x Ligatonspuffer	5 $\mu$ l
DNA-Matrize (min. 200 NM)	1-3 $\mu$ l
pGEM-T Vektor (50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
T4-DNA-Ligase (U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
DEPC-behandeltes H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad $\Sigma$ 10 $\mu$ l

Der Ligationsansatz wurde ü.N. bei 4°C inkubiert.

### 2.2.1.9 Transformation von *E.coli* Bakterien mittels Hitzeschock

Für die Transformation der ligierten Vektoren wurden XL10-Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) *E.coli* Bakterien verwendet. Pro Ansatz wurden 37,5  $\mu$ l Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut, mit 1,4  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol in einem vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßes gemischt und 10 min auf Eis inkubiert, wobei ca. alle 2 min durch vorsichtiges Anschnippen des Reaktionsgefäßes gemischt wurde. Danach wurden 3  $\mu$ l des Ligationsansatzes hinzugegeben, durch Schwenken des Gefäßes gemischt und wiederum 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien im 42°C warmen Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt, wodurch die ligierte DNA von den Bakterienzellen aufgenommen wird, gefolgt von einem 2 minütigen Abkühlen auf Eis. Abschließend wurde zu den Bakterien 500  $\mu$ l 42°C warmes SOC-Medium gegeben und 1 h bei 37°C und 300 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. 200 $\mu$ l des Ansatzes wurden auf LB-Agar-Platten, die mit Ampicilin, IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) und XGal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) für eine Blau-Weiß-Selektion versetzt waren, ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht im Brutschrank.

### 2.2.1.10 Blau-Weiß-Selektion

Mit einer Blau-Weiß-Selektion wurde sowohl der Erfolg der Ligation eines DNA-Fragmentes in den pGEM-T Vektor (2.2.1.8) als auch der Transformation von XL10 GOLD Ultracompetent Cells überprüft (2.2.1.9).

Durch den Mediumszusatz von Ampicilin können nur Kolonien anwachsen, die einen pGEM-T Vektor tragen der für die entsprechende Resistenz kodiert. Zudem erscheinen Kolonien, die einen pGEM-T Vektor samt Insert tragen, weiß, während Kolonien die nur einen religierten Vektor ohne Insert tragen blaugefärbt sind. Dies beruht darauf, dass die

## MATERIAL UND METHODEN

Insertionsstelle im pGEM-T Vektor innerhalb des LacZ-Reportergens liegt. Bei einer erfolgreichen Ligation des Inserts in den Vektor bleibt der LacZ-ORF unvollständig, wodurch  $\beta$ -Galactosidase nicht gebildet werden kann. Dadurch wird der gelbe Farbstoff X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), der dem Medium zugesetzt wurde, nicht gespalten. Bei einer Religation wird der LacZ-ORF hingegen wieder vervollständigt, wodurch X-Gal durch die  $\beta$ -Galactosidase zu einem blauen Farbstoff (5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo) umgesetzt wird.

### **2.2.1.11 Kultivierung und Ernten von XL10-Gold *E.coli* Bakterien**

Weiße Kolonien wurden von den LB-Agar-Platten „gepickt“ und in je 3,5 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) über Nacht bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 1,5 ml der Bakterienkulturen bei 11.000 g 2 min zentrifugiert und das LB-Medium abgenommen.

### **2.2.1.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus bakteriellen Zellen**

Für eine Überprüfung des Klonierungserfolges wurde eine Plasmidminipräparation durchgeführt. Hierfür wurde die am Vortag angesetzte Bakterienkultur geerntet (2.2.1.11) und die Plasmid-DNA gemäß Herstellerangaben aus Bakterienzellen mit dem Nucleo Spin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) isoliert und mit 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> eluiert.

### **2.2.1.13 Restriktionsverdau**

Zur Überprüfung der Größe eines im Plasmid enthaltenen Inserts, wurde ein Teil der präparierten Plasmid-DNA (2.2.1.12) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen 1 h bei 37°C verdaut.

### Ansatz eines Kontrollverdaus

10x NEB-Puffer	2 $\mu$ l
(gegebenenfalls) 10x BSA	2 $\mu$ l
Restriktionsenzym 1	0,3 $\mu$ l
Restriktionsenzym 2	0,3 $\mu$ l
Plasmid-DNA (ca. 200ng/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad $\Sigma$ 20 $\mu$ l

Zur Visualisierung wurde der Restriktionsansatz anschließend gelelektrophoretisch (2.2.1.4) aufgetrennt.

### 2.2.1.14 Sequenzierung nach Sanger

Korrekt klonierte Plasmide wurden mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* von Seq-IT GmbH & Co. KG (Kaiserslautern) bzw. Eurofins MWG Operon (Martinsried) sequenziert.

### 2.2.1.15 Retrovirus-spezifischer Microarray (RetroArray)

Ein RetroArray dient dazu schnell und effizient die Transkription mehrerer HERV-Gruppen gleichzeitig zu analysieren und besteht generell aus zwei Hauptschritten (Seifarth *et al.* 2003, Seifarth *et al.* 2005). Im ersten Schritt werden, durch die Verwendung von HERV-Gruppen spezifischen Fluorochrom-markierten Primer, gewünschte DNA-Abschnitte einer cDNA-Matrize per PCR amplifiziert. Im zweiten Schritt werden diese auf Aldehyd-beschichtete Glasobjektträger hybridisiert. Auf diesen sind spezifische Oligonukleotide (die sogenannten „capture probes“), die eine Diskriminierung und Detektion einzelner Retrovirus-Sequenzen erlauben, vorher aufgebracht worden. Befinden sich in der Hybridisierungsprobe DNA-Fragmente die komplementär zu einzelnen capture probes sind, kommt es zur Bindung und ein Fluoreszenzsignal kann nach Anregung mit einem Laser ausgelesen werden. Da die genaue Position jeder capture probe auf dem Objektträger bekannt ist und jede Probe nur eine spezifische Sequenz erkennt, kann anhand des Fluoreszenzmusters bestimmt werden, welche HERV-Gruppen transkriptionell aktiv sind. Zusätzlich kann anhand der Intensität des emittierten Lichts eine semiquantitative Aussage über den Grad der transkriptionellen Aktivität einzelner HERV-Gruppen gemacht werden.

### 2.2.1.15.1 Multiplex-PCR

Von synthetisierter cDNA (2.2.1.7) der Gewebeproben, von denen ein HERV-Expressionsprofil erstellt werden sollte, mussten zuerst mittels Multiplex-PCR alle HERV-Sequenzen amplifiziert werden. Hierfür wurden insgesamt drei Cy3-Fluorochrom-markierte Primer-Sets verwendet: Mixed-Oligonukleotid-Primer I (MOP-ABD-Set), welches hauptsächlich humane  $\beta$ -retrovirale RT-Sequenzen erfasst; Mixed-Oligonukleotid-Primer II (MOP-CHA-Set), welches retrovirale RT-Sequenzen von  $\gamma$ -, Spumaviren und diversen humanen exogenen Retroviren erkennt; und ein „housekeeping“ Gen-Set (HKG-Set), das zur internen Kontrolle der RNA/cDNA-Qualität und Reproduzierbarkeit der Analyse dient (Seifarth *et al.* 2003). Die beiden MOP-Sets bestehen aus degenerierten Primermischungen, die die hochkonservierten Sequenzbereiche VLPQG und YM/VDD im *pol*-Gen von Retroviren erkennen (Seifarth *et al.* 2000) (Abb. 2.1). Das dazwischen liegende 90 bp lange Sequenzstück ist essentiell für die Diskriminierung der einzelnen HERV-Gruppen, da es zu den auf den Microarray aufgetragenen capture probes komplementär ist. Die genaue Primer-Zusammensetzung der verwendeten Sets ist dem Punkt 2.1.2.1 zu entnehmen.

Die Multiplex-PCR-Reaktion wurde für jedes MOP-Primer-Set separat durchgeführt, um optimale Amplifikationsbedingungen zu gewährleisten (Seifarth *et al.* 2000). Für die PCR wurde das HighFidelity PCR System (Roche, Mannheim) verwendet. Die PCR wurde wie unter 2.2.1.3.3 beschrieben angesetzt.

#### PCR-Programm für eine Multiplex-PCR:

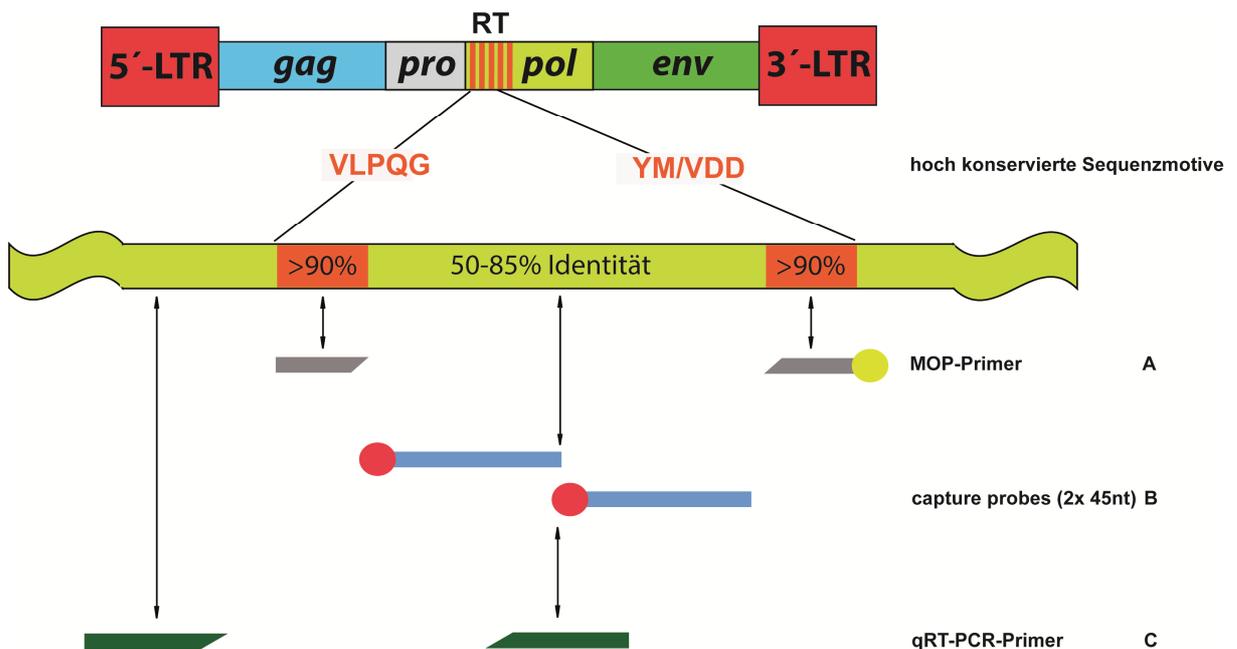
	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	1x
Denaturierung	95 °C	30 s	3 x
Annealing	42 °C	3 min	
Denaturierung	72 °C	2 min	
Annealing	95 °C	30 s	30 x
Annealing	50 °C	2min	
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Kühlen	4 °C	$\infty$	

Nach der Multiplex-PCR wurden 5  $\mu$ l jedes PCR-Ansatzes per Agarosegelelektrophorese (2.2.1.4) analysiert um eine erfolgreiche Amplifizierung sicherzustellen. Dabei zeigten HERV-Amplifikate eine Bande von ca. 125-150 bp und die HKG-Amplifikate eine Bande von ca. 250 bp Länge.

### 2.2.1.15.2 Vorbereitung der Microarray-Objektträger

Die für den Microarray verwendeten capture probes wurden jeweils als 45 bp lange Oligomere synthetisiert (Metabion, Martinsried) und ermöglichen die Erkennung eines 90 Basen langen Abschnitts im *pol*-Gen von Retroviren. Dieser Abschnitt besitzt eine hohe Sequenzvariabilität von 50-80% zwischen einzelnen HERV-(Sub-)Gruppen und eignet sich deshalb zu deren Diskriminierung (vgl. Abb. 2.1). Des Weiteren sind die capture probes an ihrem 5'-Ende mit einer Aminogruppe (C6) modifiziert, so dass diese kovalent an die Aldehydbeschichtung des Objektträgers binden und dadurch immobilisiert werden können (Seifarth *et al.* 2003). Bevor die capture probes auf den Objektträgern aufgetragen („gespottet“) wurden, wurden sie in 3-fachem SSC Puffer auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Zusätzlich wurden noch Cy3-markierte Lokalisierungs-Oligomere verwendet, die zur Positionsbestimmung und Ausrichtung des „Spotting-Musters“ dienen (vgl. Abb. 2.2).

Alle Cy3-Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide wurden aus Stabilitätsgründen in 10mM PO<sub>4</sub><sup>-</sup>-Puffer gelagert.



**Abbildung 2.1: Lokalisierung der MOP-Primer (A), capture probes (B) und qRT-PCR-Primer (C).** Die beiden Sequenzmotive VLPQG und YM/VDD (in rot), die im Reverse-Transkriptase-(RT) Bereich des retroviralen *pol*-Gens liegen, sind die in Retroviren konserviertesten Regionen. In diesen Abschnitten sind die MOP Primer lokalisiert, wobei der 3'-Primer Cy3-Fluoreszenz markiert ist (A, gelber Kreis). Der ca. 90 bp lange Bereich zwischen den am höchsten konservierten Abschnitten wird von den capture probes erkannt (B). Für eine Validierung der Microarray Ergebnisse mittels qRT-PCR wurden HERV-Gruppen spezifische Primer verwendet, von denen einer im Bereich der capture probes und einer außerhalb, ca. 150 bp „up- bzw. downstream“ liegt (C) (Abbildung verändert nach Seifarth *et al.* 2009).

### 2.2.1.15.3 Auftragen/„Spotten“ der „capture probes“

Zuerst wurden jeweils die zwei zusammengehörigen capture probes einer HERV-Subgruppe zu gleichen Teilen gemischt („gepooled“). Anschließend wurden je 34 µl dieser Mischungen („Pools“) mit 12 µl 20-fachem SSC Puffer gemischt und in eine 384-Well Platte pipettiert. Danach wurden die Proben auf silylierte CSS-100 Glasobjektträger (Silane mit Aldehydbeschichtung) entsprechend dem Spotting-Muster auf Seite (vgl. Abb. 2.2) mit einem MicroGrid II Spotter (Biorobotics Digilab, Marlborough, USA) viermal aufgebracht. Abschließend wurden die Glasobjektträger 2-4 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und dann mindestens 14 h im Dunklen getrocknet.

Nadel 3	a1	a2	a3	a4	c1	c2	c3	c4	Nadel 4
F	HPRT		HERV-ADP		F	HML-5		NMWV7	
E	Beta actin		seq56		E	HERV-K(D1.2)		NMWV-3	
D	RPL19		Seq38		D	HERV-K(HP1)		NMWV-9	
C	GAPD	HERV-Fb	HML-6		C	HML-2.HOM		Seq66	
B	Ubiquitin	HERV-F	Seq29	s71 pCRTK-1	B	HERV-K10	Seq31	HERV-H	cy3
A	cy3	HERV-F(2)	HML-1	s71 pCRTK-6	A	cy3	HERV-KC4	RGH2	MMTV

Nadel 1	b1	b2	b3	b4	d1	d2	d3	d4	Nadel 2
F	seq58		Seq65		F	seq10		HERV-W	
E	seq51		HERV-IP(FTD)		E	HERV1		Seq60	
D	seq45		HERV-I		D	HML-3		Seq59	
C	Seq39	MoMLV	HERV-Z		C	seq34		ERV9	
B	HERV-L	Seq77	HS49C23	Seq32	B	seq26	HERV-Rb	Seq63	HERV-K(T47D)
A	cy3	HERV-S	ERV-FRD	HERV-E(4-1)	A	cy3	HERV-R	Seq64	seq43

<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:lightgreen; border:1px solid black;"></span> "House keeping" Gene	<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:yellow; border:1px solid black;"></span> Klasse I HERVs
<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:yellow; border:1px solid black;"></span> Lokalisierungspunkte	<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:lightgreen; border:1px solid black;"></span> Klasse II HERVs
<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:lightgrey; border:1px solid black;"></span> murine endogene Retroviren	<span style="display:inline-block; width:15px; height:10px; background-color:lightblue; border:1px solid black;"></span> Klasse III HERVs

**Abbildung 2.2: Anordnung der Retrovirus- und Gen-spezifischen Oligonukleotide (capture probes) auf dem Glasobjektträger.**

Die einzelnen HERV-Gruppen und ihre Lokalisierung auf dem Objektträger sind mit ihrer genauen Position (Kombination aus Buchstaben und Nummer) aufgeführt. Die Zugehörigkeit der einzelnen Proben zu den HERV-Klassen ist zudem farblich gekennzeichnet. Zusätzlich ist angegeben, welche der einzelnen Proben von welcher der vier Nadeln, die für das Spotten verwendet wurden, auf dem Objektträger aufgebracht wurden.

### 2.2.1.15.4 Nachbehandlung der „gespotteten“ Objektträger

Nach dem Spotten wurden die getrockneten Objektträger 2 min mit 0,2%igem SDS Puffer und je zweimal für 1 min mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> unter heftigem Schütteln gewaschen. Damit es nicht zu unspezifischen Bindungen von Nukleinsäuren an den Objektträger kommt, wurden Aldehydgruppen an denen keine capture probes kovalent gebunden hatten, 5 min mit frischem NaBH<sub>4</sub><sup>-</sup> Puffer unter leichtem Schütteln reduziert. Danach wurde einmal 1 min mit 0,2%igem SDS Puffer und zweimal 2 min mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen. Zum Trocknen wurden die

Objektträger in 50 ml Falcons 2 min bei 1200 rpm zentrifugiert und anschließend trocken im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Die gespotteten Objektträger sind bis zu 12 Monate haltbar.

### **2.2.1.15.5 Vorhybridisierung**

Vor der Hybridisierung wurden die nachbehandelten Objektträger mit BSA-haltiger Vorhybridisierungslösung 3 h bei 50°C inkubiert. Dies dient ebenfalls zur Blockierung von unspezifischen Bindungen an den Objektträger, wodurch zusätzlich die Hintergrundfluoreszenz signifikant reduziert wird. Nach dieser Vorhybridisierung wurden Puffer-Reste durch fünfmaliges Waschen à 10 min mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> unter stetigem Schütteln entfernt und die Objektträger wie in 2.2.1.15.4 beschrieben trocken zentrifugiert.

### **2.2.1.15.6 Kontrollhybridisierung vorhybridisierter Objektträger mit antisense Kontroll-Oligonukleotiden**

Die Qualität der gespotteten Objektträger wurde vor dem Hybridisierungsversuch nochmals stichprobenartig mit einer Kontrollhybridisierung überprüft. Hierfür wurden antisense Kontroll-Oligonukleotide gegen MMTV, HERV-K(HML-5), HERV-W, HERV-K(HML-2) (2.HOM) und HERV-K(HML-1) verwendet. Diese sind komplementär zu den entsprechenden capture probes auf den Objektträgern und tragen am 5' Ende eine Cy3-Markierung. Für die Kontrollhybridisierung wurden je 0,5 µl der antisense Nukleotide (50 pmol/µl) mit 23 µl Hybridisierungspuffer gemischt, 5 min bei 95°C denaturiert und sofort mittels der Deckglasmethode (2.2.1.15.7) auf den vorhybridisierten Objektträgern appliziert. Anschließend wurde über Nacht hybridisiert (2.2.1.15.7), am nächsten Tag gewaschen (2.2.1.15.8) und die Fluoreszenzsignale (2.2.1.15.9) ausgelesen.

### **2.2.1.15.7 Hybridisierung von Microarray-Objektträgern mittels Deckglas-Methode**

Für die Hybridisierung der cDNA-Proben wurden nur vorhybridisierte Objektträger-Serien verwendet, die in der Kontrollhybridisierung gleichmäßig gespottete capture probe-Signale und eine geringe Hintergrund-Fluoreszenz aufwiesen.

## MATERIAL UND METHODEN

Für die Hybridisierung wurden die Objektträger an den gespotteten Stellen mit speziellen Deckgläsern, die an zwei gegenüberliegenden Glasunterkanten eine kleine weiße Leiste besitzen, so mit Fixogum beklebt, dass das Deckglas nicht komplett aufliegt und sich so ein sehr schmaler Reaktionsraum bildet. Die MOP-ABD und -CHA Multiplex-PCR Amplifikate wurden vereinigt und die DNA durch Zugabe von 9 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 287 µl kaltem 100%igem Ethanol bei -80°C für 30 min gefällt. Bei 4°C und 13000 rpm wurde die gefällte DNA dann 25 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach Trocknung des Pellets bei Raumtemperatur, wurde die DNA in 23 µl frisch angesetzter Hybridisierungslösung resuspendiert. Nach der Denaturierung der DNA für 5 min bei 95 °C und einer kurzen Zentrifugation wurde die DNA-Lösung in den Reaktionsraum zwischen Objektträger und Deckglas appliziert. Die restlichen beiden Seiten des Deckglases wurden mit Fixogum versiegelt und der gesamte Objektträger in eine Hybridisierungskammer überführt, in die zur Verhinderung des Austrocknens ein mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> befeuchteter Whatman-Papierstreifen hineingegeben wurde. Nach Abdichtung der Hybridisierungskammer mit Parafilm erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 42°C (ca. 14-16 h) in einem Schüttelwasserbad.

### **2.2.1.15.8 Waschen und Trocknen von hybridisierten Microarray-Objektträgern**

Nach der Hybridisierung über Nacht wurden die Objektträger mit drei verschiedenen Waschlösungen unter heftigem Schütteln gewaschen. Zunächst wurden die Deckgläser mit einem Skalpell in 42°C vorgewärmter Waschlösung 1 (vgl. 2.1.4) vorsichtig abgelöst und Fixogum-Überreste entfernt. Anschließend wurden die Objektträger in 50 ml Falcons zweimal 2 min in warmer Waschlösung 1 unter heftigem Schütteln gewaschen. Die Waschschrte wurden mit Waschlösung 2 und 3 (vgl. 2.1.4) wiederholt. Abschließend wurden die Objektträger zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült um Rückstände der Waschlösungen zu entfernen. Nachdem die Microarray-Objektträger trocken zentrifugiert wurden (2.2.1.15.4), konnten sie ausgelesen werden.

### **2.2.1.15.9 Scannen und Auswerten der Microarray-Objektträger**

Alle Objektträger wurden mit dem Affymetrix GMS 418 Array Scanner eingelesen. Die Laserstärke betrug 100% und es wurde je nach Intensität der Hintergrundfluoreszenz eine Laser-Amplifikation („Gain“) von 40-60 gewählt. Das detektierte, emittierte Licht wurde mit dem ImaGene Version Software tool package (BioDiscovery Inc., Los Angeles, USA) in ein

Falschfarbenbild umgewandelt, wodurch eine qualitative und semi-quantitative Interpretation anhand einer Farbintensitätsskala möglich war. Die erhaltenen Daten wurden zusätzlich noch mittels Adobe Photoshop CS3 und Adobe Illustrator CS3 (beide Adobe systems, USA) sortiert und optisch aufbereitet.

### **2.2.1.16 Quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)**

Mittels einer qRT-PCR kann die Anzahl an RNA/cDNA Molekülen in Ausgangsproben quantitativ bestimmt werden. Dabei nutzt man die interkalierende Eigenschaft des Cyanin-Floureszenzfarbstoffs SYBR Green I (Roche, Mannheim). Während der PCR-Reaktion kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der doppelsträngigen DNA (2.2.1.3). Dabei steigt die Fluoreszenzintensität proportional zur gebildeten Menge an DNA-Amplifikat an, da der SYBR Green Farbstoff in frisch amplifizierte DNA-Doppelstränge interkaliert. Während eines qRT-PCR Laufes wird der sogenannte Cp-Wert („crossing point“) berechnet. Dieser gibt Auskunft, ab welchem Zyklus die Fluoreszenz über eine festgelegte Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dabei gilt, je mehr RNA/cDNA (Matrize) im Ausgangsmaterial vorhanden war, umso geringer ist der erhaltene Cp-Wert, da die Fluoreszenz schon bei einem früheren Zyklus den Grenzwert überschreitet.

Da Primer häufig aneinander binden, also Dimere bilden, kann es zu falsch-positiven Messwerten kommen, da hier ebenfalls SYBR Green I interkaliert. Um diese zu erkennen und später ausschließen zu können, wurde stets an jeden qRT-PCR-Lauf ein Schmelzkurven-Lauf angeschlossen. Hierbei werden die qRT-PCR-Ansätze langsam von 65°C auf 95°C erhitzt und gleichzeitig kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Die Primerdimere schmelzen, aufgrund ihrer kürzeren Sequenz, bei einer niedrigeren Temperatur auf als die längeren Amplifikate. Dadurch kommt es bei einer niedrigeren Temperatur (verglichen zu den Amplifikaten) zu einem Abfall der Fluoreszenz. Um festzustellen bei welcher Temperatur die Primerdimere aufschmelzen, oder ob überhaupt welche gebildet werden, wurde stets eine Wasserkontrolle mitgeführt, die keine RNA/cDNA-Matrize enthielt. Zudem dient die Wasserkontrolle auch dazu Verunreinigungen durch eingeschleppte DNA zu ermitteln.

In allen qRT-PCR Experimenten wurde das LightCycler 480 II (LC480) Gerät und der LC480 DNA Master SYBR Green I Kit (beides Roche, Mannheim) verwendet.

## MATERIAL UND METHODEN

### Ansatz qRT-PCR:

5'-Primer (10 µM)	0,5 µl
3'-Primer (10µM)	0,5 µl
Roche Master Mix	5 µl
DEPC-behandeltes H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	3 µl
cDNA Matrize (min. 60ng/µl)	1 µl
	<b>Σ10 µl</b>

### Standard qRT-PCR Programm:

	Temperatur	Zeit	Heizrate („Ramp Rate“)	Anzahl Zyklen	Aquisitionsmodus
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	4,4°C	1x	keiner
Denaturierung	95°C	10 s	4,4°C		keiner
Annealing	variabel	5 s	2,2°C		keiner
Elongation	72°C	10 s	4,4°C	50x	single
Schmelzkurve	95°C	1 s	4,4°C		keiner
	65°C	15 s	2,2°C		keiner
	95°C		0,11°C	1x	kontinuierlich
Kühlung	40°C	30 s	2,2°C	∞	keiner

Jeder Ansatz wurde als Duplikat angesetzt um evtl. Pipettierfehler zu erkennen.

### 2.2.1.16.1 Relative qRT-PCR

In einer relativen qRT-PCR wird zur Standardisierung ein housekeeping Gen verwendet, das als in allen zu untersuchenden Proben als gleichmäßig transkribiert gilt. Hierfür wurde die RNA Polymerase II (RPII) gewählt (Radonic *et al.* 2004). Auf Grundlage des Cp-Wertes der RPII wurden die Cp-Werte der einzelnen HERV-Proben normalisiert ( $\Delta C_p$ ). Eine Berechnung der relativen Transkription bezogen auf die RPII Transkriptmenge erfolgte nach Livak und Schmittgen gemäß der Formel:

$$2^{-(\Delta C_p)} = 2^{-[(TB-RB)-(TU-RU)]} = 2^{RB} \times 2^{TU} / 2^{TB} \cdot 2^{-RU} = 2^{TU-TB} / 2^{RU-RB}$$

(TB= „target“ (HERV) behandelt, RB= Referenz (RPII) behandelt, TU= „target“ (HERV) unbehandelt, RU= Referenz (RPII) unbehandelt) (Livak *et al.* 2001).

### **2.2.1.16.2 Absolute qRT-PCR**

Bei einer absoluten qRT-PCR wird anhand eines geeigneten Standards eine Eichkurve erstellt, an der anschließend die absoluten Transkriptzahlen, die als Matrize in einem qRT-PCR-Ansatz enthalten waren, berechnet werden können. Hierzu mussten zuerst entsprechende Standardplasmide kloniert werden.

#### **2.2.1.16.2.1 Generierung von Standardplasmiden für eine absolute qRT-PCR**

Zunächst wurden gewünschte Zielsequenzen unter Verwendung von genomischer DNA in einer PCR mit dem Expand High Fidelity PCR-System (Roche, Mannheim) (2.2.1.3.3) nach Herstellerangaben, amplifiziert. Hierfür wurden die Primer verwendet, die auch später für die Quantifizierung in der qRT-PCR (vgl. 2.1.2.4.2) herangezogen wurden. Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.4) und die DNA aus dem Gel extrahiert (2.2.1.5). Die so aufgereinigten PCR-Produkte wurden mittels TA-Klonierung in den pGEM-T Vektor ligiert (2.2.1.8), in XL10 Gold ultrakompetenten Bakterienzellen transformiert (2.2.1.9) und eine Blau-Weiß-Selektion (2.2.1.10) durchgeführt. Nach der Kultivierung (2.2.1.11) und Plasmid-Isolierung (2.2.1.12) wurde ein Restriktionsverdau (2.2.1.13) mit SacI und SacII (New England Biolabs, Schwalbach) durchgeführt um die enthaltenen Insertgrößen zu überprüfen. Plasmide mit korrekter Insertgröße wurden zur Verifizierung zusätzlich sequenziert (2.2.1.14).

#### **2.2.1.16.2.2 Erstellen einer Eichkurve für eine absolute qRT-PCR**

Plasmide mit korrekter Sequenz wurden vor dem Erstellen der Eichkurve mit einem Restriktionsverdau (2.2.1.13) mit Sall (New England Biolabs, Schwalbach) linearisiert. Dies soll gewährleisten, dass sich für die Erstellung der Eichkurve, die Primer bei der qRT-PCR (2.2.1.16.2.1) optimal an ihre Zielsequenz auf dem Plasmid anlagern können. Die linearisierten Plasmide wurden wiederum gelelektrophoretisch (2.2.1.4) aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt (2.2.1.5). Anschließend wurde die Plasmidkonzentration photometrisch bestimmt (2.2.1.2) und eine 1:10 Verdünnungsreihe des Plasmides mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> angefertigt, die dann einem qRT-PCR Lauf (2.2.1.16) unterzogen wurde.

## MATERIAL UND METHODEN

Anhand folgender Formel wurden die Molekülzahlen pro  $\mu\text{l}$  berechnet:

$$\text{Molekülzahl} / \mu\text{l} = \left( \left( \frac{c_{(DNA-Standard)} [\text{g} / \mu\text{l}]}{(l_{(Vektor+Insert)} [\text{bp}] \cdot 660)} \right) \cdot 6,022 \cdot 10^{23} [\text{mol}^{-1}] \right)$$

C = Konzentration

L = Länge

Anschließend wurde eine Eichgerade erstellt. Hierfür wurde der Logarithmus der errechneten Molekülzahlen gegen die gemessenen Cp-Werte der Verdünnungsreihe aufgetragen. Danach wurde mit Hilfe von Excel (Microsoft Corp., USA) eine Trendgerade berechnet mit der man die Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA der zu testenden Proben errechnen kann. Dabei wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Transkriptzahl} / \mu\text{gRNA} = 10^{\left( \frac{Cp\text{Wert} - y\text{Achsenabschnitt}}{\text{Eichgeradensteigung}} \right)} \cdot c_{cDNA} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 2.2.1.17 Locusbestimmung

#### 2.2.1.17.1 Locusbestimmung mittels cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung

Um transkriptionell aktive HERV-K(HML-2) und (HML-6) Loci in malignem, gesundem Brustdrüsengewebe und Lymphknotenmetastasen zu identifizieren, wurde eine PCR mit HML-2/6-spezifischen Primermischungen mit cDNA als Matrize durchgeführt (2.2.1.3.3). Anschließend wurde das PCR-Produkt in den pGEM-T Vektor kloniert und mittels Sanger-Sequenzierung durch die Firma Seq-IT sequenziert.

#### 2.2.1.17.2 Locusbestimmung mittels „Amplikon Next Generation Sequenzierung (NGS)“ („Second Generation“ Sequenzierung)

Zusätzlich zur HERV-Locusbestimmung durch eine Sanger-Sequenzierung (2.2.1.17.1) wurde auch eine Amplikon-NGS, die eine sogenannte „Second Generation“ Sequenzierungsmethode ist, auf dem GS-FLX+ System (Roche 454) durchgeführt. Dabei beschränkte sich die selbst durchgeführte Arbeit auf die Amplikon-Generierung, da die für

die restlichen Schritte notwendigen Geräten nicht zur Verfügung standen. Alle weiteren Schritte wurden daher von der Firma GATC durchgeführt.

### **2.2.1.17.2.1 Amplikon-Generierung**

Für die Generierung der Amplikons wurden in einer PCR (2.2.1.3.2) HERV-Gruppen-spezifische Primer verwendet. Diese können unter 2.1.2.5 eingesehen werden.

Für jeden PCR-Ansatz wurden nur sehr schwach stringente Bedingungen gewählt, indem die Annealing-Temperatur niedriger als die Optimaltemperatur gesetzt wurde. Dadurch sollten auch Sequenzen amplifiziert werden, zu denen die Primer nicht 100% komplementär sind und somit die Anzahl der detektierbaren HERV-Loci erhöht werden.

#### **Folgende Annealing-Temperaturen wurden gewählt:**

- HERV-K(HML-2) = 57°C
- HERV-K(HML-6) = 45°C
- HERV-E(4-1) = 57°C
- HERV-W = 55°C
- ERV-9 = 55°C

Die PCR-Ansätze wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.4), die DNA extrahiert (2.2.1.5) und sowohl deren Reinheit als auch Konzentration photometrisch bestimmt (2.2.1.2). Abschließend wurden von allen Amplikons die gleichen DNA-Mengen gepooled, eine PCR-Aufreinigung mit dem Gel-Extraction und PCR clean up Kit nach Herstellerangaben durchgeführt (2.2.1.5) und die DNA mit 11 µl hochreinem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> eluiert. Dabei wurde berücksichtigt, dass von GATC eine Konzentration von ca. 200 ng/µl und ein Volumen von mindestens 10 µl, als auch ein hoher DNA-Reinheitsgrad (OD<sub>260/280</sub> von mindestens 1,8 (2.2.1.2)), für den finalen Amplikon-Pool vorgeschrieben wird. Von jedem Amplikon benötigte man mindestens 150 ng, da es bei der letzten Aufreinigung zu einem Verlust von bis zu ca. 50 % der Gesamt-DNA kommen kann.

Wurden diese 150 ng DNA eines Amplikons nicht erreicht, wurde zur Erhöhung der DNA-Menge eine 2. PCR, jedoch mit 10 µl cDNA als Template durchgeführt. In seltenen Fällen war die Amplikon-Ausbeute so gering, dass in der 2. PCR statt cDNA als Template 10 µl der Amplikon-DNA aus der 1. PCR eingesetzt wurde.

### **2.2.1.17.2.2 Amplikon-NGS mit dem Roche 454 GS FLX+ (Titanium Sequencing Kit XLR70) System durch die Firma GATC**

Detailliertere Informationen über den genauen Ablauf der einzelnen Teilschritte, sowie die dazu gehörigen Quellen, sind auf der GATC-Internetseite (<http://www.gatc-biotech.com/en/products/next-gen-services/targeted-re-sequencing/amplicons.html>) als auch auf der Roche 454 Sequencing Internetseite (<http://454.com/products/technology.asp>) zu finden.

Nach der Fertigstellung des Amplikon-Pools werden bei einer Amplikon-Sequenzierung vier Hauptschritte durchgeführt. Der erste Schritt ist die Generierung einer einzelsträngigen DNA-Matrizen-Bibliothek („Template-DNA-library“). Hierbei werden spezifische Adaptersequenzen an beide Enden jedes Amplikon-DNA-Fragmentes ligiert und die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen.

Als zweiter Schritt erfolgt eine Emulsions-basierte klonale Amplifikation der DNA-Bibliothek („emulsion-based clonal amplification“). Dabei bindet je ein einzelsträngiges DNA-Molekül über die Adaptersequenz an ein „capture bead“. Zusammen mit verschiedenen Amplifikations-Reagenzien wird dann eine Wasser-in-Öl Mixtur gebildet, in der eine Emulsions-PCR („emPCR“) stattfindet. Hierbei kommt es zur Amplifikation der Amplikon-DNA-Einzelstränge, wobei die neusynthetisierten klonalen Kopien ebenfalls an die capture beads binden. Anschließend werden PicoTiter-Platten mit den DNA-enthaltenden beads beladen, in denen der dritte Schritt, eine Sequenzierung-durch-Synthese („Sequencing-by-Synthesis) mit dem GS-FLX+ System (Roche 454) stattfindet.

Die PicoTiter-Platten werden mit DNA-Polymerase, mit zu den Adaptoren komplementären Primern und Enzym gekoppelten beads beladen und anschließend abwechselnd jeweils mehrere hundert Mal in gleicher Reihenfolge mit einer der vier DNA-Basen geflutet. Ist die Base, mit der gerade die Platte geflutet wird, komplementär zu einem an einem capture bead gekoppelten DNA-Einzelstrang, so wird damit der komplementäre Strang synthetisiert. Durch den Einbau einer Base wird Pyrophosphat freigesetzt, welches von einer an die Enzym-beads gekoppelten Sulfurylase zusammen mit Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) zu Adenosintriphosphat (ATP) umgesetzt wird. Das so freigesetzte ATP wiederum dient einer ebenfalls an die Enzym-beads gekoppelten Luziferase als Cofactor um Luziferin zu oxidieren. Dabei wird Energie in Form von Licht abgegeben, welches von einer CCD-Kamera („charge-coupled device“) detektiert wird. Dabei ist die Stärke des gemessenen Signals proportional zur Anzahl der eingebauten Basen.

Aus den so detektierten Lichtsignalen wird ein „Flowgramm“ für jedes Well der PicoTiter-Platte erstellt. Aus diesem wiederum gehen die DNA-Sequenzen hervor. Für die

Durchführung der Amplikon-Sequenzierung der Urothelproben wurde eine 16tel PicoTiter-Platte verwendet.

### **2.2.2 Bioinformatische Methoden**

#### **2.2.2.1 Datenprozessierung der Amplikon-Sequenzen**

Da nach einer Amplikon-Sequenzierung Tausende von Sequenz-Reads anfallen, wurde die Auswertung der Daten in Kooperation mit der Bioinformatikerin Kerstin Haase, Arbeitsgruppe Genome-orientierte Bioinformatik des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt unter der Leitung von Prof. Dr. Dimitrij Frishman, durchgeführt.

Da die Qualitätsanalyse, Sortierung und Rückkartierung („Mapping“) der Amplikon-Sequenzen („Reads“) Bestandteil der Promotionsarbeit von Kerstin Haase sind, wird im Folgenden nur kurz erklärt wie methodisch verfahren wurde.

#### **2.2.2.2 Qualitätsanalyse**

Jede von der Firma GATC generierte Sequenz ist bereits mit einem Qualitätswert („Quality-Score“) versehen. Dieser gibt an wie hoch die Fehlerrate des Sequenziervorgangs einer entsprechenden Sequenz ist. Ein Quality-Score von 20 bedeutet, dass von 100 Basen eine fehlerhaft ist. Dies wurde als Richtwert verwendet, sodass alle Reads mit einem Quality-Score unter 20 aussortiert wurden. Zudem wurden zu kurze Reads, oder Reads mit unbestimmten Basenpositionen, welche als N gekennzeichnet sind, für eine weitere Analyse ausgeschlossen.

#### **2.2.2.3 Sortieren der Amplikon-Sequenzen**

Anschließend wurden die Reads gemäß ihrer Tags und Primersequenzen, den entsprechenden HERV-Gruppen und Patientenproben zugeordnet. Reads, die aufgrund von Sequenzierfehlern nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden verworfen.

#### **2.2.2.4 „Mapping“ und Auswertung der Amplikon-Sequenzen**

Nach der Qualitätsanalyse und Sortierung wurde ein Sequenzvergleich der Reads, mit dem humanen Referenzgenom (Version hg19) als auch mit drei verschiedenen HERV-Datenbanken (HERVd, RetroTector und Retrosearch) durchgeführt. Dadurch konnten die Reads den entsprechenden HERV-Loci zugeordnet werden. Es lassen sich somit Aussagen darüber treffen, welche proviralen Loci der untersuchten HERV-Gruppen in welcher Patientenprobe transkriptionell aktiv sind. Zudem lassen sich nach einer statistischen Auswertung Rückschlüsse auf die prozentuale Beteiligung jedes einzelnen aktiven Loci an der transkriptionellen Gesamtaktivität einer jeden HERV-Gruppe ziehen. Dabei gilt, wie auch bei der Locusbestimmung durch die Sanger-Sequenzierung (2.2.1.17.1), dass die Anzahl der Reads, die einem Locus zugeordnet werden können, dessen Transkriptionsaktivität entspricht. Ein Vergleich der Transkriptionsaktivität verschiedener HERV-Gruppen untereinander ist jedoch nicht möglich, da bei der Sequenzierung für jede HERV-Gruppe die gleiche DNA-Menge eingesetzt wurde.

### 3. Zielsetzung der Arbeit

Die häufige Beobachtung einer erhöhten Transkription/Expression verschiedenster HERV-Gruppen im Tumorgewebe, verglichen mit gesundem Gewebe, legt nahe, dass HERVs eine wichtige Rolle bei der Ätiopathogenese von Krebserkrankungen spielen könnten. Allerdings ist bisher unklar, ob eine Dysregulation der HERV-Transkription/Expression eine direkte Ursache der Tumorerkrankungen ist, die Tumorentstehung begünstigt, oder nur eine Begleiterscheinung ist, die die allgemeine genetische Entartung maligner Zellen widerspiegelt. Auch wenn die Beteiligung von HERVs bei der Krebsentstehung noch nicht gänzlich geklärt ist, besitzen tumorspezifisch transkribierte oder translatierte HERV-Elemente das Potential als Biomarker oder als Antigen bei einer Antikörper-basierten Krebs-Immuntherapie Verwendung zu finden.

Deshalb sollte im Folgenden am Beispiel von Urothel- und Brustdrüsegewebe untersucht werden, ob Unterschiede in der Aktivität von HERV-Gruppen zwischen malignem und gesundem Gewebe existieren. Mittels HERV-spezifischen Microarray-Analysen sollten zunächst HERV-Gruppen mit unterschiedlicher transkriptioneller Aktivität in gesundem und malignem Gewebe ermittelt werden.

Bei HERV-Gruppen mit tumorspezifischer Aktivität sollte daraufhin überprüft werden, ob es zu Tumor-assoziierten Änderungen in der Identität, der Anzahl und dem Aktivitätsgrad transkribierter proviraler Elemente kommt. Hierfür sollten neben der bereits etablierten Locusbestimmung, bei der eine HERV-cDNA Bibliothek kloniert und sequenziert wird, auch „Next Generation“ Sequenzierungs (NGS)-Methoden etabliert und durchgeführt werden.

Durch die Einbeziehung von vorhandenen klinischen Tumorparametern, wie z.B. dem Progesteron-, Östrogenrezeptorstatus, Tumorklassifizierung, Grad der Metastasierung oder Menopausen-Status sollten eventuelle Zusammenhänge zwischen spezifischen Tumoreigenschaften und beobachteten Transkriptions-/Expressionsdaten festgestellt werden, die möglicherweise als prognostische Hinweise/Marker genutzt werden könnten.

Die damit gewonnenen Ergebnisse sollen dazu beitragen, Einblicke in die durch maligne Transformation verursachten Dysregulationen der HERV-Transkription/Expression zu erhalten. Gleichzeitig sollten so provirale HERV-Elemente identifiziert werden, die aufgrund einer Tumor-assoziierten, erhöhten Aktivität als potentielle Biomarker in der Diagnostik, oder als Antigen für eine Anti-Krebs-Immuntherapie infrage kommen können.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Urothelkarzinomstudie

#### 4.1.1 HERV Transkription in gesundem und malignem Urothelgewebe

Häufig kann bei Tumorerkrankungen eine tumorspezifisch erhöhte Aktivität von HERV-Gruppen oder einzelnen HERV-Elementen beobachtet werden (vgl. 1.6.3.2). Deshalb sollte zunächst überprüft werden, ob es im Zuge einer malignen Transformation von Urothelgewebe zu Änderungen der allgemeinen transkriptionellen Aktivität verschiedener HERV-Gruppen kommt. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob einzelne HERV-Loci verschiedener HERV-Gruppen in gesundem und malignem Tumorgewebe unterschiedlich transkriptionell aktiv sind.

Da bereits einige wenige Hinweise, die einen Zusammenhang zwischen aberranter HERV-Transkription und der Entstehung von Urothelkarzinom vermuten lassen in der Literatur beschrieben wurden, wurde für eine Analyse der HERV-Transkription Urothelgewebe ausgewählt (Gosenca *et al.* 2012).

##### 4.1.1.1 Erstellung von HERV-Transkriptionsprofilen von Urothelgewebe mittels Microarray-Analysen

Um generelle Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität von verschiedenen HERV-Klassen und Gruppen im Zuge einer malignen Transformation von Zellen zu detektieren, wurden HERV-spezifische Microarray-Analysen durchgeführt (Seifarth *et al.* 2003, Seifarth *et al.* 2005, Frank *et al.* 2008). Hierbei erfolgte eine semiquantitative Einschätzung der HERV-Transkriptionsaktivität von 54 Subgruppen aus den 21 wichtigsten HERV-Gruppen aller drei HERV-Klassen. Dazu wurden in einer Multiplex-PCR unter der Verwendung von (Cy3-) Fluorochrom-markierten Primermischungen, die an zwei hochkonservierte Sequenzmotive innerhalb der *pol*-Abschnitte von retroviralen RT-Genen binden, transkribierte HERV-Elemente amplifiziert (Shih *et al.* 1989, Seifarth *et al.* 1998). Die Sequenzabschnitte zwischen diesen Motiven weisen eine ausreichende Sequenzvariabilität (Sequenzidentität  $\leq$

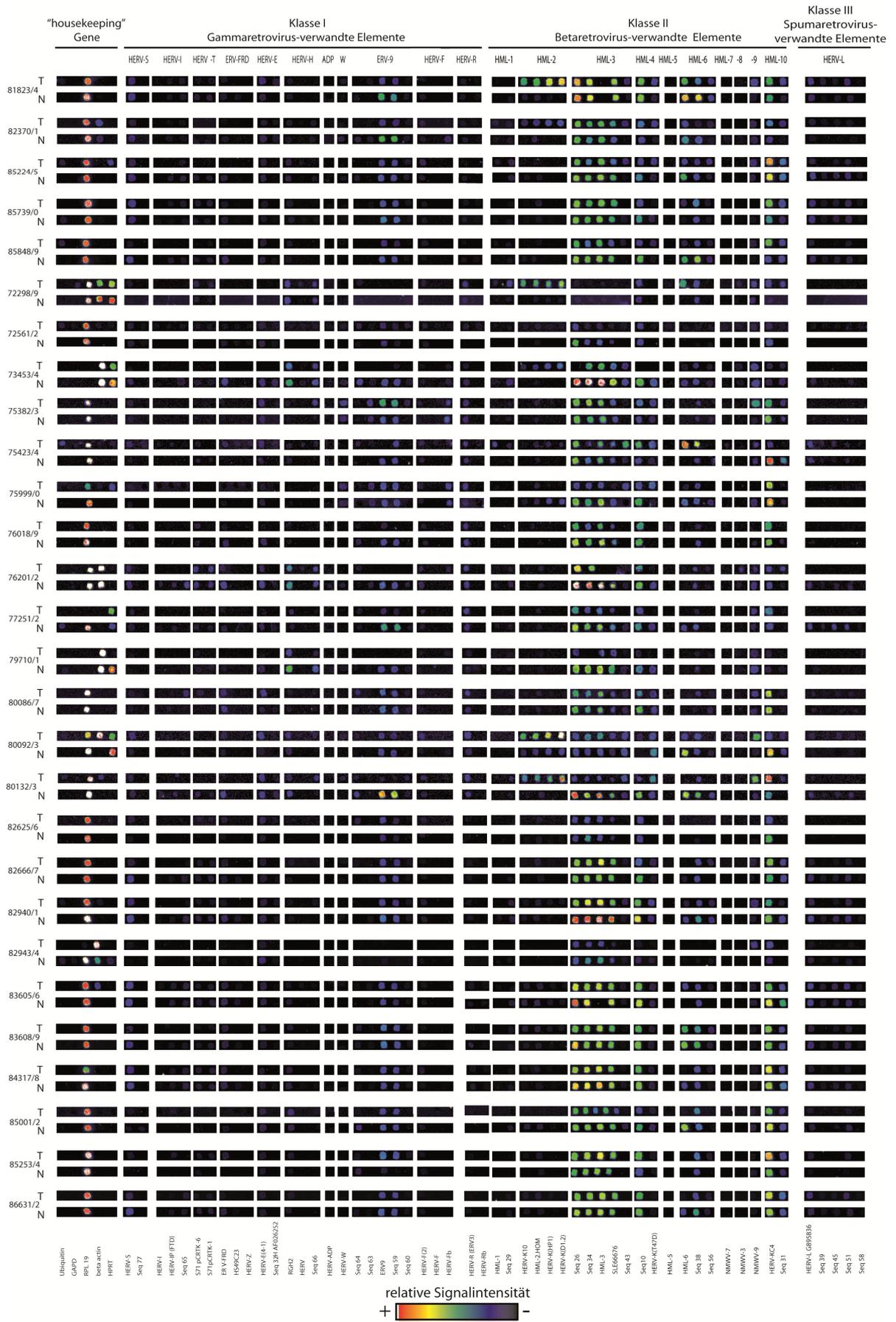
## ERGEBNISSE

80%) auf, sodass mittels spezifischen, auf Glasobjektträger gebunden Oligonukleotiden (capture probes) zwischen verschiedenen HERV-(Sub)Gruppen unterschieden werden kann (vgl. Abb. 2.1). Je nach Kopienzahl und Verwandtschaftsgrad innerhalb einer HERV-Gruppe, können die detektierbaren Subgruppen dabei Transkripte von bis zu mehreren 100 unterschiedlichen proviralen Loci pro capture probe umfassen (Sperber *et al.* 2007, Seifarth *et al.* 2009). Die Verwendung von fünf verschiedenen „housekeeping“ Genen diente dabei zusätzlich zur internen Überprüfung der Qualität der präparierten RNA aus den Gewebeproben und zur Normierung der Microarray-Signalintensitäten beim Auslesen der hybridisierten Objektträger. Das am konstantesten transkribierte housekeeping Gen war RPL19, welches bis auf wenige Ausnahmen in allen Gewebeproben als transkriptionell aktiv nachgewiesen werden konnte.

Durch den Vergleich des HERV-Transkriptionsprofils einer gesunden und einer malignen Gewebeprobe aus dem/derselben PatientenIn können HERV Gruppen identifiziert werden, die im Zuge einer malignen Transformation in ihrer Transkriptionsaktivität erhöht oder reduziert werden. Durch die Erstellung von HERV-Transkriptionsprofilen aus malignen und gesunden Gewebeproben-Paaren mehrerer PatientenInnen, sollte es möglich sein, HERV Gruppen zu detektieren deren Transkription generell bei der Entartung der Zellen des entsprechenden Gewebetyps dysreguliert vorliegt.

Es wurden daher HERV-Transkriptionsprofile von gesundem und malignem Urothelgewebe aus 28 PatientenInnen mit Urothelkarzinom erstellt und miteinander verglichen (Abb. 4.1.).

# ERGEBNISSE



## ERGEBNISSE

### **Abbildung 4.1 (auf der vorhergehenden Seite): HERV-Transkriptionsprofile von 28 UrothelkarzinompatientInnen.**

Insgesamt wurden 54 HERV-Subgruppen mit einem Retrovirus-spezifischen Microarray analysiert (Seifarth *et al.* 2003). Es wurde jeweils das Urothel-Tumorgewebe (T) mit dem normalen, gesunden Urothelgewebe (N) des/derselben PatientenIn verglichen. Des Weiteren ist eine Signalintensitäts-Skala aufgeführt, an Hand derer die relative transkriptionelle Aktivität der einzelnen HERV-Gruppen abgelesen werden kann.

Wie aus Abbildung 4.1 ersichtlich ist, zeigten die HERV-Transkriptionsprofile von Urothelgewebeproben verschiedener PatientenInnen zum Teil deutliche individuelle Unterschiede.

Um diese Unterschiede bezüglich der HERV-Transkription zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe aller im Microarray analysierten 21 HERV-(Sub)Gruppen und ihrer 54 Vertreter im Detail sichtbar zu machen, wurden alle Beobachtungen in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

## ERGEBNISSE

**Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abbildung 4.1**

ERV-Klasse	HERV-Gruppe	HERV-Subgruppe	% der Fälle mit im Tumor erhöhten Signalen	% der Fälle mit im Tumor erniedrigten Signalen	% der Fälle ohne Signalunterschied zwischen Tumor und gesundem Gewebe
Klasse-I	HERV-S	HERV-S	11	18	71
		Seq77	0	0	100
	HERV-I	HERV-I	0	4	96
		HERV-IP (FTD)	0	4	96
		Seq65	4	7	89
	HERV-T	S71pCRTK-6	11	11	78
		S71pCRTK-1	4	11	85
	ERV-FRD	ERV-FRD	7	29	64
		HS49C23	0	0	0
		HERV-Z	0	0	0
	HERV-E	HERV-E(4-1)	18	18	64
		Seq 32	4	4	92
	HERV-H	RGH2	11	11	78
		HERV	0	0	0
		Seq66	11	4	85
	HERV-ADP	HERV-ADP	0	0	100
	HERV-W	HERV-W	7	11	92
	ERV-9	Seq64	11	21	68
		Seq63	0	0	100
		ERV9	7	39	54
		Seq59	18	32	50
		Seq60	18	0	82
	HERV-F	HERV-F(2)	18	0	82
		HERV-F	0	0	100
		HERV-Fb	4	7	89
		HERV-R	HERV-R(ERV3)	4	4
		HERV-Rb	0	0	100
Klasse II (HERV-K)	HML-1	HML-1	11	0	89
		Seq29	11	11	78
	HML-2	HERVK-10	25	4	71
		HML-2.HOM	21	4	75
		HERV-K(HP1)	25	4	71
		HERV-K(D1.2)	25	4	71
	HML-3	Seq26	0	43	57
		Seq34	11	50	39
		HML-3	14	39	47
		SLE66676	4	46	48
		Seq43	25	0	75
	HML-4	Seq10	18	54	28
		HERV-K(T47D)	36	29	36
	HML-5	HML-5	0	0	100
	HML-6	HML-6	18	46	36
		Seq38	11	29	60
		Seq56	11	14	75
	HML-7	NMWV-7	0	0	100
	HML-8	NMWV-3	7	0	93
	HML-9	HMWV-9	29	7	64
HML-10	HERV-KC4	39	25	36	
	Seq31	25	29	46	
Klasse III	HERV-L	HERV-L	4	32	64
		Seq39	0	0	100
		Seq45	4	18	78
		Seq51	7	29	64
		Seq58	0	0	100

Grün: HERV Subgruppen mit verminderter Transkription im Tumorgewebe bei mehr als 25% der PatientenInnen.

Gelb: HERV Subgruppen mit erhöhter Transkription im Tumorgewebe bei mehr als 25% der PatientenInnen.

## ERGEBNISSE

Aus Tabelle 4.1 ist ersichtlich, dass nur die HERV-K(HML2)-Subgruppen HERV-K10, HERVK(HP1), HERVK(D1.2) sowie die HERV-K(HML-3) Subgruppe Seq43 eine Tumor-assoziiert erhöhte Transkription in etwa einem Viertel der UrothelkarzinompatientInnen aufweisen (Tab. 4.1, in Gelb markiert). Insgesamt 12 HERV-Subgruppen (ERV-FRD, Seq59, Seq26, Seq34, HML-3, SLE66676, Seq10, HML-6, Seq38, HERV-L, und Seq51) zeigten in über 25% der Fälle eine im Tumorgewebe schwächere Transkription, als im korrespondierenden gesunden Urothelgewebe. Dies deutet daraufhin, dass die HERV-Transkription im Urothelgewebe durch eine maligne Transformation tendenziell reduziert zu sein scheint.

Interessanterweise wurden für die HERV-Subgruppen HERV-K(T47D), HERV-KC4 und Seq31 bei je etwa einem Viertel der PatientInnen sowohl eine Tumor-assoziiert erhöhte als auch erniedrigte Transkription festgestellt.

Bemerkenswert ist, dass drei der vier auffälligsten Subgruppen (HERV-K10, HERVK(HP1) und HERVK(D1.2)), die in 25% der untersuchten PatientInnen eine Tumor-assoziiert erhöhte Transkription aufwiesen, zur HERV-K(HML-2) Gruppe gehören. HML-2 ist die HERV-Gruppe, die bisher am häufigsten mit Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht wurde (vgl. Einleitung). Des Weiteren weist die HML-2 Gruppe, aufgrund ihres evolutionär gesehen relativ jungen Alters nur sehr wenige Sequenzmutationen auf und umfasst viele Proviren mit offenen Leserahmen in mehreren retroviralen Genen. Da die Wahrscheinlichkeit einer Expression retroviraler Proteine somit erhöht ist, wurde bei weiteren Versuchen ein besonderes Hauptaugenmerk auf die HML-2 Gruppe gelegt.

### **4.1.1.2 Quantifizierung der HERV-K(HML-2) Transkription in Urothelgewebe mittels absoluter qRT-PCR**

Da die HERV-Microarray Analysen höchstens eine semiquantitative Einschätzung der Transkriptionsaktivitäten zulassen wurden die Transkripte der HERV-K(HML-2) Gruppe zusätzlich mittels absoluter qRT-PCR quantifiziert.

Im Gegensatz zur relativen qRT-PCR, bei der nur ein relativer Anstieg der Transkriptzahlen, bezogen auf ein housekeeping Gen, welches als in malignem und gesundem Gewebe als gleichmäßig transkribiert angesehen wird, ermittelt werden kann, können in einer absoluten qRT-PCR die tatsächlichen, absoluten Transkriptzahlen ermittelt werden. Dies hat den Vorteil, dass zum einen die Transkriptzahlen von verschiedenen HERV-Gruppen miteinander verglichen und somit in Relation zueinander gesetzt werden können, und zum anderen, dass man nicht auf housekeeping Gene angewiesen ist, deren Transkription ebenfalls durch eine maligne Transformation beeinflusst sein könnte.

## ERGEBNISSE

Für die Quantifizierung der absoluten HML-2 Transkriptzahlen wurden gesundes und malignes Urothelgewebe von 26 UrothelkarzinompatientInnen mittels einer absoluten qRT-PCR analysiert. Zwei PatientInnen mussten aufgrund von unzureichendem Gewebematerial und/oder zu geringer RNA-Ausbeute ausgeschlossen werden.

Für die absolute qRT-PCR wurden HML-2-spezifische Primer verwendet, die ca. 45 der bisher bekannten 91 HML-2-Loci erfassen können. Die HML-2 spezifischen Primer binden im *gag*-Bereich, da aufgrund der hohen Sequenzidentität des HML-2 und HML-3 *pol*-Abschnittes keine ausreichende Diskriminierung beider HML-Subgruppen möglich wäre (Contreras-Galindo 2006). Dadurch bedingt können sich die Ergebnisse aus den Microarray- und qRT-PCR-Analysen voneinander unterscheiden, da mit beiden Methoden zwangsläufig nicht dieselben transkriptionell aktiven HML-2 Proviren erfasst werden können.

**Abbildung 4.2 (auf der nächsten Seite): Quantifizierung der HERV-K(HML-2) Transkriptzahlen mittels absoluter qRT-PCR in gesundem und malignem Urothelgewebe.**

**A: HERV-K(HML-2) *gag*-Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA.**

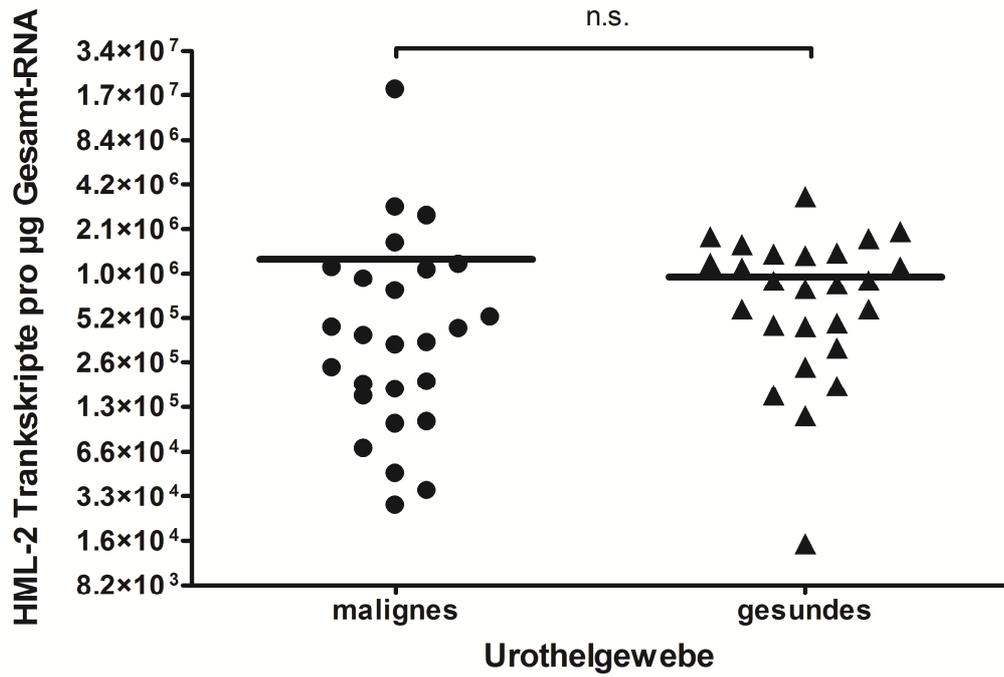
Dargestellt sind HML-2 Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA, aufgeteilt nach malignem und gesundem Urothelgewebe. Insgesamt wurden Gewebeprouben von 26 UrothelkarzinompatientInnen untersucht. Der statistische Unterschied zwischen den Transkriptzahlen ist nicht signifikant (= n.s.). Zur Berechnung wurde der paired student's t-test angewendet, damit jeweils die Zusammengehörigkeit einer gesunden und einer malignen Gewebeproube aus einem PatientInnen berücksichtigt werden konnte.

**B: Relative Darstellung der Unterschiede der HERV-K(HML-2) Transkription zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe von 26 PatientInnen.**

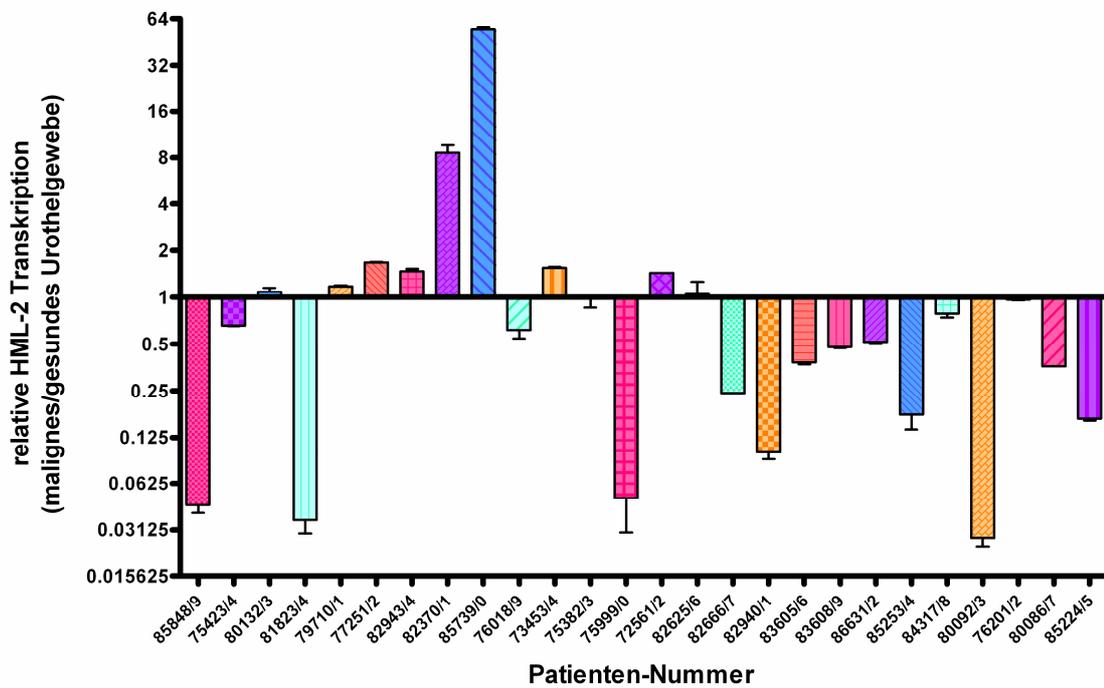
Dargestellt ist der Quotient der HML-2 Transkriptzahlen (aus A) von malignem und gesundem Urothelgewebe nach PatientInnen-Nummer aufgeschlüsselt. X-Achsen Werte über 1,5 wurden als eine Tumor-assoziiert erhöhte HML-2 Transkription, Werte unter 0,75 als Tumor-assoziiert erniedrigte HML-2 Transkription festgelegt. Werte zwischen 0,75 und 1,5 werden als nicht signifikanter, individueller Schwankungsbereich angesehen. Zusätzlich ist für jeden relativen Wert die Standardabweichung angegeben, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $y \geq 3$ ) berechnet wurde.

# ERGEBNISSE

A



B



Wie in Abbildung 4.2 A zu erkennen ist, weisen gesundes und malignes Urothelgewebe generell keine statistisch signifikanten Unterschiede der HML-2 Transkriptzahlen auf. Dennoch kann man auch hier deutlich individuelle Schwankungen der HML-2 Aktivität

## ERGEBNISSE

zwischen den einzelnen PatientenInnen erkennen, da sich z.B. innerhalb der malignen Urothelgewebeproben die Transkriptzahlen teilweise um den Faktor  $10^3$  unterschieden. Wie aus Abbildung 4.2 B ersichtlich, wiesen zehn von 26 (= 38%) PatientenInnen keine signifikanten HML-2 Transkriptionsunterschiede zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe auf, da ihre relative Transkriptzu- oder -abnahme im Tumor zwischen 0,75 und 1,5 liegt. In Proben von 14 PatientenInnen (= 54%) konnten zudem erniedrigte HML-2 Transkriptwerte im Tumorgewebe (relative Werte unter 0,75) im Vergleich zum gesunden Gewebe festgestellt werden. Nur in Proben von zwei (= 8%) PatientenInnen (82370/1 und 85739/0) konnte eine deutlich erhöhte, Tumor-assoziierte HML-2 Transkription (relative Werte über 1,5) nachgewiesen werden.

Die Daten aus den absoluten HML-2 qRT-PCR Analysen deuten daher auf einen generellen Trend zur Reduktion der gesamten HML-2 Transkriptzahlen im Tumorgewebe hin. Zusätzlich fällt auf, dass die HML-2 Ergebnisse aus den Microarray-Analysen und der qRT-PCR nur in ca. 40% der Fälle übereinstimmen, was sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die mit beiden Methoden unterschiedliche retrovirale Genomabschnitte detektiert werden. So liegen die Erkennungssequenzen der capture probes der Microarray-Analysen stets im *pol*-Bereich retroviraler Elemente während die Primer der absoluten qRT-PCR im *gag*-Bereich der HML-2 Elemente lokalisiert sind.

Eine Aussage über die transkriptionelle Aktivität einzelner proviraler HML-2 Loci lässt sich mittels HERV-spezifischen Microarray- und qRT-PCR-Analysen nicht treffen, da mit diesen Methoden stets mehrere HML-2 Loci gleichzeitig erfasst werden. So können durchaus tumorspezifische Änderungen der Transkriptionsrate einzelner HML-2 Loci vorliegen, obwohl generell keine signifikanten Unterschiede der HML-2 Gesamttranskription zwischen gesundem und malignem Gewebe beobachtet werden.

Um Dysregulationen auf Locus-Ebene zu detektieren wurde mithilfe der Firma GATC eine Amplikon-Sequenzierung mit dem GS FLX+ System (Roche 454) durchgeführt, welches eine Methode der sogenannten „Next Generation“ Sequenzierung (NGS) darstellt.

### **4.1.2 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-Loci in Urothelgewebe mittels „Next Generation“ Sequenzierung (NGS)**

Jede HERV-Gruppe besteht aus mehreren verschiedenen proviralen HERV-Loci, die über das ganze Genom verteilt vorliegen können. So umfasst zum Beispiel die HERV-K(HML-2) Gruppe mindestens 91 Proviren (Subramanian *et al.* 2011). Um Unterschiede in der Transkription einzelner proviraler HERV-Loci verschiedener HERV-Gruppen zu untersuchen,

## ERGEBNISSE

wurde eine Amplikon-Sequenzierung durchgeführt. Hierfür wurden in einer PCR, ausgehend von der cDNA verschiedener Patienten, möglichst viele HERV-Transkripte einer Gruppe amplifiziert (die sog. Amplikons; Schmitt *et al.* 2013, Dissertation: Schmitt 2014). Für die Erstellung der Amplikons wurden HERV-Gruppen-spezifische Primer verwendet, mit denen die Amplifikation einer Vielzahl der bekannten Proviren einer HERV-Gruppe möglich ist. Demnach bestehen die so generierten Amplikons aus Sequenzen der transkribierten Loci einer HERV-Gruppe.

Um mit einer Sequenzierung mehrere Patienten/Gewebeproben gleichzeitig untersuchen zu können, mussten alle Amplikons der verschiedenen Patienten/Proben in gleichen Mengen miteinander gemischt werden. Um eine genaue Zuordnung der Sequenzen zu der jeweiligen Patientenprobe zu ermöglichen, wurden die für die Generierung der Amplikons verwendeten Primer mit je einem Proben-spezifischen „Tag“, bestehend aus vier nt, versehen. Bei der Sequenzierung können bis zu mehrere 10.000 Sequenzen, sogenannte „Reads“, generiert werden.

Die bioinformatische Analyse der Sequenzen wurde in Zusammenarbeit mit Kerstin Haase, Arbeitsgruppe Genom-orientierte Bioinformatik des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt unter der Leitung von Prof. Dr. Dimitrij Frishman, durchgeführt. Durch den Vergleich der Sequenzen mit dem humanen Referenzgenom können die ursprünglichen HERV-Loci, von denen die Reads stammen, identifiziert werden. Durch die Analyse einer größeren Readzahl kann nicht nur die Identität der einzelnen, transkriptionell aktiven Loci einer HERV-Gruppe bestimmt werden, es kann auch eine statistische Aussage über die Beteiligung des jeweiligen Locus an der Gesamttranskription der entsprechenden HERV-Gruppe getroffen werden. Dabei spiegelt der prozentuale Anteil aller Reads einer HERV-Gruppe (= die relative cDNA-Klonierungsfrequenz), die einem Locus zugeordnet werden kann, auch den prozentualen Anteil an der Gesamttranskription der entsprechenden Gruppe wieder. Je mehr Reads einem Locus einer HERV-Gruppe zugeordnet werden können, desto stärker wird dieser auch transkribiert.

Für die Amplikon-Sequenzierung von malignem und gesundem Urothelgewebe wurden entsprechend der Microarray bzw. qRT-PCR Daten die Patienten 81823/4 (P1), 82370/1 (P2), 73453/4 (P3), 80092/3 (P4) und 80132/3 (P5) ausgewählt. Von diesen fünf Patienten wurden mit der Amplikon-NGS jeweils die transkriptionell aktiven Loci der HERV-(Sub)Gruppen ERV-9, HERV-E(4-1), HERV-W, HERV-K(HML-6) und HERV-K(HML-2) untersucht.

ERV-9 wurde aufgrund der in den Microarray-Analysen beobachteten erhöhten Transkription in ca. 30% der Urotheltumorproben ausgewählt (vgl. Tab. 4.1). HERV-E(4-1) wurde in die Untersuchung mit einbezogen, da bereits von Gosenca *et al.* ein, von einem HERV-E(4-1)

## ERGEBNISSE

Locus kodiertes, antisense Transkript beschrieben worden war, das in Urothelgewebe möglicherweise eine tumorfördernde Eigenschaft besitzt (Gosenca *et al.* 2012). HERV-W wurde mit einbezogen, da Maliniemi *et al.* bereits Hinweise für eine Tumor-assoziierte Transkription einzelner HERV-W Loci zeigen konnten (Maliniemi *et al.* 2013). Die HERV-K(HML-6) Gruppe wurde ausgewählt, da es bereits erste Hinweise auf eine Tumor-assoziiert erhöhte Transkription gibt (Yin *et al.* 1999, Frank *et al.* 2008). HERV-K(HML-2) wurde sowohl entsprechend der Daten aus den Microarray- bzw. qRT-PCR-Analysen als auch wegen der, in der Literatur häufig erwähnten Tumor-Assoziation gewählt (vgl. Abb. 4.1 bzw. Tab. 4.1 und 1.4.4.1).

Für die Generierung des fertigen Amplikonpools, bestehend aus den Amplikons der genannten fünf HERV-(Sub)Gruppen der fünf Patienten, mussten beim Primerdesign (durchgeführt von Katja Schmitt, Fachrichtung Humangenetik, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes) folgende Kompromisse eingegangen werden. So wurden für die HML-2, HML-6, HERV-E(4-1) und ERV-9 Gruppe *gag*-spezifische Primer verwendet, für die HERV-W Gruppe jedoch *env*-spezifische Primer, da in einem Großteil der bekannten HERV-W Loci das *gag*-Gen ganz oder teilweise deletiert ist (Schmitt *et al.* 2013). Die Primer wurden so gewählt, dass möglichst viele provirale Loci einer Gruppe amplifiziert werden konnten. Jedoch durften sich die Größen der Amplikons um nicht mehr als 150bp voneinander unterscheiden, da es sonst zur bevorzugten Sequenzierung von kürzeren Fragmenten kommen kann. Zusätzlich bestand bei der HML-2 Gruppe kein sonderlich großer Spielraum bei der Auswahl der Primer, da die Mindestgröße des HML-2 Amplikons ca. 640bp beträgt. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der HERV-K(HML-2) Proviren würden kürzere Amplikons keine zweifelsfreie Unterscheidung einzelner proviraler Loci ermöglichen. Da bei einer Amplikon-NGS mit dem GS FLX+ (Roche) System eine Readlänge von bis zu 700bp erreicht werden kann, wurden die Primer der anderen HERV-Gruppen so gewählt, dass kürzere Amplikons als das HML-2 Amplikon entstehen, die jedoch nicht mehr als 150bp vom HML-2 Amplikon abweichen. Dementsprechend betragen die Längen der HERV-E(4-1), HML-6, ERV-9 und HERV-W Amplikons je um die 520bp und die des HML-2 Amplikons 640bp. Mit den HML-2 Primer können ca. 53 der 91, mit den ERV-9 Primer ca. 138 von 195, mit den HML-6 Primer ca. 34 von 59 und mit den HERV-E(4-1) Primer ca. 61 der 126 jeweils bekannten HERV-Loci amplifiziert werden. Die Primer für die HERV-W Gruppe ermöglichen leider nur die Amplifikation von 26 der ca. 177 bekannten Loci. Dies ist den Kompromissen, entsprechend der Wahl der Amplikonlängen bzw. der Lokalisierung des Amplikons, die bei der Wahl der Primer eingegangen werden mussten, geschuldet.

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC, die bioinformatische Auswertung der Reads aus der Amplikon-NGS wurde von Kerstin Haase durchgeführt (vgl. 2.2.2).

## ERGEBNISSE

Insgesamt wurden 14987 Reads generiert, von denen nach der Qualitätsfilterung 9463 eindeutig den entsprechenden Patientenproben und HERV-Loci zugeordnet werden konnten. 4067 Reads stammten dabei von gesunden und 5396 von malignen Urothelgewebeproben. Die Verteilung der Reads auf die einzelnen HERV-Gruppen und entsprechenden Patientenproben ist in Tabelle 4.2 gezeigt. Die Zahlen in Klammern (Gesamt) geben an wie viele Reads insgesamt von einer Probe generiert wurden. Die Zahl darüber (Gemapped) hingegen gibt an wie viele der generierten Reads für die jeweilige Gruppe tatsächlich eindeutig einem HERV-Locus zugeordnet werden konnten. Im Schnitt konnten ca. 63% aller aus der Amplikon-NGS erhaltenen Reads eindeutig einem spezifischen HERV-Locus zugeordnet werden.

**Tabelle 4.2 Anzahl der Reads pro HERV-Gruppe aus der Amplikon-NGS**

	81823/4 (P1)		82370/1 (P2)		73453/4 (P3)		80092/3 (P4)		80132/3 (P5)	
	Gesundes Gewebe	Tumor	Gesundes Gewebe	Tumor	Gesundes Gewebe	Tumor	Gesundes Gewebe	Tumor	Gesundes Gewebe	Tumor
ERV-9	166	199	235	151	189	175	113	124	209	400
E(4-1)	11	22	14	7	17	22	9	3	21	51
HERV-W	209	347	173	158	262	204	165	89	38	279
HML-2	502	764	618	248	68	424	210	158	84	307
HML-6	137	296	163	144	114	175	79	133	97	258
HERV-H	23	14	9	21	15	9	0	0	7	44
HERV-R	15	16	10	10	16	10	5	2	55	126
HERV-L	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
HML-9	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Prima-41	1	0	1	3	0	0	0	0	1	2
IP10FH	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Gemapped (Gesamt)	1067 (1529)	1659 (2306)	1224 (1727)	742 (1175)	682 (1035)	1019 (1422)	581 (889)	509 (722)	513 (778)	1467 (2247)

Grün: Mit spezifischen Primern amplifizierte HERV-Gruppen.

Von den HERV-Gruppen ERV-9, HERV-W, HML-2 und HML-6 wurden insgesamt am meisten Reads generiert (Tab. 4.2). Interessanterweise wurden zusätzlich zu den oben genannten fünf HERV-Gruppen (Tab. 4.2 in Grün) die untersucht werden sollten, auch noch Reads der Gruppen HERV-H, HERV-R, HERV-L, HERV-K(HML-9), Prima41 und HERV-IP10FH generiert. Im Vergleich zu den zu untersuchenden Gruppen ist die Anzahl der generierten Reads für diese Gruppen jedoch nur sehr gering. Einzig von der HERV-R Gruppe konnten aus Material des Patient 80132/3 (P5) mit 55 Reads für gesundes und 126 Reads für malignes Urothelgewebe vergleichsweise hohe Readzahlen generiert werden. Um möglichst viele HERV-Loci einer HERV-Gruppe amplifizieren zu können, wurden während der Amplikon-PCR niedrigere Annealing Temperaturen verwendet, als optimal für die jeweiligen Primer berechnet. Hierdurch konnte es zur Amplifikation der Mitglieder anderer HERV-Gruppen kommen, wenn diese ähnliche Sequenzen im Bereich der Primer-Bindung aufweisen.

Für die Gruppe HERV-E(4-1) konnten kaum Reads generiert werden. Möglicherweise kam es hier zu technischen Problemen während der Sequenzierung. Die Verteilung der Reads

## ERGEBNISSE

auf die einzelnen Gewebeproben war zudem nicht immer gleichmäßig, obwohl stets gleiche Amplikonmengen für die Sequenzierung verwendet wurden. So konnten z.B. bei Patient 80132/3 (P5) zwar 279 HERV-W Reads dem malignen Urothelgewebe, jedoch nur 38 HERV-W Reads dem gesunden Urothelgewebe zugeordnet werden.

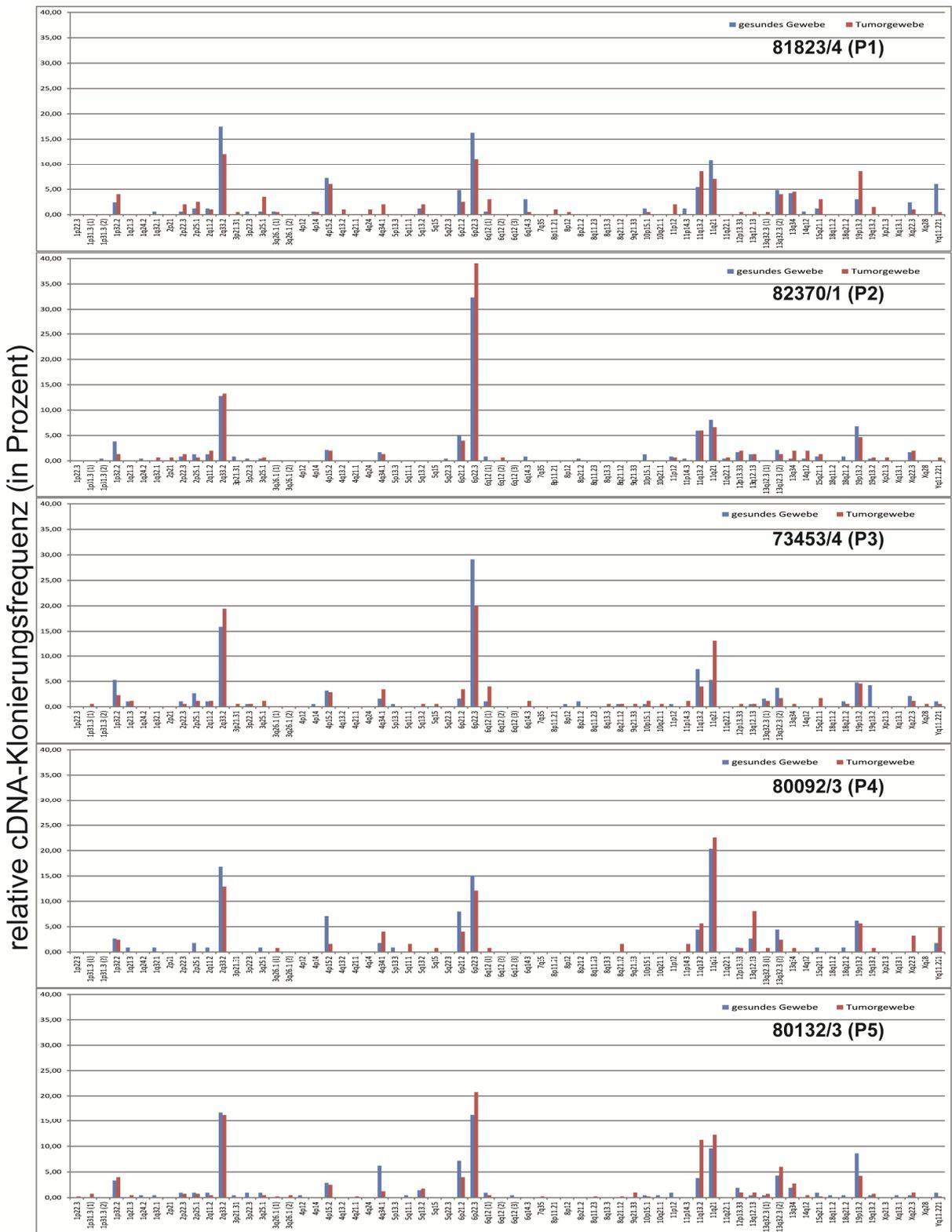
Aufgrund der geringen Anzahl an Reads für die HERV-E(4-1), HERV-H, HERV-R, HERV-L, HERV-K(HML-9), Prima41 und HERV-IP10FH (Sub-)Gruppen, wurde auf eine weitere Auswertung dieser Sequenzen verzichtet.

Für die ERV-9, HERV-W, HML-6 und HML-2 Gruppen wurde jeweils eine ausreichende Anzahl an Reads mit adäquaten Readlängen generiert, die eine eindeutige Zuordnung ermöglichten.

### **4.1.2.1 Identifizierung transkriptionell aktiver ERV-9 Loci in Urothelgewebe**

Eine graphische Darstellung der mittels Amplikon-Sequenzierung detektierten, in malignem und gesundem Urothelgewebe transkriptionell aktiven ERV-9 Loci, kann in Abbildung 4.3 eingesehen werden.

# ERGEBNISSE



chromosomale Lokalisierung der identifizierten ERV-9 Loci

**Abbildung 4.3: Transkriptionell aktive ERV-9 Loci in Urothelgewebe.**

Die relative cDNA-Klonierungsfrequenz in Prozent ist für jeden aktiven ERV-9 Locus dargestellt. In Rot sind die Ergebnisse der malignen und in Blau die der gesunden Urothelgewebeproben aufgeführt.

## ERGEBNISSE

Wie in Abbildung 4.3 zu erkennen, zeigen alle fünf Patienten ein ähnliches Aktivitätsmuster der ERV-9 Loci. In Tabelle 4.3 sind die Werte dieser Abbildung ausführlicher dargestellt.

**Tabelle 4.3: Mittels Amplikon-NGS identifizierte, transkriptionell aktive ERV-9 Loci**

chromosomale Bande	Amplikon-Koordinaten		Anteil der Transkripte einzelner ERV-9 Loci an der ERV-9 Gesamtranskription (in %)									
	Start	Stop	P1H	P1C	P2H	P2C	P3H	P3C	P4H	P4C	P5H	P5C
1p22.3	87267516	87275316	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
1p31.3 (1)	63218929	63228333	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8
1p31.3 (2)	66880443	66890762	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>1p32.2</b>	<b>58632832</b>	<b>58641151</b>	<b>2,4</b>	<b>4,0</b>	<b>3,8</b>	<b>1,3</b>	<b>5,3</b>	<b>2,3</b>	<b>2,7</b>	<b>2,4</b>	<b>3,3</b>	<b>4,0</b>
1q21.3	154643044	154651789	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	1,1	0,9	0,0	0,0	0,5
1q24.2	169630866	169639877	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
1q32.1	199060243	199067183	0,6	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,9	0,0	0,5	0,0
2p21	47327335	47335597	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>2p22.3</b>	<b>33278588</b>	<b>33283059</b>	<b>0,6</b>	<b>2,0</b>	<b>0,9</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	<b>0,6</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>
2p25.1	9034777	9043376	1,2	2,5	1,3	0,7	2,6	1,1	1,8	0,0	1,0	0,8
2q11.2	98437573	98445919	1,2	1,0	1,3	2,0	1,1	1,1	0,9	0,0	1,0	0,5
<b>2q33.2</b>	<b>203361451</b>	<b>203369341</b>	<b>17,5</b>	<b>12,1</b>	<b>12,8</b>	<b>13,2</b>	<b>15,9</b>	<b>19,4</b>	<b>16,8</b>	<b>12,9</b>	<b>16,7</b>	<b>16,3</b>
3p21.31	44583974	44592255	0,0	0,5	0,9	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,5	0,0
<b>3p22.3</b>	<b>33488517</b>	<b>33494770</b>	<b>0,6</b>	<b>0,0</b>	<b>0,4</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,0</b>
<b>3q25.1</b>	<b>151381890</b>	<b>151388250</b>	<b>0,6</b>	<b>3,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,7</b>	<b>0,0</b>	<b>1,1</b>	<b>0,9</b>	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,5</b>
3q26.1 (1)	163519390	163525104	0,6	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,3
3q26.1 (2)	164531866	164537378	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5
4p12	45532299	45538850	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
4p14	35858193	35866552	0,6	0,5	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>4p15.2</b>	<b>25240055</b>	<b>25248794</b>	<b>7,2</b>	<b>6,0</b>	<b>2,1</b>	<b>2,0</b>	<b>3,2</b>	<b>2,9</b>	<b>7,1</b>	<b>1,6</b>	<b>2,9</b>	<b>2,5</b>
4q13.2	68141512	68147667	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4q21.1	76964922	76972381	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
4q24	102551997	102559593	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>4q34.1</b>	<b>173285647</b>	<b>173296811</b>	<b>0,0</b>	<b>2,0</b>	<b>1,7</b>	<b>1,3</b>	<b>1,6</b>	<b>3,4</b>	<b>1,8</b>	<b>4,0</b>	<b>6,2</b>	<b>1,3</b>
5p13.3	32548561	32560530	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0
5q11.1	49665091	49673818	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	0,5	0,0
5q13.2	72221145	72232162	1,2	2,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	1,4	1,8
5q15	96644592	96653851	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,8	0,0	0,0
5q22.3	114325225	114335804	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>6p21.2</b>	<b>38584305</b>	<b>38592261</b>	<b>4,8</b>	<b>2,5</b>	<b>5,1</b>	<b>4,0</b>	<b>1,6</b>	<b>3,4</b>	<b>8,0</b>	<b>4,0</b>	<b>7,2</b>	<b>4,0</b>
<b>6p22.3</b>	<b>16455961</b>	<b>16464847</b>	<b>16,3</b>	<b>11,1</b>	<b>32,3</b>	<b>39,1</b>	<b>29,1</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>12,1</b>	<b>16,3</b>	<b>20,8</b>
<b>6q12 (1)</b>	<b>64031223</b>	<b>64045749</b>	<b>0,6</b>	<b>3,0</b>	<b>0,9</b>	<b>0,0</b>	<b>1,1</b>	<b>4,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>	<b>0,5</b>
6q12 (2)	63787408	63796651	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6q12 (3)	64733900	64742685	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
6q14.3	87381417	87391269	3,0	0,5	0,9	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0
7q35	144114152	144121697	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
8p11.21	42415026	42423410	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8p12	29161589	29170086	0,0	0,5	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8p21.2	27349970	27355890	0,0	0,0	0,4	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8q11.23	54371997	54381514	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
8q13.3	73300084	73307813	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
8q21.12	79059929	79063797	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,6	0,0	1,6	0,0	0,3
9q21.33	88762111	88778465	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	1,0
<b>10p15.1</b>	<b>5096639</b>	<b>5102960</b>	<b>1,2</b>	<b>0,5</b>	<b>1,3</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>1,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>
10q21.1	59592125	59601965	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,5	0,0
11p12	42895286	42904471	1,2	2,0	0,9	0,7	0,5	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
11p14.3	25021598	25028687	1,2	0,0	0,4	0,0	0,0	1,1	0,0	1,6	0,0	0,0
<b>11q13.2</b>	<b>67386324</b>	<b>67394514</b>	<b>5,4</b>	<b>8,5</b>	<b>8,0</b>	<b>6,0</b>	<b>7,4</b>	<b>4,0</b>	<b>4,4</b>	<b>5,6</b>	<b>3,8</b>	<b>11,3</b>
11q21	93851410	93859004	10,8	7,0	8,1	6,6	5,3	13,1	20,4	22,6	9,6	12,3
11q22.1	101100835	101112537	0,0	0,0	0,4	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12p13.33	1819237	1825304	0,0	0,5	1,7	2,0	0,0	0,6	0,9	0,8	1,9	1,0
<b>13q12.13</b>	<b>27786128</b>	<b>27794955</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>1,3</b>	<b>1,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	<b>2,7</b>	<b>8,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>
13q32.3 (1)	100732258	100742473	0,0	0,5	0,0	0,0	1,6	1,1	0,0	0,8	0,5	0,8
<b>13q32.3 (2)</b>	<b>100934518</b>	<b>100938212</b>	<b>4,8</b>	<b>4,0</b>	<b>2,1</b>	<b>1,3</b>	<b>3,7</b>	<b>1,7</b>	<b>4,4</b>	<b>2,4</b>	<b>4,3</b>	<b>6,0</b>
13q34	111841561	111851460	4,2	4,5	0,4	2,0	0,0	0,6	0,0	0,8	1,9	2,8
14q12	32171196	32181419	0,6	0,0	0,4	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5
<b>15q21.1</b>	<b>45156237</b>	<b>45166558</b>	<b>1,2</b>	<b>3,0</b>	<b>0,9</b>	<b>1,3</b>	<b>0,0</b>	<b>1,7</b>	<b>0,9</b>	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,3</b>
18q11.2	23811639	23825764	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
18q21.2	48637529	48647345	0,0	0,0	0,9	0,0	1,1	0,6	0,9	0,0	0,5	0,0
<b>19p13.2</b>	<b>8440462</b>	<b>8451997</b>	<b>3,0</b>	<b>8,5</b>	<b>6,8</b>	<b>4,6</b>	<b>4,8</b>	<b>4,6</b>	<b>6,2</b>	<b>5,6</b>	<b>8,6</b>	<b>4,3</b>
19q13.2	39311977	39317659	0,0	1,5	0,4	0,7	4,2	0,0	0,0	0,8	0,5	0,8
Xp21.3	26059492	26065835	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Xq13.1	70714933	70721797	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
<b>Xq22.3</b>	<b>104127516</b>	<b>104141731</b>	<b>2,4</b>	<b>1,0</b>	<b>1,7</b>	<b>2,0</b>	<b>2,1</b>	<b>1,1</b>	<b>0,0</b>	<b>3,2</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>
Xq28	150719396	150731087	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Yq11.221</b>	<b>15999559</b>	<b>16009875</b>	<b>6,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>0,7</b>	<b>1,1</b>	<b>0,6</b>	<b>1,8</b>	<b>4,8</b>	<b>1,0</b>	<b>0,3</b>
			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P1 = 81823/4, P2 = 82370/1, P3 = 73453/4, P4 = 80092/3, P5 = 80132/3; C = kanzeröses Urothelgewebe, H = gesundes Urothelgewebe; Gelb: In Urothelgewebe ubiquitär transkribierte ERV-9 Loci.

Wie sowohl aus Abbildung 4.3 als auch aus Tabelle 4.3 ersichtlich, wurden im Gewebe der fünf untersuchten Urothelkarzinompatienten insgesamt 66 transkribierte ERV-9 Loci detektiert. Aufgrund der Vielzahl von transkriptionell aktiven Loci besitzt der Großteil der Loci nur sehr geringe Anteile an der Gesamt-ERV-9-Transkription. Dennoch konnte vor allem für die Loci 2q33.2, 6p22.3 und 11q21 sowohl im Tumor als auch im gesunden Urothelgewebe aller untersuchten Patienten eine sehr hohe transkriptionelle Aktivität nachgewiesen werden. Insgesamt konnten 21 der 66 identifizierten ERV-9 Loci in mindestens 4 von 5 gesunden

## ERGEBNISSE

Urothelgewebeproben (Tab. 4.3 in Gelb markiert) als transkriptionell aktiv nachgewiesen werden, weshalb diese in Urothelgewebe als ubiquitär transkribiert angesehen werden können. Transkripte dieser ubiquitär aktiven Loci waren bis auf wenige Ausnahmen auch in den malignen Urothelgewebeproben nachweisbar.

Es zeigten sich auch deutliche individuelle Unterschiede sowohl im Grad der Aktivität als auch in der Anzahl der als transkribiert nachgewiesenen ERV-9 Loci zwischen einzelnen Patienten. So lag z.B. der Anteil des Locus 6p22.3 an der Gesamttranskription der ERV-9 Gruppe sowohl im gesunden als auch im malignen Urothelgewebe von Patient 82370/1 (P2) bei über 30%, in Patient 81823/4 (P1) nur bei ca. 11-16%.

Die geringste Anzahl an transkriptionell aktiven ERV-9 Loci wurde im Gewebe von Patient 80092/3 (P4), mit 21 im gesunden und 23 im Tumorgewebe, nachgewiesen, während die höchste Anzahl an transkribierten Loci in Patient 80132/3 (P5), mit 37 Loci im gesunden und 36 im Tumorgewebe detektiert wurde. Dieser doch deutliche Unterschied ist mit Sicherheit auch auf die Anzahl der für die jeweilige Gewebeprobe generierten Reads zurückzuführen. Dementsprechend wurden für Patient 80092/3 (P4) mit nur je ca. 120 Reads am wenigsten und für Patient 80132/3 (P5) mit ca. 200 bzw. 400 Reads am meisten Reads in der Amplikon-NGS generiert. Je mehr Reads pro Probe generiert werden, umso mehr schwach transkribierte HERV-Loci sollten nachweisbar sein.

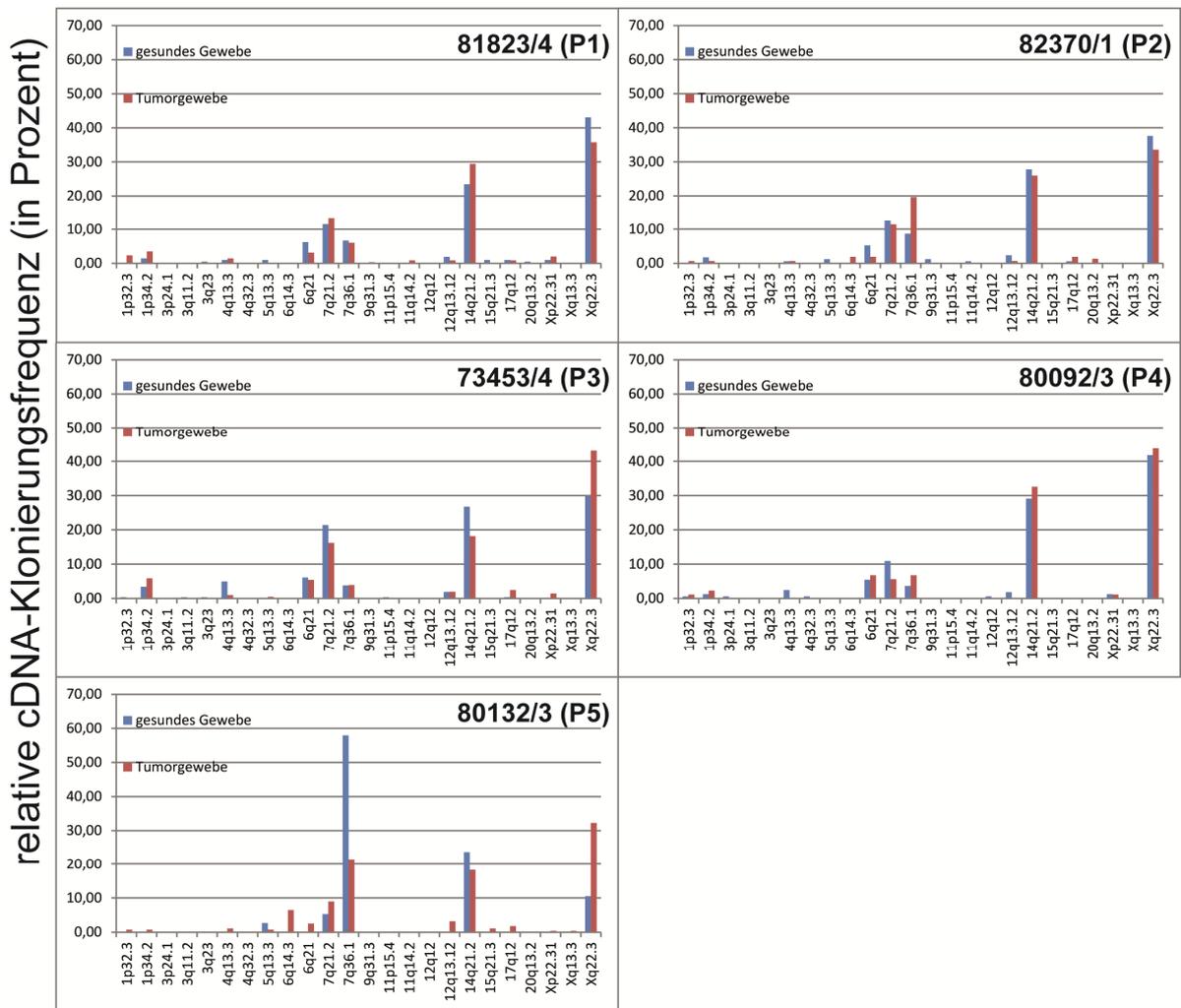
Einige ERV-9 Loci zeigten zudem in einigen Patienten eine Änderung der Transkriptionsrate zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe. Als Beispiel ist hier ebenfalls der in Urothelgewebe am stärksten transkribierte Locus 6p22.3 zu nennen. So nahm der Anteil dieses Locus an der Gesamt-ERV-9-Transkription in Patient 73453/4 (P3) im Tumorgewebe um über 50% ab und fiel von knapp 30% im gesunden auf ca. 20% im Tumor-Gewebe.

Generell wurden jedoch keine ERV-9 Loci identifiziert, die im Großteil der Patienten eine eindeutige Tumor-assoziierte Dysregulation der Transkription aufwiesen.

### **4.1.2.2 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-W Loci in Urothelgewebe**

In der Abbildung 4.4 sind die in gesundem und malignem Urothelgewebe transkriptionell aktiven HERV-W Loci abgebildet.

## ERGEBNISSE



### chromosomale Lokalisierung der identifizierten HERV-W Loci

#### Abbildung 4.4: Transkriptionell aktive HERV-W Loci in Urothelgewebe.

Die relative cDNA-Klonierungsfrequenz in Prozent ist für jeden aktiven HERV-W Locus dargestellt. In Rot sind die Ergebnisse der malignen und in blau die der gesunden Urothelgewebepben aufgeführt.

Die HERV-W Gruppe zeigte in allen fünf Patienten ein ähnliches provirales Aktivitätsmuster (vgl. Abb. 4.4). Eine detaillierte Darstellung der Daten aus Abbildung 4.4 ist in Tabelle 4.4 zu finden.

## ERGEBNISSE

**Tabelle 4.4: Mittels Amplikon-NGS identifizierte transkriptionell aktive HERV-W Loci**

chromosomale Bande	Amplikon-Koordinaten		Anteil der Transkripte einzelner HERV-W Loci an der HERV-W Gesamttranskription (in %)									
	Start	Stop	P1H	P1C	P2H	P2C	P3H	P3C	P4H	P4C	P5H	P5C
1p32.3	55372937	55384183	0,0	2,3	0,0	0,6	0,4	0,0	0,6	1,1	0,0	0,7
1p34.2	42410514	42419487	1,4	3,5	1,7	0,6	3,4	5,9	1,2	2,2	0,0	0,7
3p24.1	27042929	27049366	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
3q11.2	96385319	96394289	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3q23	141538632	141540356	0,5	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4q13.3	73791293	73798904	1,0	1,4	0,6	0,6	5,0	1,0	2,4	0,0	0,0	1,1
4q32.3	165575837	165578991	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
5q13.3	76203971	76210085	1,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	2,6	0,7
6q14.3	85421420	85430869	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,5
6q21	106676012	106683690	6,2	3,2	5,2	1,9	6,1	5,4	5,5	6,7	0,0	2,5
7q21.2	92097285	92107507	11,5	13,5	12,7	11,4	21,4	16,2	10,9	5,6	5,3	9,0
7q36.1	151725764	151735154	6,7	6,1	8,7	19,6	3,8	3,9	3,6	6,7	57,9	21,5
9q31.3	114098693	114100460	0,0	0,3	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11p15.4	9369353	9371165	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11q14.2	86565684	86562093	0,0	0,9	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12q12	38422071	38424983	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
12q13.12	51296259	51307151	1,9	0,9	2,3	0,6	1,9	2,0	1,8	0,0	0,0	3,2
14q21.2	45488688	45492898	23,4	29,4	27,7	25,9	26,7	18,1	29,1	32,6	23,7	18,3
15q21.3	55597048	55604632	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1
17q12	35687524	35692995	1,0	0,9	0,6	1,9	0,4	2,5	1,0	0,0	0,0	1,8
20q13.2	53965419	53970279	0,5	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Xp22.31	7617210	7622110	1,0	2,0	0,0	0,0	0,0	1,5	1,2	1,1	0,0	0,4
Xq13.3	75113201	75125851	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Xq22.3	106295361	106298102	43,1	35,7	37,6	33,5	29,8	43,1	41,8	43,8	10,5	32,3
			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P1 = 81823/4, P2 = 82370/1, P3 = 73453/4, P4 = 80092/3, P5 = 80132/3; C = kanzeröses Urothelgewebe, H = gesundes Urothelgewebe; Gelb: In Urothelgewebe ubiquitär transkribierte HERV-W Loci.

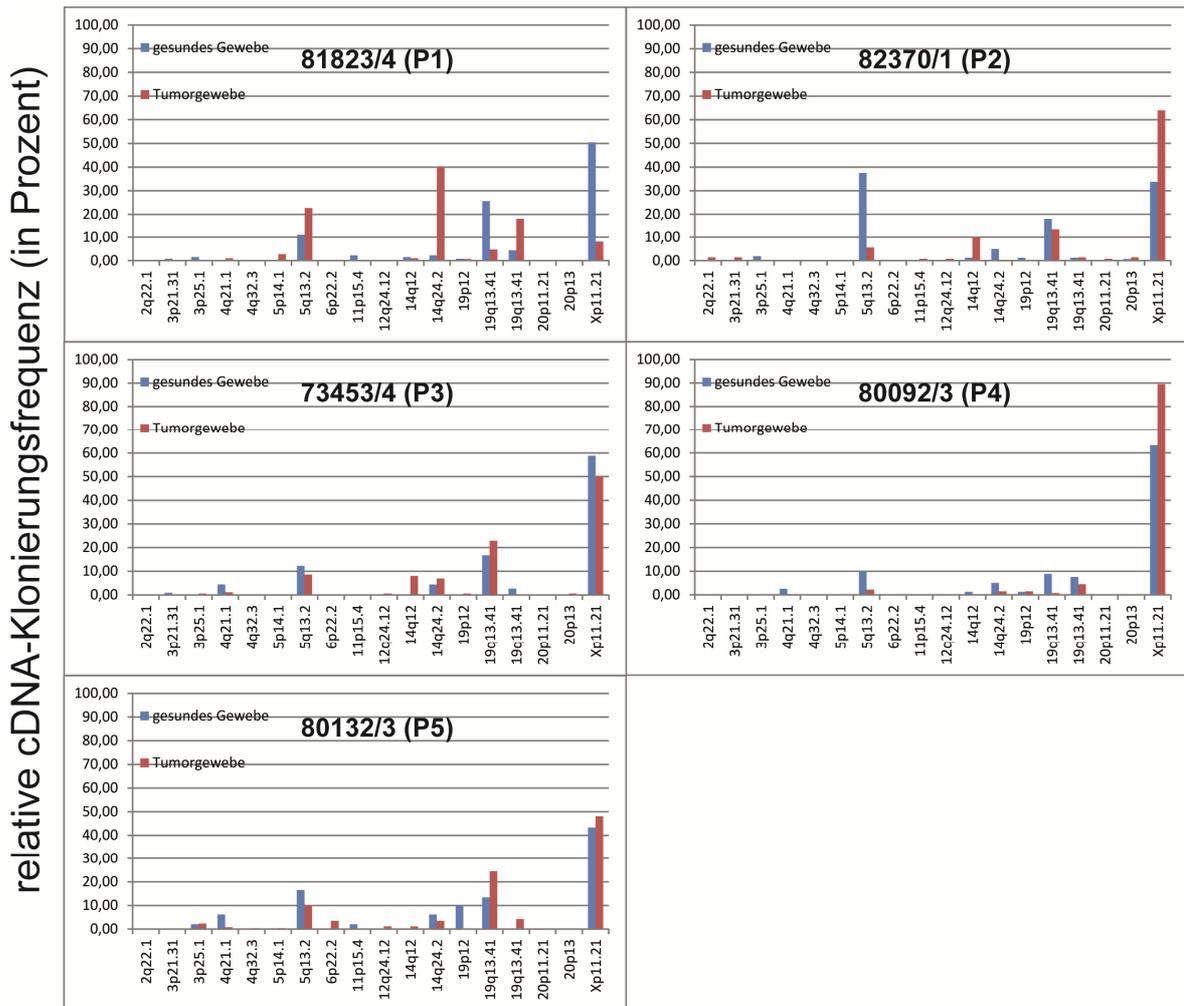
Insgesamt konnten 24 (der 26 mit den Primern detekierbaren) HERV-W Loci als transkriptionell aktiv nachgewiesen werden. Transkripte von acht dieser Loci konnten in mindestens vier der fünf gesunden Gewebeproben nachgewiesen werden, weshalb diese als in Urothelgewebe ubiquitär aktiv betrachtet werden (vgl. Tab. 4.4 in Gelb). Der am stärksten transkribierte Locus (Xq22.3) ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und nimmt teilweise bis zu 45% der Gesamttranskription der HERV-W Gruppe ein. Die HERV-W *env*-Reads, die dem HERV-W Locus 7.q21.2 (ERVWE1), der ebenfalls eine ubiquitäre Transkription in Urothelgewebe zeigte, zugeordnet werden konnte, liegen im Syncytin-1 Gen.

Die Anzahl der transkribierten HERV-W Loci lag bei allen untersuchten Gewebeproben relativ konstant bei ca. 12-13 Loci. Die einzigen Ausnahmen, bei denen deutlich weniger aktive HERV-W Loci detektiert wurden, bilden das Tumorgewebe von 80092/3 (P4) und das gesunde Urothelgewebe von (80132/3) P5, in denen nur acht bzw. fünf transkriptionell aktive HERV-Loci detektiert werden konnten (vgl. Tab. 4.4). Dies könnte wiederum auf die, im Vergleich zu den anderen Gewebeproben, relative geringe Anzahl an erhaltenen Reads (89 für P4 Tumor, bzw. 38 für P5 Gesundes Gewebe) zurückzuführen sein (vgl. Tab. 4.4). Nichtsdestotrotz reicht die geringe Anzahl an Reads in diesen Proben aus, um die HERV-W Loci mit der höchsten Transkriptionsrate zweifelsfrei zu identifizieren.

Auch für die HERV-W Gruppe konnten, ähnlich wie für die ERV-9 Gruppe, sowohl individuelle Transkriptionsunterschiede einzelner HERV-W Loci zwischen einzelnen Patienten, als auch zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe innerhalb eines Patienten beobachtet werden. Es konnte jedoch ebenfalls keine präferenzielle, tumorspezifische Dysregulation einzelner HERV-W Loci nachgewiesen werden.

### 4.1.2.3 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-K(HML-6) Loci in Urothelgewebe

Mithilfe der Amplikon-NGS-Analyse konnten für die HERV-K(HML-6) Gruppe insgesamt 18 transkribierte von 34 detektierbaren proviralen Loci identifiziert werden. Die Verteilung der in gesundem und kanzerösem Urothelgewebe nachgewiesenen HML-6 Loci der fünf untersuchten Patienten ist in Abbildung 4.5 grafisch dargestellt.



chromosomale Lokalisierung der identifizierten HERV-K(HML-6) Loci

**Abbildung 4.5: Transkriptionell aktive HERV-K(HML-6) Loci in Urothelgewebe.**

Die relative cDNA-Klonierungsfrequenz in Prozent ist für jeden aktiven HERV-K(HML-6) Locus dargestellt. In Rot sind die Ergebnisse der malignen und in Blau die der gesunden Urothelgewebeproben aufgeführt

Aus der Abbildung 4.5 und der Tabelle 4.5 ergibt sich, dass alle untersuchten Urothelkarzinompatienten ein ähnliches Muster transkriptionell aktiver HML-6 Loci aufweisen. Dabei zeigten die Loci 5q13.2, 14q24.2, 19p12, 19q13.41(1)/(2) und Xp11.21

## ERGEBNISSE

eine ubiquitäre Transkription in Urothelgewebe (vgl. Tab. 4.5 in Gelb), da in mindestens 80% der untersuchten gesunden Urothelgewebeproben entsprechende Transkripte nachgewiesen werden konnten. Der Locus Xp11.21 ist zudem der am stärksten transkribierte HML-6 Locus. Neben einigen individuellen Unterschieden in der Transkriptionsrate einzelner Loci, konnten bei einigen Patienten auch Änderungen in der Transkriptionsrate einiger HML-6 Loci zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe beobachtet werden. So wurde z.B. in Patient 81823/4 (P1) ein deutlicher Anstieg der Transkription der als ubiquitär transkribiert identifizierten Loci 5q13.2, 14q24.2 und 19q13.41 bei gleichzeitigem deutlichem Abfall der Transkriptionsrate des Xp11.21 Locus im Tumor, verglichen mit dem dazugehörigem gesunden Urothelgewebe, beobachtet werden. Ein HML-6 Locus der eine generelle tumorspezifische Transkription aufweist, konnte nicht identifiziert werden.

**Tabelle 4.5: Mittels Amplikon-NGS identifizierte transkriptionell aktive HML-6 Loci**

chromosomale Bande	Amplikon-Koordinaten		Anteil der Transkripte einzelner HML-6 Loci an der HML-6 Gesamttranskription (in %)									
	Start	Stop	P1H	P1C	P2H	P2C	P3H	P3C	P4H	P4C	P5H	P5C
2q22.1	136829409	136834784	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3p21.31	46087749	46095834	0,7	0,0	0,0	1,4	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3p25.1	14266711	14271683	1,5	0,3	1,8	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	2,1	2,3
4q21.1	76313421	76321358	0,0	1,0	0,0	0,0	4,4	1,1	2,5	0,0	6,2	0,8
4q32.3	165916842	165927444	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
5p14.1	24647626	24654517	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
5q13.2	70867879	70874148	10,9	22,6	37,4	5,6	12,3	8,6	10,1	2,3	16,5	10,1
6p22.2	26288250	26296495	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5
11p15.4	7921235	7927823	2,2	0,3	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0
12q24.12	112263979	112263659	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	1,2
14q12	28885639	28889754	1,5	1,0	1,2	9,7	0,0	8,0	1,3	0,0	0,0	1,2
14q24.2	70278067	70282766	2,2	40,2	4,9	0,0	4,4	6,9	5,1	1,5	6,2	3,5
19p12	21966551	21977609	0,7	0,7	1,2	0,0	0,0	0,6	1,3	1,5	10,3	0,0
19q13.41 (1)	52307623	52315204	25,5	4,7	17,8	13,2	16,7	22,9	8,9	0,8	13,4	24,4
19q13.41 (2)	52911334	52917986	4,4	17,9	1,2	1,4	2,6	0,0	7,6	4,5	0,0	4,3
20p11.21	25374847	25383857	0,0	0,3	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20p13	1377441	1382992	0,0	0,0	0,6	1,4	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Xp11.21	57128970	57136632	50,4	8,1	33,7	63,9	58,8	50,3	63,3	89,5	43,3	48,1
			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P1 = 81823/4, P2 = 82370/1, P3 = 73453/4, P4 = 80092/3, P5 = 80132/3; C = kanzeröses Urothelgewebe, H = gesundes Urothelgewebe; Gelb: In Urothelgewebe ubiquitär transkribierte HERV-K(HML-6) Loci.

### 4.1.2.4 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-K(HML-2) Loci in Urothelgewebe

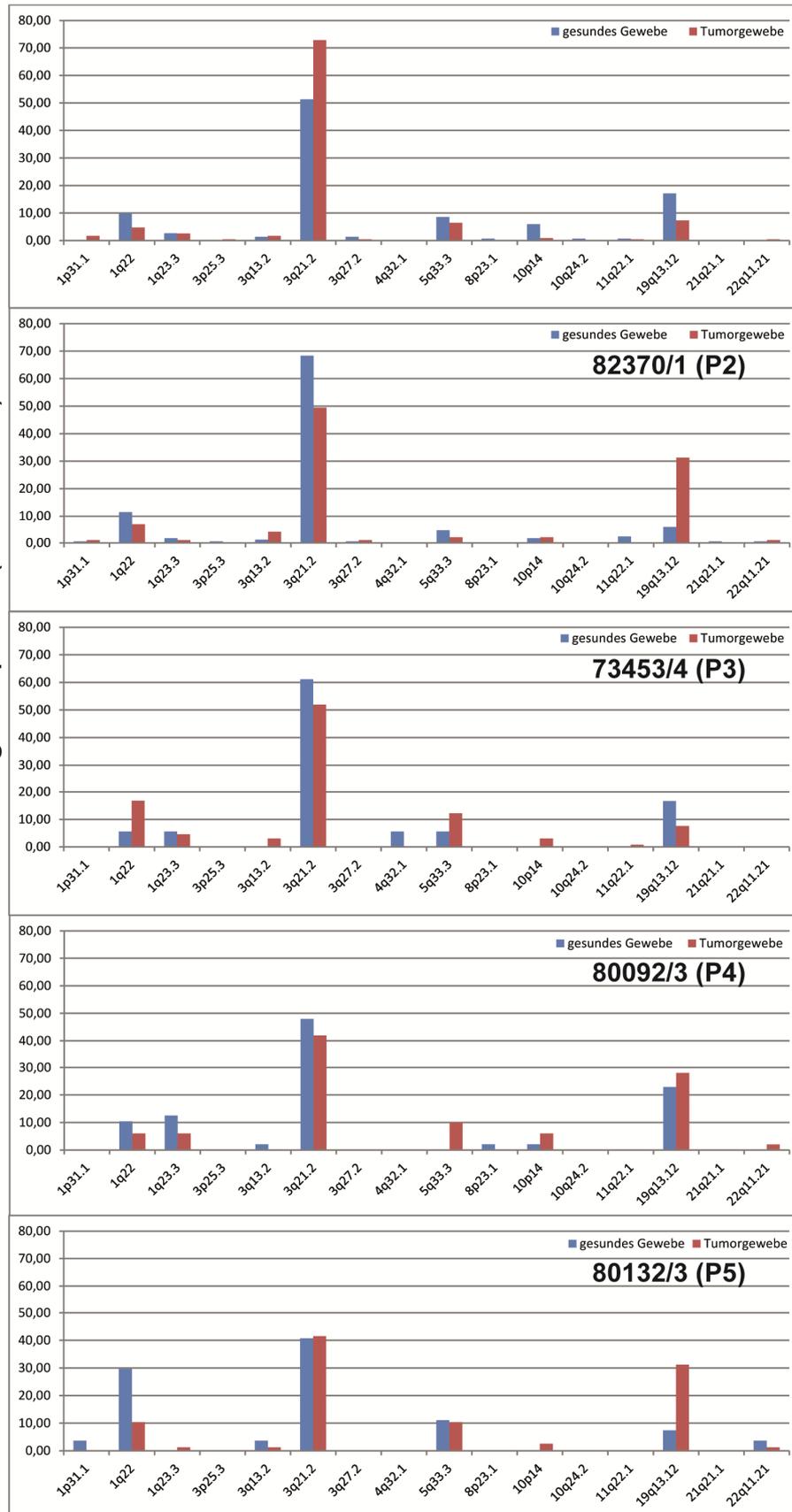
Für die Auswertung der HML-2 NGS-Daten wurden nur Reads verwendet, die eine Amplikongröße von mindestens 640bp aufwiesen. Kürzere Reads wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da aufgrund der relativ hohen Sequenzähnlichkeit einzelner HML-2 Loci, nur ab der erwähnten Amplikonlänge eine zuverlässige Rückkartierung auf den Ursprungslocus möglich ist.

**Abbildung 4.6 (auf der nächsten Seite): Transkriptionell aktive HERV-K(HML-2) Loci in Urothelgewebe.**

Die relative cDNA-Klonierungsfrequenz in Prozent ist für jeden aktiven HERV-K(HML-2) Locus dargestellt. In Rot sind die Ergebnisse der malignen und in Blau die der gesunden Urothelgewebeproben aufgeführt

# ERGEBNISSE

relative cDNA-Klonierungsfrequenz (in Prozent)



chromosomale Lokalisierung der identifizierten HERV-K(HML-2) Loci

## ERGEBNISSE

Insgesamt konnten 16 transkriptionell aktive HML-2 Loci identifiziert werden (vgl. Abb. 4.6 und Tab. 4.6). Dabei zeigten die Gewebeproben aller fünf untersuchten Patienten nahezu identische HML-2 Transkriptionsprofile. Der dabei am stärksten transkribiert Locus ist auf Chromosom 3q21.2 lokalisiert (vgl. Abb. 4.6).

Die Loci 1q22, 1q23.3, 3q13.2, 3q21.2, 5q33.3 und 19q13.12 konnten in gesundem Urothelgewebe von mindestens vier Patienten nachgewiesen werden (vgl. Tab. 4.6 in Gelb markiert). Tendenziell konnte auch für die HML-2 Gruppe keine präferenziellen, tumorspezifisch dysregulierten Loci mittels NGS-Amplikonanalyse identifiziert werden.

**Tabelle 4.6: Mittels Amplikon-NGS identifizierte transkriptionell aktive HML-2 Loci**

chromosomale Bande	Amplikon-Koordinaten		Anteil der Transkripte einzelner HML-2 Loci an der HML-2 Gesamttranskription (in %)									
	Start	Stop	P1H	P1C	P2H	P2C	P3H	P3C	P4H	P4C	P5H	P5C
1p31.1	75842771	75849144	0,0	1,7	0,6	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7	0,0
1q22	155596457	155605637	9,9	4,7	11,5	7,1	5,6	16,8	10,4	6,0	29,6	10,4
1q23.3	160660575	160669807	2,6	2,6	1,7	1,0	5,6	4,6	12,5	6,0	0,0	1,3
3p25.3	9883434	9896394	0,0	0,4	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3q13.2	112743124	112752283	1,3	1,7	1,1	4,0	0,0	3,1	2,1	0,0	3,7	1,3
3q21.2	125609302	125618417	51,3	72,8	68,4	49,5	61,1	51,9	47,9	42,0	40,7	41,6
3q27.2	185280336	185289516	1,3	0,4	0,6	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4q32.1	161580212	161582651	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5q33.3	156084717	156093897	8,6	6,5	4,6	2,0	5,6	12,2	0,0	10,0	11,1	10,4
8p23.1	12340969	12354099	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0
10p14	6866144	6875604	5,9	0,9	1,7	2,0	0,0	3,1	2,1	6,0	0,0	2,6
10q24.2	101579816	101587714	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11q22.1	101565794	101575260	0,7	0,4	2,3	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
19q13.12	37597549	37607067	17,1	7,3	5,7	31,3	16,7	7,6	22,9	28,0	7,4	31,2
21q21.1	19933322	19942324	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22q11.21	18926187	18935362	0,0	0,4	0,6	1,0	0,0	0,0	0,0	2,0	3,7	1,3
			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P1 = 81823/4, P2 = 82370/1, P3 = 73453/4, P4 = 80092/3, P5 = 80132/3; C = kanzeröses Urothelgewebe, H = gesundes Urothelgewebe; Gelb: In Urothelgewebe ubiquitär transkribierte HERV-K(HML-2) Loci.

### 4.1.3 Quantifizierung der HERV-Transkription in Urothelgewebe unter Einbeziehung der relativen Transkriptionsraten der mittels NGS als transkriptionell aktiv identifizierten HERV-Loci

Um eine detailliertere Analyse und Interpretation der Amplikon-NGS-Daten der ERV-9, HERV-W, HML-6 und HML-2 Gruppen zu ermöglichen, wurden mittels absoluten qRT-PCR Analysen die Gesamt-Transkriptzahlen der jeweiligen HERV-Gruppe in den untersuchten Gewebeproben bestimmt.

#### 4.1.3.1 Quantifizierung der ERV-9 Transkriptzahlen unter Einbindung transkriptionell aktiver ERV-9 Loci

Die Daten aus den absoluten qRT-PCR Analysen zeigen deutliche individuelle Unterschiede in der Gesamttranskription der ERV-9 Gruppe (vgl. Abb. 4.7). So wurden z.B. in gesundem

## ERGEBNISSE

Urothelgewebe von Patient 73453/4 (P3) fast  $1 \times 10^6$  ERV-9 Transkripte gemessen, wohingegen in Patient nur 82370/1 (P2) nur knapp  $1 \times 10^4$  ERV-9 Transkripte nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 4.7 A). Diese Daten verdeutlichen ein weiteres Mal, dass sich die Transkription von HERV-Elementen stark individuell unterscheidet. So kommt es bei den Patienten 81823/4 (P1) (relative ERV-9 Transkription bei 0,24), 73453/4 (P3) (relative ERV-9 Transkription bei 0,47) und 80092/3 (P4) (relative ERV-9 Transkription bei 0,02) zur deutlichen Abnahme der ERV-9 Transkriptzahlen im malignen Urothelgewebe im Vergleich zum gesunden Urothelgewebe (vgl. Abb. 4.7 B). Bei Patient 80132/3 (P5) (relative ERV-9 Transkription bei 1,74) kommt es hingegen zu einem leichten, bei Patient 82370/1 (P2) (relative ERV-9 Transkription bei 29,65) gar zu einem deutlichen Anstieg der ERV-9 Aktivität im Tumorgewebe, verglichen mit dem korrespondierenden gesunden Urothelgewebe (vgl. Abb. 4.7 B).

**Abbildung 4.7 (auf der nächsten Seite): Quantifizierung der ERV-9 Transkriptzahlen mittels absoluter qRT-PCR in Urothelgewebe.**

**A: Absolute ERV-9 Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA.**

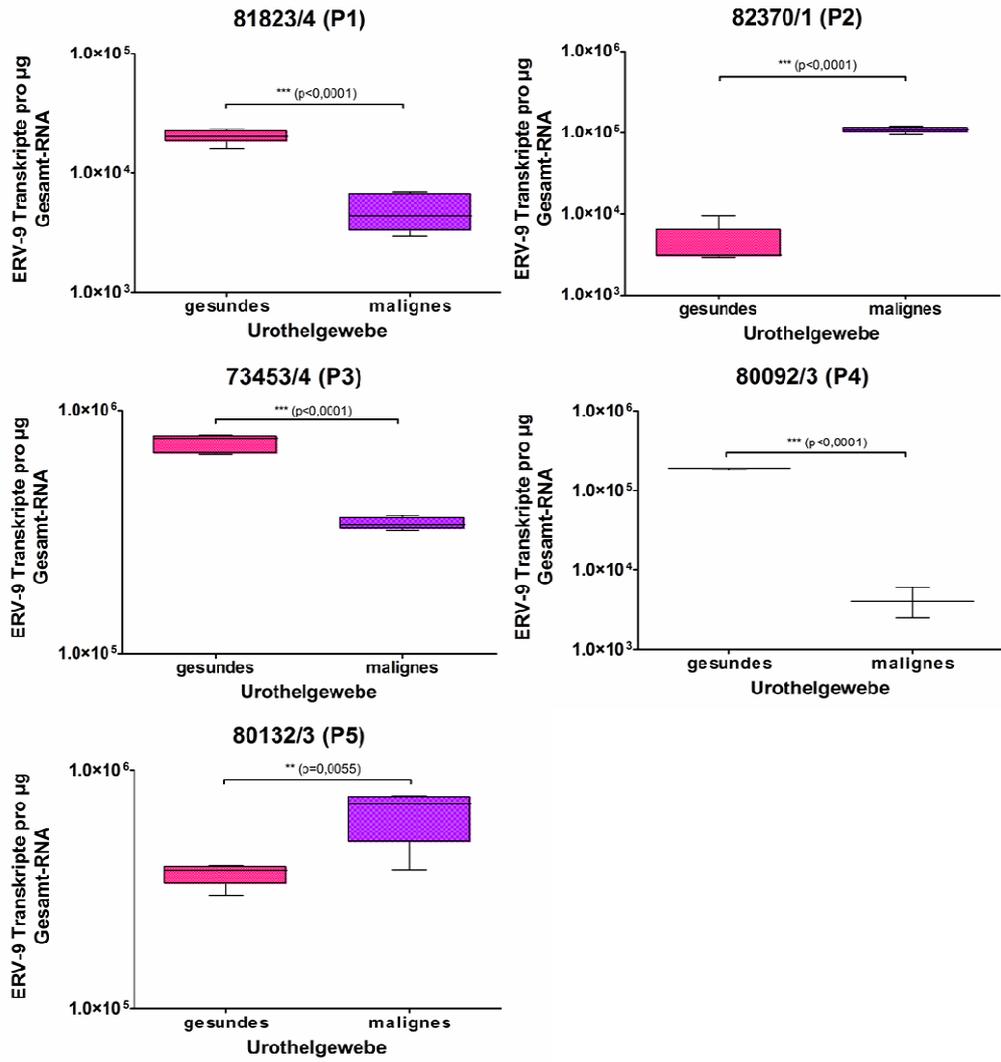
Dargestellt sind die anhand einer Standardkurve berechneten ERV-9 Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA in malignem und gesundem Urothelgewebe. Es wurde das Gewebe von fünf Urothelkarzinompatienten untersucht, das vorher einer Amplikonanalyse unterzogen worden war. Der statistische Unterschied zwischen den Transkriptzahlen von gesundem und malignem Gewebe ist jeweils aufgeführt. Zur Berechnung wurde der paired student's t-test angewendet, damit jeweils die Zusammengehörigkeit von gesunder und maligner Gewebeprobe aus einem Patienten berücksichtigt werden konnte. Als Darstellung wurde ein sogenannter Boxplot verwendet, der die Visualisierung der Schwankung der ermittelten Transkriptzahlen aus mindestens drei unabhängigen Ergebnissen ermöglicht. Zudem ist die Standardabweichung gezeigt.

**B: Relative Unterschiede der ERV-9 Transkription zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe.**

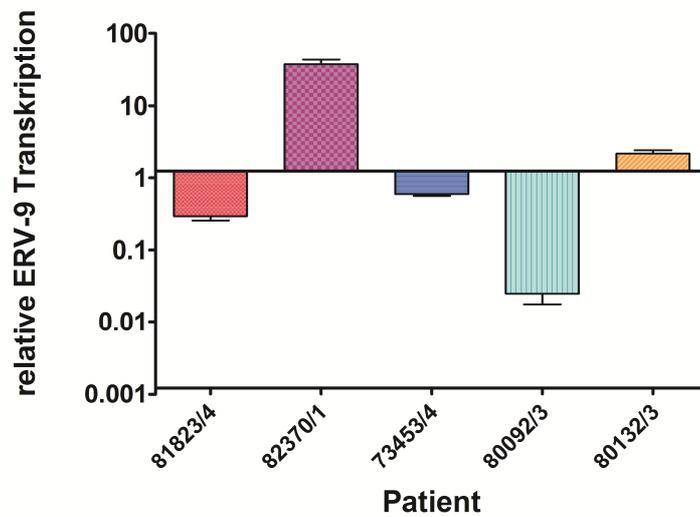
Dargestellt ist der Quotient der ERV-9 Transkriptzahlen (aus A) von malignem und gesundem Urothelgewebe nach Patientennummer aufgeschlüsselt. Zusätzlich ist für jeden relativen Wert die Standardabweichung angegeben, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $y \geq 3$ ) berechnet wurde.

# ERGEBNISSE

**A**



**B**



## ERGEBNISSE

Durch den Vergleich der absoluten qRT-PCR Daten mit den Daten aus der Amplikon-Sequenzierung ergibt sich, dass generell alle ERV-9 Loci, die in den Patienten 81823/4 (P1), 73453/4 (P3) und 80092/3 (P4), sowohl in gesundem als auch in malignem Urothelgewebe, transkriptionell aktiv waren, im Zuge einer malignen Transformation in ihrer Transkription deutlich reprimiert vorliegen (vgl. Anhang Abb. 8.1 und Tab. 8.1). Andererseits zeigen alle ERV-9 Loci, die in gesundem und malignem Urothelgewebe von Patient 82370/1 (P2) identifiziert wurden, eine deutliche Tumor-assoziierte Erhöhung der Transkriptionsaktivität. Für Patient 80132/3 (P5) ergibt sich ein komplexeres Bild, da aufgrund der nur leichten generellen Erhöhung der ERV-9 Transkripte (relative ERV-9 Transkription bei 1,74) im malignen Urothelgewebe ein Teil der sowohl in gesundem als auch malignem Urothelgewebe identifizierten Loci eine Tumor-assoziierte Erhöhung der Transkription aufweist (vgl. Anhang Abb. 8.1 und Tab. 8.1). Aufgrund der deutlich unterschiedlichen individuellen Transkription zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe, konnte auch durch die Einbindung der absoluten ERV-9 qRT-PCR Daten in die Ergebnisse der Amplikon-NGS kein generell verstärkt transkribierter ERV-9 Locus im Tumorgewebe identifiziert werden.

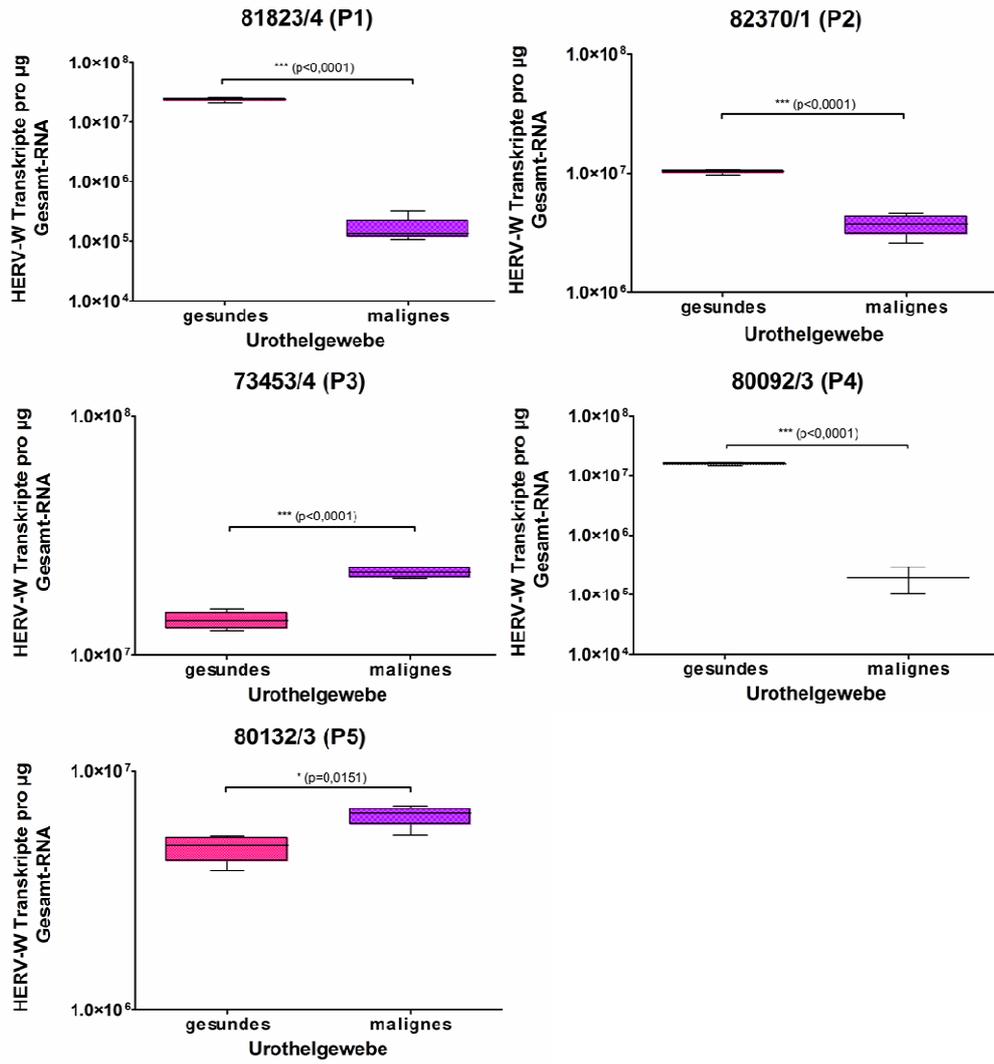
### **4.1.3.2 Quantifizierung der HERV-W Transkription unter Einbindung transkriptionell aktiver HERV-W Loci**

Vergleicht man die absoluten Transkriptzahlen der HERV-W Gruppe des gesunden Urothelgewebes aller fünf Patienten, ergeben sich keine so deutlichen individuellen Unterschiede wie für die ERV-9 Gruppe, da ausnahmslos alle bei Werten von ca.  $1 \times 10^7$  Transkripte pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA lagen (vgl. Abb. 4.8 A). Dafür weist die HERV-W Transkription im malignen Urothelgewebe der einzelnen Patienten deutliche Unterschiede von bis zu teilweise  $1 \times 10^2$  Transkripte pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA auf (vgl. Abb. 4.8 A, 81823/4 (P1) und 73453/4 (P3)).

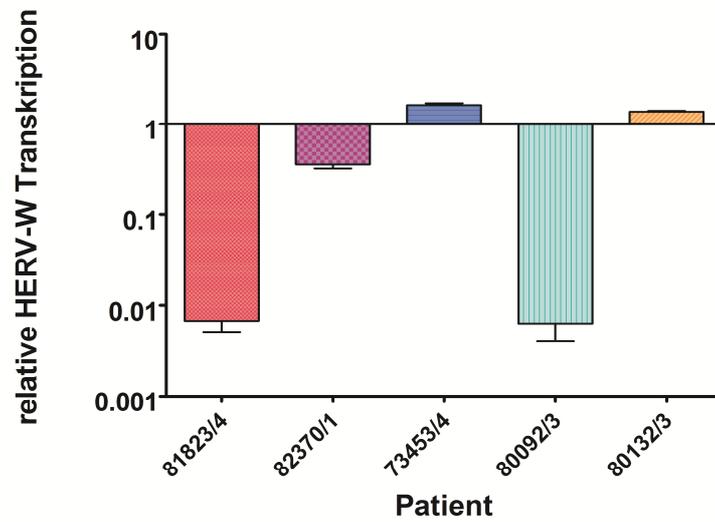
Die relative HERV-W Transkriptionsänderung zwischen malignem und gesundem Urothelgewebe der einzelnen Patienten zeigte, dass es in Patient 81823/4 (P1) (relative HERV-W Transkription bei 0,007), 82370/1 (P2) (relative HERV-W Transkription bei 0,36) und 80092/3 (P4) (relative HERV-W Transkription bei 0,006) zu einer deutlichen Reduktion der HERV-W Transkription im Tumorgewebe kommt. Für Patient 80132/3 (P5) (relative HERV-W Transkription bei 1.38) und Patient 73453/4 (P3) (relative HERV-W Transkription bei 1.6) konnte hingegen nur eine schwache Erhöhung der HERV-W Transkriptzahlen im malignen Urothelgewebe gemessen werden (vgl. Abb. 4.8 B).

# ERGEBNISSE

**A**



**B**



## ERGEBNISSE

**Abbildung 4.8 (auf der vorhergehenden Seite): Quantifizierung der HERV-W Transkriptzahlen mittels absoluter qRT-PCR in Urothelgewebe.**

**A: Absolute HERV-W Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA.**

Dargestellt sind die anhand einer Standardkurve berechneten HERV-W Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA in malignem und gesundem Urothelgewebe. Es wurde das Gewebe von fünf Urothelkarzinompatienten untersucht, das vorher einer Amplikonanalyse unterzogen worden war. Der statistische Unterschied zwischen den Transkriptzahlen von gesundem und malignem Gewebe ist jeweils aufgeführt. Zur Berechnung wurde der paired student's t-test angewendet, damit jeweils die Zusammengehörigkeit von gesunder und maligner Gewebeprobe aus einem Patienten berücksichtigt werden konnte. Als Darstellung wurde ein sogenannter Boxplot verwendet, der die Visualisierung der Schwankung der ermittelten Transkriptzahlen aus mindestens drei unabhängigen Ergebnissen ermöglicht. Zudem ist die Standardabweichung gezeigt.

**B: Relative Unterschiede der HERV-W Transkription zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe.**

Dargestellt ist der Quotient der HERV-W Transkriptzahlen (aus A) von malignem und gesundem Urothelgewebe nach Patientenummer aufgeschlüsselt. Zusätzlich ist für jeden relativen Wert die Standardabweichung angegeben, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $y \geq 3$ ) berechnet wurde.

Analog zu den ERV-9 Daten führte auch bei der HERV-W Gruppe die Zusammenfassung von Ergebnissen einer absoluten qRT-PCR Quantifizierung und der Amplikon-NGS zu keiner Identifizierung eines in allen Patienten tumorspezifisch verstärkt transkribierten HERV-W Locus (vgl. Anhang Abb. 8.2 und Tab. 8.2).

### **4.1.3.3 Quantifizierung der HERV-K(HML-6) Transkription unter Einbindung transkriptionell aktiver HML-6 Loci**

Ein Vergleich der absoluten HERV-K(HML-6) qRT-PCR Daten mit den Amplikon-NGS Daten zeigte, dass im gesunden Urothelgewebe die HML-6 Transkription im Bereich von  $1 \times 10^6$  Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA lag (vgl. Abb. 4.9 A). Im Tumorgewebe hingegen zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich den absoluten HML-6 Transkriptzahlen von bis zu  $1 \times 10^2$ . So konnte z.B. in Patient 81823/4 (P1) nur  $1 \times 10^4$ , in Patient 73453/4 (P3) jedoch über  $1 \times 10^6$  HML-6 Transkripte nachgewiesen werden. Diese deutlichen Unterschiede zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe spiegeln sich auch in den relativen HML-6 Transkriptzahlen wieder (vgl. Abb. 4.9 B).

In Patient 81823/4 (P1) kommt es zu einer mehr als 400 fachen Reduktion der HML-6 Transkription im malignen Urothelgewebe, verglichen mit dem dazugehörigen gesunden Urothelgewebe (vgl. Abb. 4.9 B, relative HML-6 Transkription bei 0,0023). Auch bei Patient 80092/3 (P4) kommt es zu einer tumorspezifischen Reduktion der HML-6 Transkription um mehr als den Faktor 77 (relative HML-6 Transkription bei 0,013). Für die Patienten 82370/1 (P2) und 80132/3 (P5) wurden im malignen Urothelgewebe ebenfalls weniger HML-6 Transkripte nachgewiesen als in deren gesunden Urothelgewebe (relative HML-6 Transkription bei 0,64 bzw. 0,52). Nur in Patient 73453/4 (P3) konnte eine Erhöhung der

## ERGEBNISSE

HML-6 Transkriptzahlen im Tumorgewebe um das ca. 2,85 fache beobachtet werden (vgl. Abb. 4.9 B).

**Abbildung 4.9 (auf der nächsten Seite): Quantifizierung der HML-6 Transkriptzahlen mittels absoluter qRT-PCR in Urothelgewebe.**

**A: Absolute HML-6 Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA.**

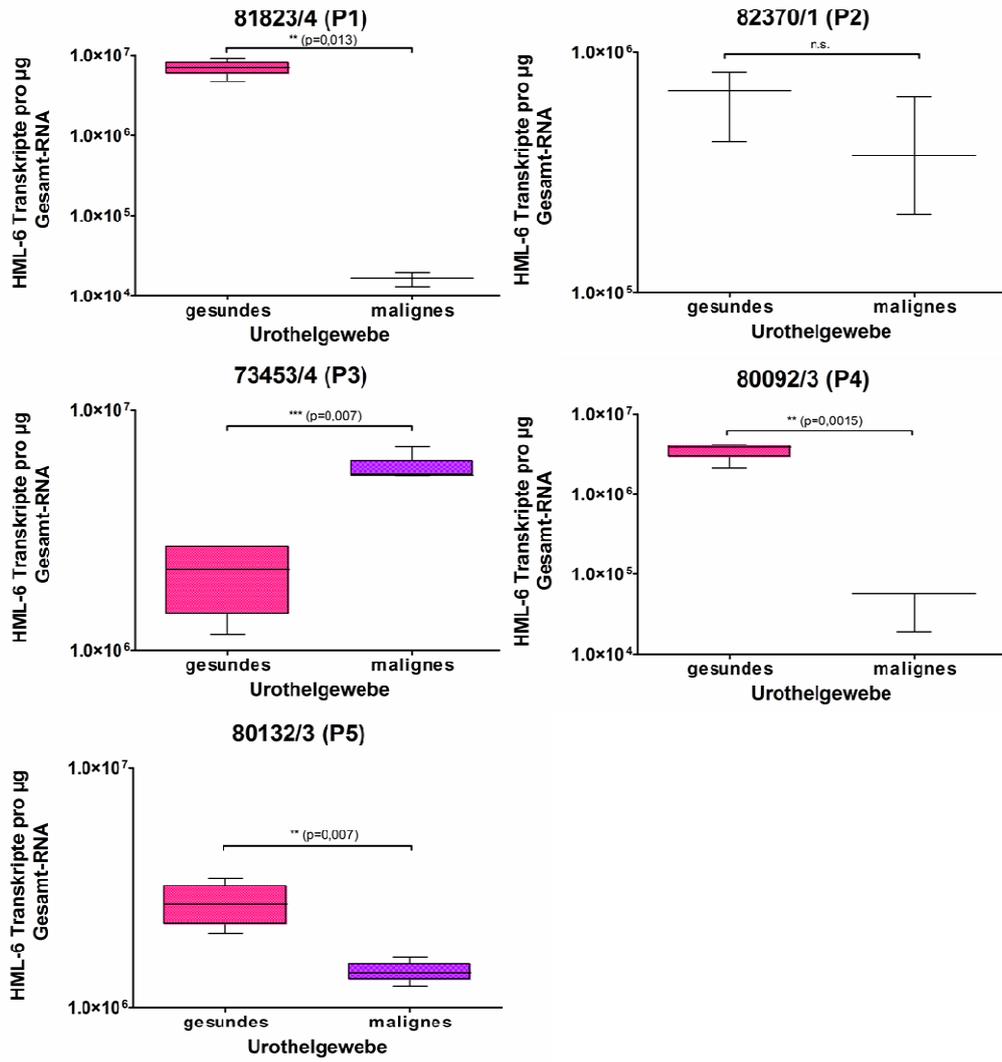
Dargestellt sind die anhand einer Standardkurve berechneten HML-6 Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA, aufgeteilt nach malignem und gesundem Urothelgewebe. Es wurde das Gewebe von fünf Urothelkarzinompatienten untersucht, das vorher einer Amplikonanalyse unterzogen worden war. Der statistische Unterschied zwischen den Transkriptzahlen von gesundem und malignem Gewebe ist jeweils aufgeführt. Zur Berechnung wurde der paired student's t-test angewendet, damit jeweils die Zusammengehörigkeit von gesunder und maligner Gewebeprobe aus einem Patienten berücksichtigt werden konnte. Als Darstellung wurde ein sogenannter Boxplot verwendet, der die Visualisierung der Schwankung der ermittelten Transkriptzahlen aus mindestens drei unabhängigen Ergebnissen ermöglicht. Zudem ist die Standardabweichung gezeigt.

**B: Relative Unterschiede der HML-6 Transkription zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe.**

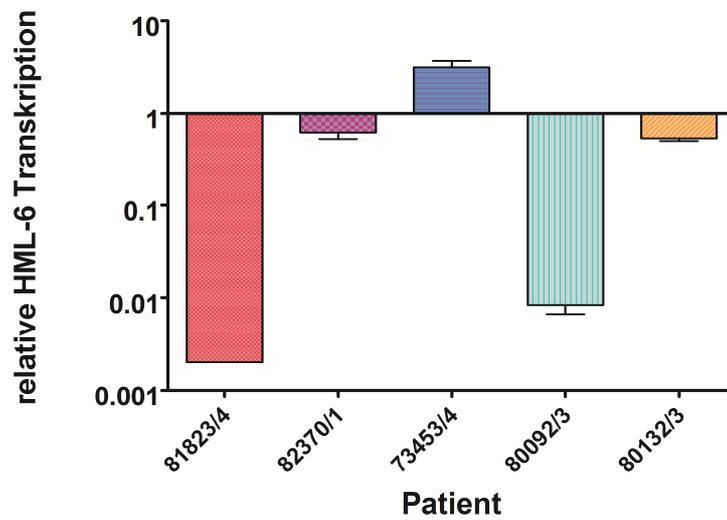
Dargestellt ist der Quotient der HML-6 Transkriptzahlen (aus A) von malignem und gesundem Urothelgewebe nach Patientenummer aufgeschlüsselt. Zusätzlich ist für jeden relativen Wert die Standardabweichung angegeben, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $y \geq 3$ ) berechnet wurde.

# ERGEBNISSE

**A**



**B**



## ERGEBNISSE

Eine Verknüpfung der Daten aus der HML-6 Locusbestimmung mit den HML-6 Amplikon-NGS Quantifizierungsdaten führte zu keiner Identifizierung eines, in Urotheltumorgewebe generell verstärkt transkribiertem HML-6 Locus (vgl. Anhang Abb. 8.3 und Tab. 8.3).

### 4.1.3.3 Quantifizierung der HERV-K(HML-2) Transkription unter Einbindung transkriptionell aktiver HML-2 Loci

Durch die Quantifizierung der absoluten HML-2 Molekülzahlen konnten deutliche individuelle Schwankungen der HML-2 Transkription zwischen den fünf untersuchten Urothelkarzinompatienten nachgewiesen werden. So konnten je nach Art des Urothelgewebes und Patient zwischen  $5 \times 10^3$  und  $3 \times 10^6$  HML-2 Transkripte detektiert werden (vgl. Abb. 4.10 A).

Ein Trend hin zu einer tumorspezifischen Erhöhung bzw. Erniedrigung der HML-2 Gesamttranskriptionsrate wurde nicht festgestellt. Vielmehr konnten hier ebenfalls individuelle Unterschiede der HML-2 Transkriptzahlen zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe einzelner Patienten detektiert werden.

Die größte Änderung der HML-2 Gesamttranskription durch eine maligne Transformation wurde in Patient 80092/3 (P4) nachgewiesen (vgl. Abb. 4.10 A bzw. B). Im Tumorgewebe kommt es zu einer mehr als 125fachen Reduktion der HML-2 Transkripte im Vergleich zum gesunden Urothelgewebe (vgl. Abb. 4.10 A und B).

**Abbildung 4.10 (auf der nächsten Seite): Quantifizierung der HML-2 Transkriptzahlen mittels absoluter qRT-PCR von gesundem und malignem Urothelgewebe**

**A: Absolute HML-2 Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA.**

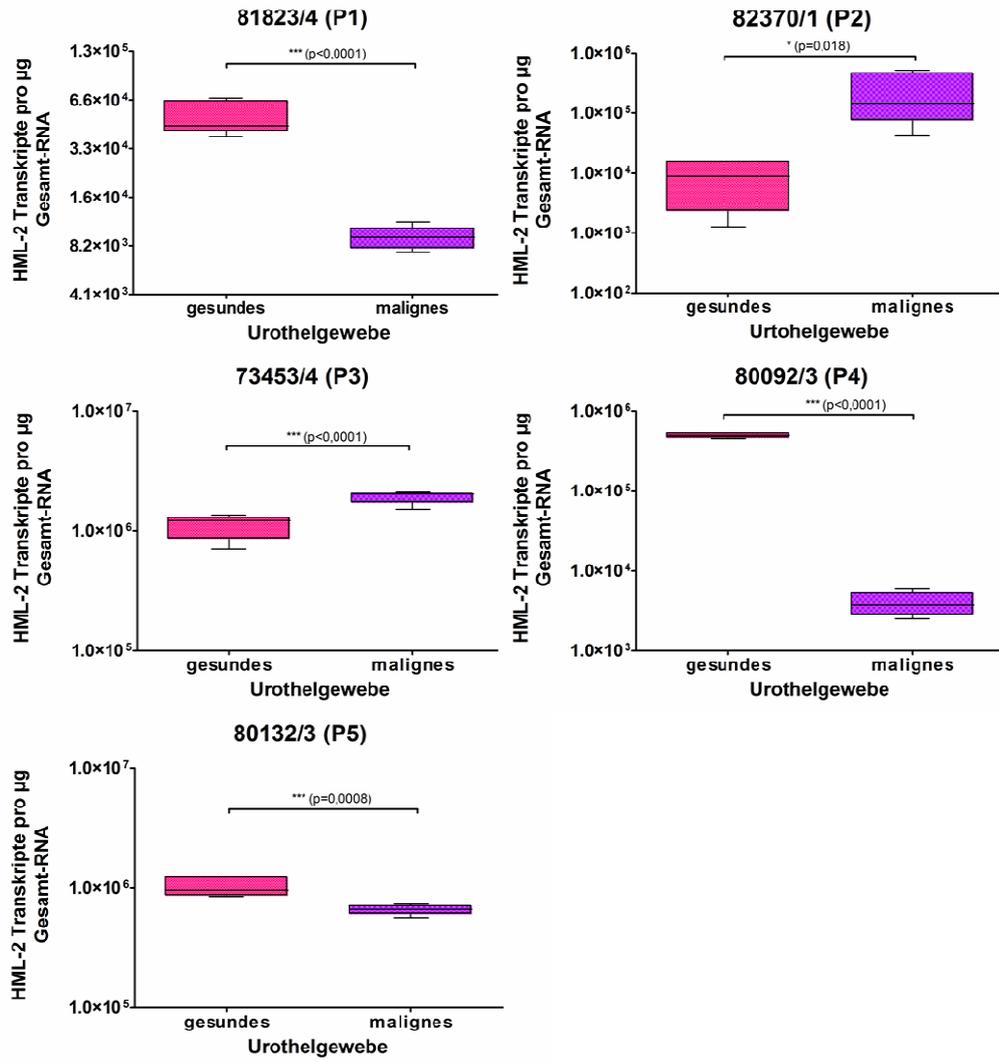
Dargestellt sind die per Standardkurve berechneten HML-2 Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA, aufgeteilt nach malignem und gesundem Urothelgewebe. Es wurde das Gewebe von fünf Urothelkarzinompatienten untersucht, das vorher einer Amplikonanalyse unterzogen worden war. Der statistische Unterschied zwischen den Transkriptzahlen von gesundem und malignem Gewebe ist jeweils aufgeführt. Zur Berechnung wurde der paired student's t-test angewendet, damit jeweils die Zusammengehörigkeit von gesunder und maligner Gewebeprobe aus einem Patienten berücksichtigt werden konnte. Als Darstellung wurde ein sogenannter Boxplot verwendet, der die Visualisierung der Schwankung der ermittelten Transkriptzahlen aus mindestens drei unabhängigen Ergebnissen ermöglicht. Zudem ist die Standardabweichung gezeigt.

**B: Relative Unterschiede der HML-2 Transkription zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe der Patienten aus A.**

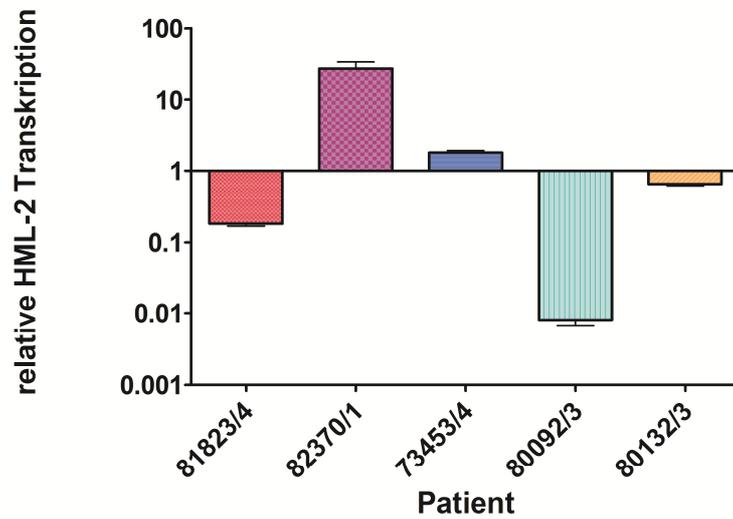
Dargestellt ist der Quotient der HML-2 Transkriptzahlen (aus A) von malignem und gesundem Urothelgewebe nach Patientennummer aufgeschlüsselt. Zusätzlich ist für jeden relativen Wert die Standardabweichung angegeben, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $y \geq 3$ ) berechnet wurde.

# ERGEBNISSE

**A**



**B**



Eine zusätzliche Berücksichtigung der HML-2 Locusbestimmungs-Daten aus der Amplikon-NGS führte ebenfalls zu keiner Identifizierung eines, in Urotheltumorgewebe generell verstärkt transkribiertem HML-2 Locus (vgl. Anhang Abb. 8.4 und Tab. 8.4).

### **4.2. Brustkrebsstudie**

#### **4.2.1 HERV-Transkription in gesundem und malignem Brustdrüsengewebe**

Die am häufigsten mit der Dysregulation von HERV-Elementen assoziierte Krebsart ist Brustdrüsenkrebs. Von mehreren Arbeitsgruppen wurde sowohl eine erhöhte Transkription, als auch Protein-Expression insbesondere der HERV-K(HML-2) Gruppe sowohl in Brustdrüsengewebe (Wang-Johanning *et al.* 2001, Wang-Johanning *et al.* 2003, Ejthadi *et al.* 2005, Contreras-Galindo *et al.* 2008, Wang-Johanning *et al.* 2008, Wang-Johanning *et al.* 2012) als auch im Serum (Wang-Johanning *et al.* 2014) von Brustkrebspatientinnen beschrieben.

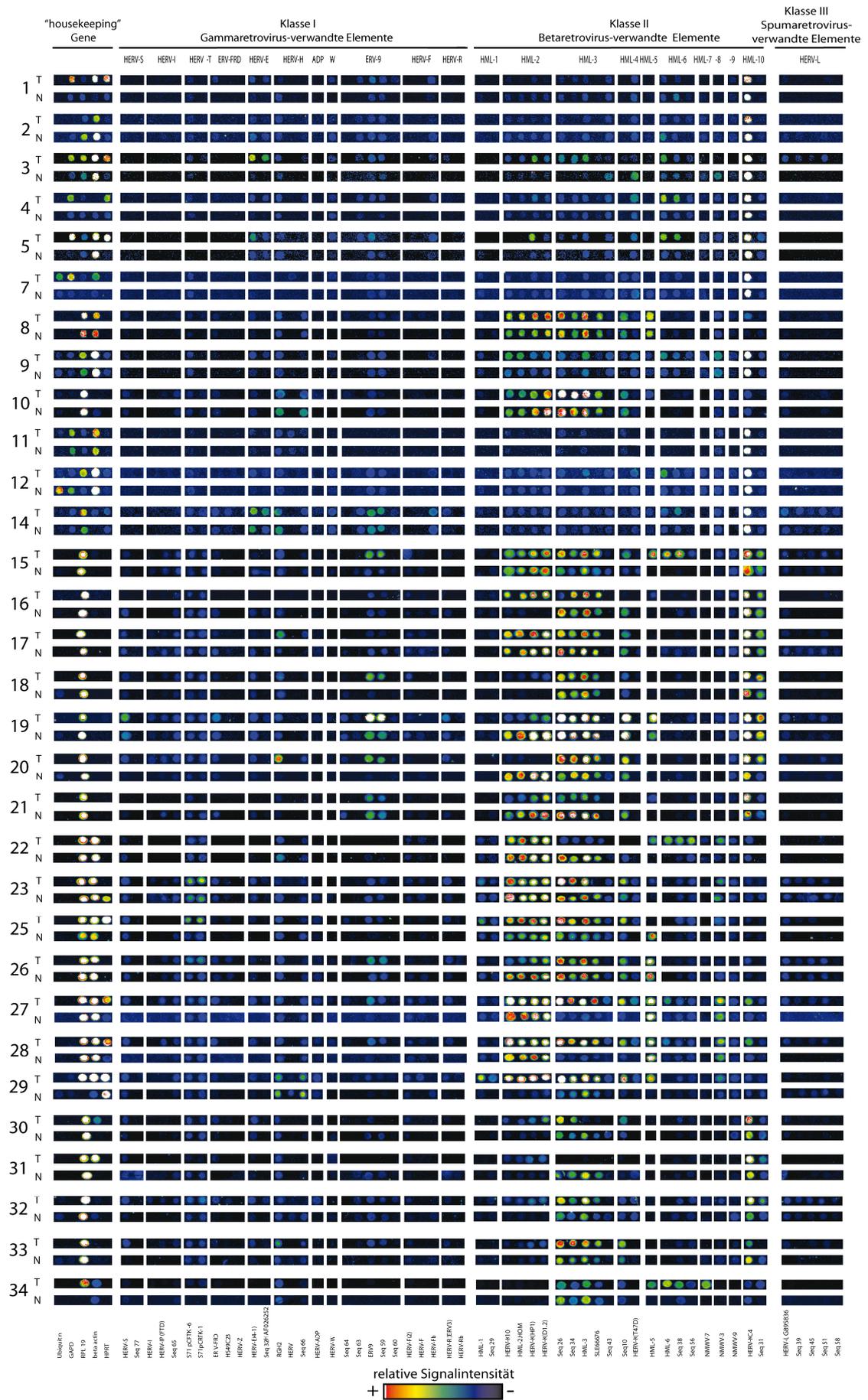
Aufgrund dieser Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von HERV-Elementen bei der Entstehung von Brustdrüsentumoren, wurde die Transkription verschiedener HERV-Elemente in gesundem und malignem Brustdrüsengewebe untersucht.

##### **4.2.1.1 HERV-Transkriptionsprofile von Brustdrüsengewebe erstellt mittels Microarray-Analysen**

Für die Erstellung der HERV-Transkriptionsprofile in gesundem und malignem Brustdrüsengewebe wurde derselbe HERV-spezifische Microarray wie für das Urothelgewebe verwendet.

Um generelle Unterschiede in der Transkription der 54 HERV-Subgruppen der 21 HERV-Gruppen, die mit dem Retroarray abgedeckt werden, zwischen malignem und gesundem Brustdrüsengewebe zu identifizieren, wurden HERV-spezifische Microarray-Analysen von 31 Brustkrebspatientinnen durchgeführt. Dabei stammte gesundes Gewebe immer aus derselben (ipsilateralen) Brust, in der auch das primäre Mammakarzinom lokalisiert war. Eine Zusammenfassung der HERV-Transkriptionsprofile von gesundem und malignem Brustdrüsengewebe aller 31 Patientinnen ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

# ERGEBNISSE



## ERGEBNISSE

### **Abbildung 4.11 (auf der vorhergehenden Seite): HERV-Transkriptionsprofile von 31 Brustkrebspatientinnen.**

Insgesamt wurden 54 HERV-Subgruppen mit einem Retrovirus-spezifischen Microarray analysiert (Seifarth *et al.* 2003). Es wurde jeweils das Brustdrüsentumorgewebe (T) mit dem normalen, gesunden Brustdrüsenngewebe (N) derselben Patientin verglichen. Die Zahlen geben die Nummern der Patientinnen an. Des Weiteren ist eine Signalintensitäts-Skala aufgeführt, an Hand derer die relative transkriptionelle Aktivität der einzelnen HERV-Gruppen abgelesen werden kann. Patientinnen mit den Nummern #6, #13 und #24 konnten nicht analysiert werden, da nicht genügend RNA aus dem Gewebe extrahiert werden konnte.

Wie man in Abbildung 4.11 erkennen kann, zeigen sich deutliche individuelle Unterschiede zwischen den HERV-Transkriptionsprofilen einzelner Patientinnen. Auch die housekeeping Gene werden in einzelnen Individuen unterschiedlich transkribiert. Dabei scheint (wie auch beim Urothelgewebe) RPL19 das in Brustdrüsenngewebe am konstantesten transkribierte housekeeping Gen zu sein, da es in fast allen Gewebeproben als aktiv nachgewiesen werden konnte. Die HERV-K Gruppen HML-2, HML-3, HML-4 und HML-10 (KC4) scheinen am stärksten transkriptionell aktiv zu sein, da in fast allen Patientinnen sowohl im gesunden als auch im malignem Brustdrüsenngewebe starke Fluoreszenz-Signale im Microarray beobachtet werden konnten.

Eine detaillierte und übersichtliche Auswertung der Unterschiede der HERV-Transkriptionsprofile ist in Tabelle 4.7 zusammengestellt.

## ERGEBNISSE

**Tabelle 4.7: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abbildung 4.11**

HERV-Klasse	HERV-Gruppe	HERV-Subgruppe	% der Fälle mit im Tumor erhöhten Signalen	% der Fälle mit im Tumor erniedrigten Signalen	% der Fälle ohne Signalunterschied zwischen Tumor und gesundem Gewebe
Klasse I	HERV-S	HERV-S	19	6	75
		Seq77	0	0	100
	HERV-I	HERV-I	6	0	94
		HERV-IP (FTD)	13	10	77
		Seq65	3	3	25
	HERV-T	S71pCRTK-6	3	0	97
		S71pCRTK-1	13	3	84
	ERV-FRD	ERV-FRD	13	13	74
		HS49C23	3	0	97
		HERV-Z	0	0	100
	HERV-E	<b>HERV-E(4-1)</b>	<b>42</b>	<b>13</b>	<b>45</b>
		Seq 32	23	6	71
	HERV-H	RGH2	6	16	78
		HERV	3	0	97
		Seq66	10	6	84
	HERV-ADP	HERV-ADP	3	0	97
	HERV-W	HERV-W	6	3	91
	ERV-9	Seq64	6	3	91
		Seq63	10	3	87
		<b>ERV9</b>	<b>42</b>	<b>3</b>	<b>55</b>
		<b>Seq59</b>	<b>32</b>	<b>6</b>	<b>62</b>
		Seq60	0	3	97
	HERV-F	HERV-F(2)	6	3	91
HERV-F		0	6	94	
HERV-Fb		19	3	78	
HERV-R	<b>HERV-R(ERV3)</b>	<b>26</b>	<b>6</b>	<b>68</b>	
	HERV-Rb	0	0	100	
Klasse II (HERV-K)	HML-1	HML-1	6	3	91
		Seq29	3	10	87
	HML-2	HERVK-10	23	16	61
		<b>HML-2.HOM</b>	<b>26</b>	<b>19</b>	<b>55</b>
		<b>HERV-K(HP1)</b>	<b>26</b>	<b>23</b>	<b>51</b>
		HERV-K(D1.29)	19	23	42
	HML-3	<b>Seq26</b>	<b>29</b>	<b>16</b>	<b>55</b>
		<b>Seq34</b>	<b>35</b>	<b>10</b>	<b>55</b>
		<b>HML-3</b>	<b>26</b>	<b>13</b>	<b>61</b>
		SLE66676	19	13	68
		Seq43	6	13	81
	HML-4	Seq10	19	10	71
		HERV-K(T47D)	13	10	77
	HML-5	<b>HML-5</b>	<b>26</b>	<b>6</b>	<b>68</b>
	HML-6	<b>HML-6</b>	<b>29</b>	<b>3</b>	<b>68</b>
		<b>Seq38</b>	<b>26</b>	<b>10</b>	<b>64</b>
		Seq56	16	3	71
HML-7	NMWV-7	0	0	100	
HML-8	<b>NMWV-3</b>	<b>29</b>	<b>10</b>	<b>61</b>	
HML-9	HMVV-9	0	6	94	
HML-10	<b>HERV-KC4</b>	<b>29</b>	<b>0</b>	<b>71</b>	
	Seq31	13	3	74	
Klasse III	HERV-L	HERV-L	16	3	81
		Seq39	10	3	87
		Seq45	13	6	81
		Seq51	19	6	75
		Seq58	3	3	94

Gelb: In über 25% der Patientinnen im malignen Urothelgewebe erhöhte Signale.

Wie man in Abbildung 4.11 bzw. Tabelle 4.7 sehen kann, zeigen sich teils deutliche Unterschiede der Transkriptionsaktivität einiger HERV-Gruppen zwischen gesundem und

## ERGEBNISSE

malignem Brustdrüsengewebe. Einige HERV-(Sub)Gruppen wie ERV9, Seq59, HERV-R(ERV3), HML-2.HOM, HERV-K(HP1), Seq26, Seq34, HML-3, HML-5, HML-6, Seq38, NMWV-3, HERV-KC-4 und HERV-E(4-1) waren in min. 25% der Fälle Tumor-assoziiert erhöht transkribiert (vgl. Tab. 4.7 in Gelb markiert). Dabei stach die HERV-E(4-1) Gruppe mit einer in 42% der Brustkrebsfälle im Tumor erhöhten Transkription heraus. Interessanterweise zeigten die zur HERV-K(HML-2) Gruppe gehörenden Subgruppen HML-2.HOM und HERV-K(HP1) in 19 bzw. 23% der Patientinnen eine Tumor-assoziiert erniedrigte Transkriptionsaktivität.

Tendenziell scheint es bei einer malignen Transformation von Brustdrüsengewebe bei einem Teil der Patientinnen zur Erhöhung der HERV-Transkription zu kommen. So konnten insgesamt 14 HERV-Subgruppen identifiziert werden, die in mindestens 25% der Fälle eine Tumor-assoziiert erhöhte Transkription aufwiesen. Die restlichen HERV-Gruppen zeigten hingegen tendenziell eher keine Änderung der Transkriptionsaktivität zwischen gesundem und malignem Brustdrüsengewebe.

Zusätzlich zu den HERV-Transkriptionsprofilen von gesundem und malignem Brustdrüsengewebe der 31 Brustkrebspatientinnen wurden auch von je einer Lymphknotenmetastase von sieben Patientinnen ein HERV-Transkriptionsprofil mittels HERV-spezifischen Microarray-Analysen erstellt (vgl. Anhang Abb. 8.5). Dabei zeigte sich, dass die Lymphknotenmetastasen nahezu identische HERV-Transkriptionsprofile verglichen mit den dazugehörigen Brustdrüsentumorproben aufweisen.

Aufgrund der Micoarray-Analysen sowie der Vielzahl an Publikationen, die eine Assoziation der HERV-K(HML-2) Gruppe mit Brustdrüsenkarzinomen beschreiben, wurde im folgenden das Hauptaugenmerk auf diese HERV Gruppe gelegt.

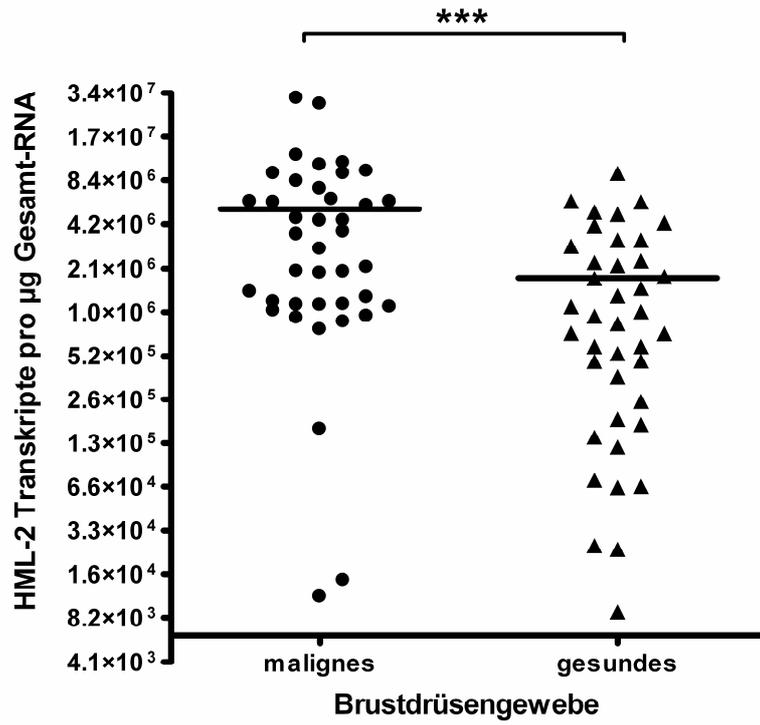
### **4.2.1.2 Quantifizierung der HERV-K(HML-2) Transkriptzahlen in Brustdrüsengewebe mittels absoluter qRT-PCR**

Für die absolute Quantifizierung der HML-2 Transkriptzahlen in Brustdrüsengewebe wurde die Anzahl der untersuchten Patientinnen auf 40 aufgestockt.

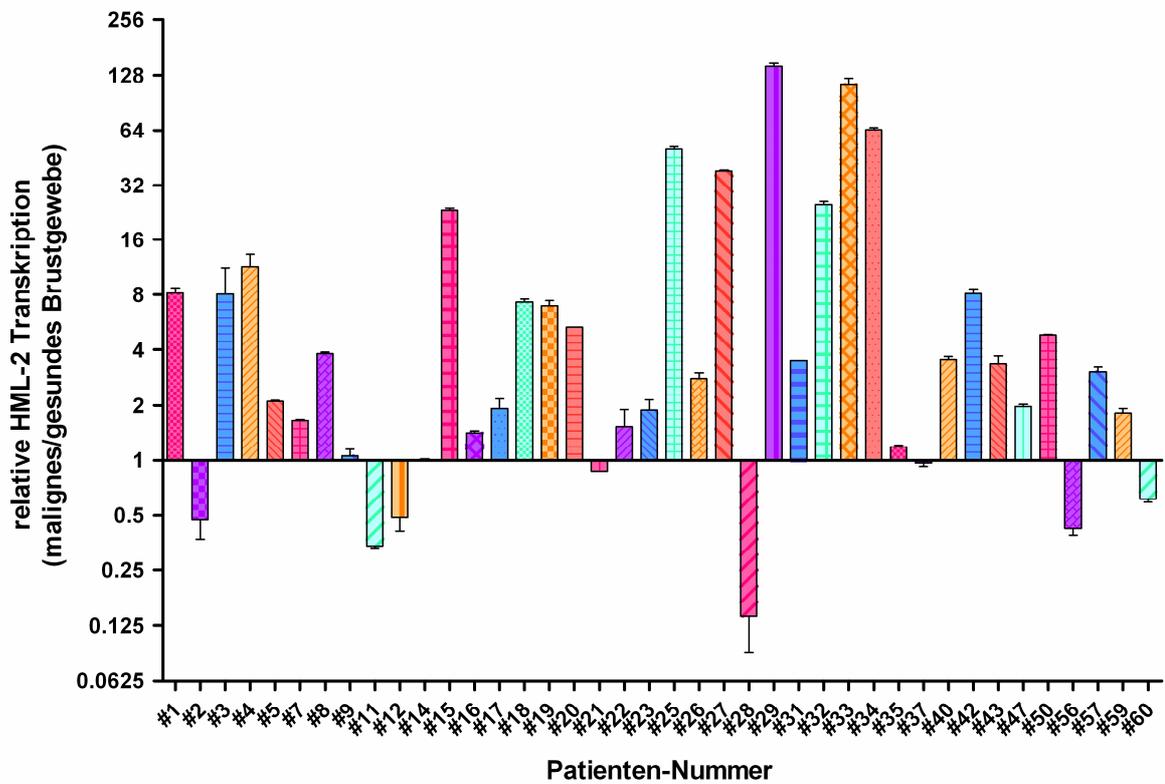
Die Quantifizierung wurde analog zur Quantifizierung von HML-2 in Urothelgewebe durchgeführt. Da wie in Kapitel 4.1.1.2 beschrieben für die absolute qRT-PCR HML-2 *gag*-spezifische Primer verwendet werden mussten, decken sich die Transkriptionsdaten aus dem Retrovirus-spezifischen Microarray, bei dem die Detektion von HERV-Transkripten über die retroviralen *pol*-Regionen erfolgt, nur bedingt mit den Ergebnissen aus der Quantifizierung der HML-2 Transkripte mittels absoluter qRT-PCR.

ERGEBNISSE

A



B



## ERGEBNISSE

**Abbildung 4.12 (auf der vorhergehenden Seite): Quantifizierung der HERV-K(HML-2) Transkriptzahlen in gesundem und malignem Brustdrüsengewebe mittels absoluter qRT-PCR.**

**A: HERV-K(HML-2) gag-Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA.**

Dargestellt sind die mit Hilfe einer Plasmid-Standardkurve berechneten HML-2 Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA, aufgeteilt nach malignem und gesundem Brustdrüsengewebe. Insgesamt wurde Gewebe von 40 Brustkrebspatientinnen untersucht. Der statistische Unterschied zwischen den Transkriptzahlen beträgt  $p = 0,0008$  (= \*\*\*) und ist somit signifikant. Zur Berechnung wurde der paired student's t-test angewendet, damit jeweils die Zusammengehörigkeit von gesunder und maligner Gewebeprobe aus einer Patientin berücksichtigt werden konnte.

**B: Relative Unterschiede der HERV-K(HML-2) Transkription in gesundem und malignem Brustdrüsengewebe von 40 Patientinnen.**

Dargestellt ist der Quotient der HML-2 Transkriptzahlen (aus A) von malignem und gesundem Brustdrüsengewebe nach Patientenummer aufgeschlüsselt. X-Achsen Werte über 1,5 gelten als eine Tumor-assoziiert erhöhte HML-2 Transkription, Werte unter 0,75 als Tumor-assoziiert erniedrigte HML-2 Transkription. Werte zwischen 0,75 und 1,5 werden als nicht signifikanter biologischer Schwankungsbereich angesehen. Zusätzlich ist für jeden relativen Wert die Standardabweichung angegeben, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $y \geq 3$ ) berechnet wurde. Fehlende Patientinnen konnten aufgrund geringer RNA-Ausbeute nicht analysiert werden.

Die quantitative Analyse von HML-2 Transkripten zeigte, dass 28 der 40 (= 70%) untersuchten Patientinnen, mit einer relativen HML-2 Transkription von über 1,5 im Tumor (vgl. Abb. 4.12 B) erhöhte HML-2 Transkriptzahlen, im Vergleich zum dazugehörigem gesunden Brustdrüsengewebe aufwiesen. Einige der Patientinnen, wie z.B. Patient #29, #33 und #34, zeigten mit einer Erhöhung der HML-2 Transkriptzahlen um einen Faktor von 40-140, eine deutlich Tumor-assoziiert erhöhte HML-2 Transkription. Für sechs der 40 Patientinnen (= je 15%) konnten hingegen keine nennenswerten Unterschiede in der HML-2 Transkription zwischen gesundem und malignem Brustdrüsengewebe (relative Werte zwischen 0,75 und 1,5) beobachtet werden. Bei sechs weiteren Patientinnen wurden erniedrigte Transkriptionraten im Tumorgewebe (relative Werte unter 0,75) gemessen (vgl. Abb. 4.12 B).

Betrachtet man die absoluten HML-2 Transkriptzahlen (vgl. Abb. 4.12 A) werden große individuelle Unterschiede in der Anzahl der HML-2 Transkripte zwischen den einzelnen Patientinnen deutlich. So schwanken die Transkriptzahlen innerhalb eines Gewebetypes zwischen einzelnen Individuen um teilweise drei Zehnerpotenzen. Wenn man den Mittelwert der HML-2 Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$ -Gesamt-RNA vom malignen Brustdrüsengewebe (mit  $3,5 \times 10^6$  Transkriptzahlen) mit dem Mittelwert vom gesundem Brustdrüsengewebe (mit  $1,2 \times 10^6$  Transkriptzahlen) vergleicht, ist dennoch ersichtlich, dass eine generelle tumorspezifische Erhöhung der HML-2 Transkription um das 3fache vorliegt. Berücksichtigt man die Zusammengehörigkeit der einzelnen Probenpaare von jeweils einer gesunden und einer malignen Gewebeprobe von derselben Patientin, bestätigt eine statistische Auswertung der absoluten qRT-PCR Transkriptionsdaten mit dem paired student's t-test eine statistisch signifikante Erhöhung der HML-2 Transkriptzahlen im Brusttumorgewebe im Vergleich zum gesunden Brustdrüsengewebe ( $p = 0,0008 = \text{***}$ ) (vgl. Abb. 4.12 A).

Eine Analyse der HERV-Transkription mittels HERV-spezifischen Microarray- und absoluten qRT-PCR-Analysen ermöglicht nicht die Detektion von Transkriptionsänderungen auf Locus-Ebene. Um krebsbedingte Transkriptionsänderungen einzelner HERV-K(HML-2) Loci zu erfassen, wurden deshalb zusätzlich eine Locusbestimmung anhand einer cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung durchgeführt.

### **4.2.2 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-Loci in Brustdrüsengewebe anhand von cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung**

Für die Identifizierung transkriptionell aktiver HERV Loci in Brustdrüsengewebe wurde auf eine cDNA-Klonierung mit anschließender Sanger-Sequenzierung zurückgegriffen.

Hierbei wurde analog zu einer Amplikon-NGS mittels HERV-Gruppen spezifischen Primern eine cDNA-Bibliothek erstellt. Diese wurde anschließend in den pGMT-Vektor ligiert und in *E.coli* transformiert. Plasmid DNA aus positiven Klonen wurde abschließend per Sanger-Sequenzierung sequenziert. Abschließend erfolgte eine bioinformatische Rückkartierung der in den Plasmiden enthaltenen HERV-Sequenzen zu ihrem Ursprungs-HERV-Locus mittels der BLAT-Funktion des UCSC Genome Browsers. Durch die Analyse einer größeren Anzahl an Sequenzen kann, ebenfalls wie bei einer Amplikon-NGS, eine statistische Aussage über den Anteil der als transkriptionell aktiv identifizierten HERV-Loci an der Gesamttranskription der entsprechenden HERV-Gruppe getroffen werden.

Im Gegensatz zur Amplikon-NGS weist eine Sanger-Sequenzierung eine deutlich höhere durchschnittliche Leseweite auf, weshalb die Sequenzierung längerer Amplikons möglich war.

#### **4.2.2.1 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-K(HML-6) Loci in Brustdrüsengewebe**

Für die Identifizierung aktiver Loci anhand von cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung wurden aufgrund der HERV-spezifischen Microarray-Daten (vgl. Abb. 4.11 und Tab. 4.7) die Brustkrebspatientinnen #4, #5, #12, #22 und #25 ausgewählt. Diese zeigten in den Microarray-Analysen deutliche erhöhte HML-6 Signale im Mammakarzinom, verglichen mit dem jeweiligen korrespondierenden gesunden Brustdrüsengewebe. Dementsprechend wurden bei diesen Patientinnen die transkriptionell aktiven HML-6 Loci für das gesunde und

## ERGEBNISSE

das korrespondierende maligne Brustdrüsengewebe identifiziert. Bei Patientin #5 wurde zusätzlich eine Lymphknotenmetastase untersucht. Für die Generierung der Ausgangs-cDNA-Bibliothek der HML-6 Gruppe wurden HML-6 gag-spezifische Primermischungen verwendet, die erstmals in einer Publikation von Muradrasoli *et al.*, bzw. Frank. *et al.* Verwendung fanden (Muradrasoli *et al.* 2006, Frank *et al.* 2008). Diese ermöglichen im Gegensatz zu den HML-6 spezifischen Primer, die in der Urothel-Amplikon-NGS zum Einsatz kamen, die Detektion einer noch größeren Anzahl an proviralen HML-6 Loci, da zum einen ein degenerierter forward Primer und zum anderen zwei verschiedene reverse Primer zum Einsatz kamen.

**Tabelle 4.8: Mittels cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung identifizierte transkriptionell aktive HML-6 Loci**

chromosomale Bande	Amplikon-Koordinaten Start Stop	Anteil der Transkripte einzelner HML-6 Loci an der HML-6 Gesamttranskription in % (Anzahl analysierter Klone)											
		#4		#5			#12		#22		#25		
		Normal	Tumor	Normal	Tumor	Metastase	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	
5q13.2 bzw. (5_h2_hap1)	70907200 70907586 (1532263 1532649)	33,3 (6)	15,0 (3)	22,2 (4)	-	5,0 (1)	5,3 (1)	-	5,9 (1)	40,0 (8)	10,0 (1)	-	
11p15.4	7880559 7880931	11,1 (2)	-	-	-	5,0 (1)	-	10,0 (2)	41,2 (7)	-	10,0 (1)	-	
12q24.12	110744012 110744392	-	-	-	-	-	-	-	5,9 (1)	-	-	-	
16p11.2	30539397 30539796	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0 (1)	-	-	
19q13.41 (1)	57003371 57003757	55,6 (10)	75,0 (15)	77,8 (14)	100,0 (20)	85,0 (17)	94,7 (18)	90,0 (18)	47,1 (8)	45,0 (9)	80,0 (8)	100,0 (12)	
19q13.41 (2)	57670825 57671216	-	10,0 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19q13.43	63512173 63512549	-	-	-	-	5,0 (1)	-	-	-	10,0 (2)	-	-	
	<b>Gesamt</b>	100 (18)	100 (20)	100 (18)	100 (20)	100 (20)	100 (19)	100 (20)	100 (17)	100 (20)	100 (10)	100 (12)	

Grün: In Brustdrüsengewebe ubiquitär transkribierte HERV-K(HML-6) Loci. Normal: gesundes Brustdrüsengewebe; Tumor: malignes Brustdrüsengewebe; Metastase: Lymphknotenmetastase

Insgesamt wurden sieben transkribierte HML-6 Loci in den untersuchten Brustdrüsengewebeproben identifiziert (vgl. Tab. 4.8). Transkripte der Loci 5q13.2 und 19q13.41 (1) konnten in allen gesunden Proben nachgewiesen werden, weshalb diese als in Brustdrüsengewebe ubiquitär aktive HML-6 Loci betrachtet werden können. Zudem ist 19q13.41 (1) in allen untersuchten Gewebeproben der am stärksten transkribierte HML-6 Locus (vgl. Tab. 4.8 in Grün). Trotz der scheinbaren Brustdrüsen-spezifischen Transkription des 5q13.2 Locus konnte dieser nur in zwei Tumorgewebeproben als aktiv nachgewiesen werden.

Die Daten der Locusbestimmung mittels cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung bestätigen die bereits in den vorhergehenden Versuchen beobachteten individuellen Unterschiede bezüglich der HERV-Transkription. So unterscheiden sich Gewebeproben der einzelnen Patientinnen nicht nur in der Anzahl der transkriptionell aktiven HML-6 Loci, die z.B. zwischen zwei (Patientin #5) und vier (Patientinnen #4 und #22) Loci liegt, sondern auch in deren Identität (vgl. Tab. 4.8, Locus 11p15.4) und Transkriptionsrate (vgl. Tab. 4.8, Locus 5q13.2). Zwar sind auch Unterschiede bezüglich der Loci-Aktivität zwischen gesundem und malignen Gewebeproben zu erkennen, jedoch findet sich darunter kein Locus, der eine präferenzielle Tumor-, oder Normalgewebe-spezifische Transkription aufweist.

## ERGEBNISSE

Auch durch die Einbeziehung einer Quantifizierung der HML-6 Transkription mittels relativer qRT-PCR (vgl. Anhang Abb. 8.6) in die HML-6 Locusbestimmung konnte kein präferenziell tumorspezifisch dysregulierter HML-6 Locus identifiziert werden. Jedoch wird deutlich, dass je nach Patientin nicht nur individuelle Unterschiede im Anteil der einzelnen HML-6 Loci an der Gesamttranskription, sondern auch Unterschiede in der Transkriptionsrate zwischen gesundem und malignem Brustdrüsengewebe, vorliegen. So konnten in je zwei Patientinnen eine Tumor-assoziierte Erhöhung (#4 und #5) bzw. keine Änderungen (#22 und #25) und in einer Patientin eine Tumor-assoziierte Erniedrigung (#12) der HML-6 Transkription zwischen gesundem und malignem Brustdrüsengewebe beobachtet werden (vgl. Anhang Abb. 8.6).

### 4.2.2.2 Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-K(HML-2) Loci in Brustdrüsengewebe

Ausgehend von RNA der Brustdrüsengewebeproben wurde eine HML-2 cDNA-Bibliothek mittels PCR erstellt. Hierfür kam, im Gegensatz zur Amplikon-NGS der Urothelgewebeproben, eine HML-2 *gag*-spezifische Primermischung zum Einsatz, die die Anzahl der als transkriptionell aktiv nachweisbaren HML-2 Loci nochmals erhöhen sollte.

Für die Identifizierung transkriptionell aktiver HERV-K(HML-2) Loci mittels cDNA-Klonierung und Sequenzierung nach Sanger wurde Gewebe von den Brustkrebspatientinnen #3, #5, #8, #9, #22 und #28 gemäß den Daten aus den Microarray-Analysen bzw. absoluten qRT-PCR ausgewählt. Von der Patientin #3 wurden zusätzlich die transkribierten HML-2 Loci einer Lymphknoten-Metastase bestimmt.

**Tabelle 4.9: Mittels cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung identifizierte transkriptionell aktive HML-2 Loci**

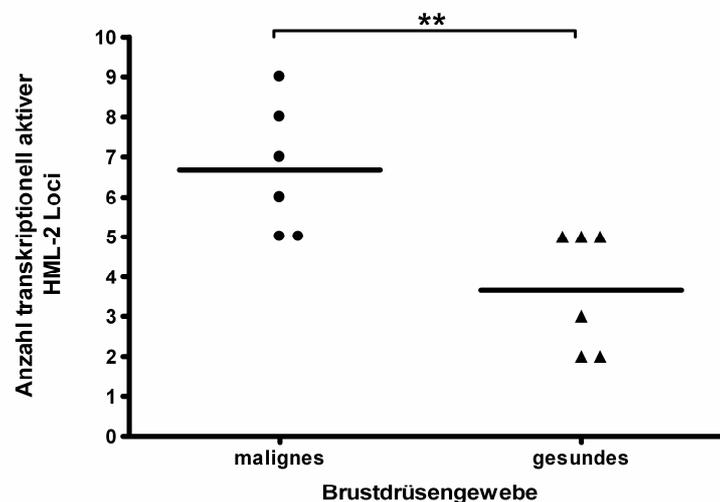
HML-2 Locus	chrom. Bande	Amplikon-Koordinaten Start	Amplikon-Koordinaten Stop	Anteil der Transkripte einzelner HML-2 Loci an der HML-2 Gesamttranskription in % (Anzahl analysierter Klone)													
				#3			#5		#8		#9		#22		#28		
				Normal	Tumor	Metastase	Normal	Tumor									
ERVK-1	1p31.1	75617157	75617734	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERVK-7	1q22	153869885	153870462	-	9,4 (3)	26,5 (9)	29,4 (10)	44,1 (15)	69,7 (23)	70,6 (24)	48,7 (18)	34,4 (11)	62,5 (20)	13,3 (4)	81,8 (27)	19,4 (6)	-
ERVK-18	1q23.3	158928989	158929564	-	-	29,4 (10)	-	2,9 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERVK-2	3p25.3	9868910	9869488	-	-	-	5,9 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERVK-5	3q12.3	102895226	102895803	-	21,9 (7)	20,6 (7)	-	20,6 (7)	-	8,8 (3)	-	9,4 (3)	12,5 (4)	76,7 (23)	3,0 (1)	61,3 (19)	-
ERVK-3	3q13.2	114232604	114233182	-	-	-	-	2,9 (1)	-	2,9 (1)	-	-	18,8 (6)	-	-	-	-
ERVK-4	3q21.2	127093625	127094202	97,2 (35)	9,4 (3)	5,9 (2)	-	-	30,3 (10)	14,7 (5)	37,8 (14)	31,3 (10)	-	3,3 (1)	15,2 (5)	9,7 (3)	-
ERVK-11	3q27.2	186769838	186770436	-	3,1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERVK-10	5q33.3	156024099	156024697	-	9,4 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERVK-9	6q14.1	78490435	78491012	2,8 (1)	-	-	50,0 (17)	-	-	-	-	-	-	9,4 (3)	-	-	3,2 (1)
ERVK-14	7q22.1	104179098	104179696	-	-	-	5,9 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERVK-15	7q34	141100874	141101452	-	6,2 (2)	-	8,8 (3)	8,8 (3)	-	-	8,1 (3)	-	-	-	-	-	-
ERVK-26	8p23.1	12367993	12368503	-	3,1 (1)	-	-	2,9 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2 (1)
ERVK-16	10p14	6913237	6913817	-	-	-	-	17,7 (6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERVK-17	10q24.2	101576298	101576896	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1 (1)	-	-	-	-
ERVK-28	19q12	32827794	32828371	-	-	-	-	-	-	-	2,7 (1)	-	-	3,3 (1)	-	-	-
ERVK-29	19q13.12	42296438	42297026	-	9,4 (3)	14,7 (5)	-	-	-	-	2,7 (1)	3,1 (1)	-	-	-	-	-
ERVK-23	21q21.1	18861622	18862199	-	28,1 (9)	2,9 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERVK-24	22q11.21	17307985	17308582	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2 (1)
		<b>Gesamt</b>		100 (36)	100 (32)	100 (34)	100 (34)	100 (34)	100 (33)	100 (34)	100 (37)	100 (32)	100 (32)	100 (30)	100 (33)	100 (31)	

Gelb: ERVK-5 Locus der eine Tumor-exklusive, bzw. Tumor-assoziiert erhöhte Transkription aufwies. Normal: gesundes Brustdrüsengewebe; Tumor: malignes Brustdrüsengewebe; Metastase: Lymphknotenmetastase

## ERGEBNISSE

Insgesamt konnte die transkriptionelle Aktivität von 19 verschiedenen HML-2 Loci nachgewiesen werden (vgl. Tab. 4.9). Auch hier zeigte sich, dass große individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Patientinnen, die Identität, den Anteil an der Gesamt-HML-2 Transkription und die Anzahl der aktiven HML-2 Loci betreffend, bestehen. So lag die Anzahl der als transkriptionell aktiv nachgewiesenen HML-2 Loci in gesundem Brustdrüsengewebe zwischen zwei (Patientinnen #3 und #8) und fünf (Patientinnen #9 und #22) (vgl. Tab. 4.9).

Mit einer einzigen Ausnahme (Patientin #3) wurde der HML-2 Locus ERVK-7 in Brustdrüsengewebe ubiquitär transkribiert. Vergleicht man die Anzahl der in den Mammakarzinom-Proben aktiven HML-2 Loci mit denen in den dazugehörigen gesunden Brustdrüsengewebe, so zeigt sich eine im Tumor statistisch signifikant erhöhte Anzahl aktiver HML-2 Loci (vgl. Tab. 4.9 und Abb. 4.13).



**Abbildung 4.13: Anzahl der transkriptionell aktiven HERV-K(HML-2) Loci von sechs Brustkrebspatientinnen.**

Die Anzahl der jeweils im malignem und gesundem Brustdrüsengewebe identifizierten aktiven HML-2 Loci ist angegeben. Im Mammakarzinom kommt es zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der aktiven HML-2 Loci (paired student's t-test  $p=0,0077$  (= \*\*)).

Wie aus Abbildung 4.13 ersichtlich, konnten im Schnitt ca. sieben transkriptionell aktive HML-2 Loci im malignem und ca. vier aktive Loci im gesunden Brustdrüsengewebe nachgewiesen werden. Bei Patientin #3 wurden im malignen Brustdrüsengewebe mit 11 aktiven Loci mehr als fünf Mal so viele aktive Loci identifiziert wie im gesunden Brustdrüsengewebe (vgl. Tab. 4.9). Andere Patientinnen, z.B. #22, zeigten hingegen keine Änderung der Gesamtzahl aktiv transkribierter HML-2 Loci zwischen gesundem und malignem Brustdrüsengewebe, jedoch wurden im Tumorgewebe zum Teil andere Loci transkribiert (vgl. Tab. 4.9).

## ERGEBNISSE

Der HML-2 Locus ERVK-5 (vgl. Tab. 4.9 in Gelb) wird bei den Patientinnen #3, #5, #8 und #9 ausschließlich im Tumor transkribiert und zeigt bei den Patientinnen #22 und #28 eine Tumor-assoziiert erhöhte Transkription. Auch in der Lymphknoten-Metastase der Patientin #3 konnte der ERVK-5 Locus, mit einem Anteil von über 20% an der HML-2 Gesamttranskription, als besonders aktiv nachgewiesen werden. Bezieht man die Transkriptionsraten der einzelnen aktiven Loci auf die, mit Hilfe der absoluten qRT-PCR durchgeführten Quantifizierung der gesamten HML-2 Transkription (vgl. Anhang Abb. 8.6), so bestätigt sich die tumorspezifische bzw. Tumor-assoziiert erhöhte Transkription des ERVK-5 Provirus. Selbst in Patientin #28, in der eine deutliche Minderung der HML-2 Gesamttranskription im Mammakarzinom im Vergleich zum gesunden Brustdrüsengewebe nachgewiesen wurde, ist die ERVK-5 Transkription im Vergleich zum gesunden Gewebe erhöht (vgl. Anhang Abb. 8.7).

### 4.2.3 Charakterisierung des HERV-K(HML-2) ERVK-5 Locus

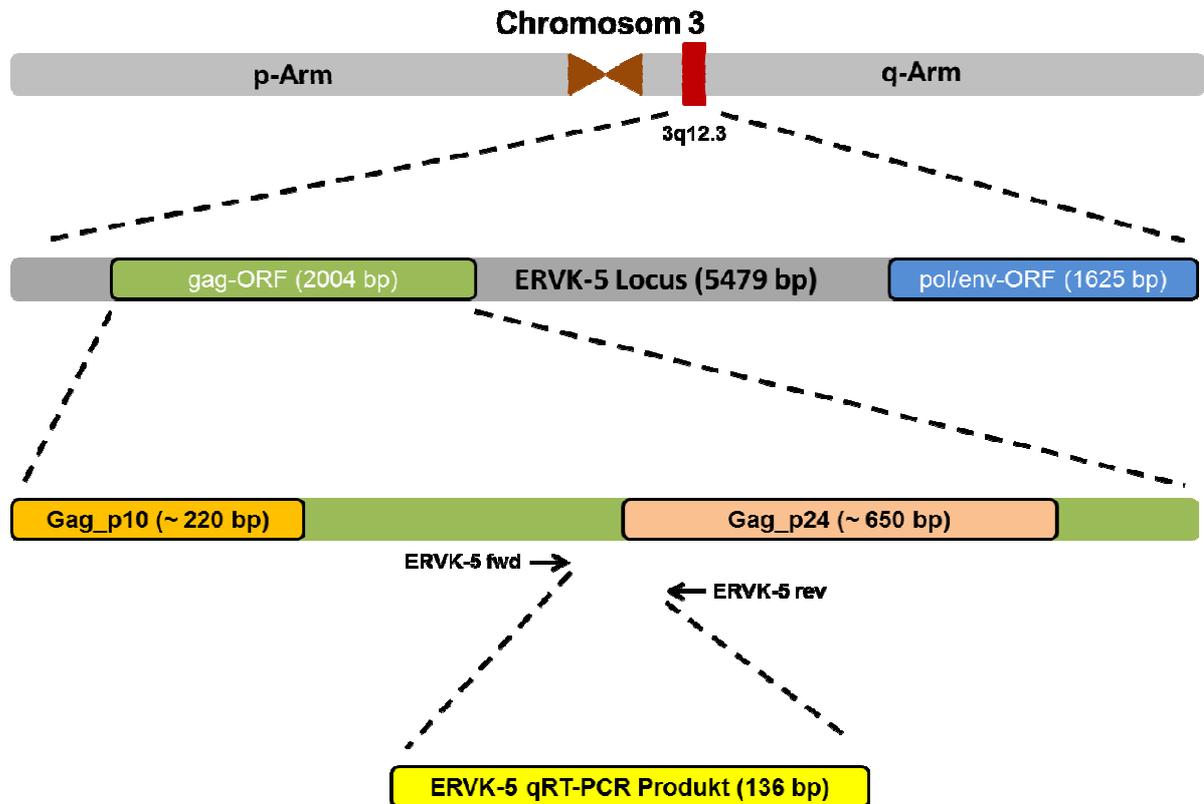
Da der HERV-K(HML-2) Locus in der Locusbestimmung mittels cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung eine Brustdrüsentumor-assoziierte Transkription aufwies, wurde dieser eingehender charakterisiert.

#### 4.2.3.1 Chromosomale Lokalisierung und ORF-Analyse des HERV-K(HML-2) ERVK-5 Locus

Zuerst wurde die genaue Lage des ERVK-5 Locus im Genom eingehender untersucht. Das 5479 bp lange Element befindet sich auf Chromosom 3q12.3 und wird ca. 14kb „downstream“ vom „Homo sapiens phosducin-like 3 pseudogene (LOC285359)“, einem ncRNA-Gen, und ca. 11 kb „upstream“ vom 60S ribosomalen Protein L24 (RPL24) flankiert. Eine detaillierte Analyse der ORFs mit dem ORF-Finder (Open Reading Frame Finder; NCBI) ergab, dass die ERVK-5 Sequenz zwei längere ORFs enthält. Ein Aminosäuren-Sequenzvergleich mit der Swiss-prot Proteindatenbank mittels Protein Blast zeigte, dass der kürzere ORF, mit einer Länge von 1625bp, aus *pol* bzw. *env* Protein-ähnlichen Sequenzen besteht. Der längere, 2004 bp lange ORF besitzt hohe Sequenzähnlichkeiten mit konservierten retroviralen *gag*-Domänen (*Gag\_p10* und *Gag\_p24*) (vgl. Abb. 4.14). Ein Sequenzvergleich dieses ORFs mit weiteren Vertretern der HERV-K(HML-2) Gruppe bestätigte, dass es sich hierbei um einen *gag*-ORF handelt, der jedoch teilweise hohe

## ERGEBNISSE

Sequenzunterschiede zu gut erhaltenen *gag*-ORFs, wie z.B. von HERV-K(HML-2) K115 aufweist (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.14: Schematischer Überblick über die chromosomale Lokalisierung des ERVK-5 Locus, sowie der ORF-Analyse.**

Abgebildet sind die Lage des ERVK-5 Locus auf Chromosom 3q12.3, sowie die zwei identifizierten *gag*- bzw. *pol/env*-ORFs. Zudem sind die Domänen (Gag\_p10/Gag\_p24) des *gag*-ORFs eingezeichnet. Des Weiteren sind die Bindestellen des ERVK-5 forward und reverse Primer (ERVK-5 fwd/rev) (vgl. Abschnitt 2.1.2.4.2), die für eine absolute qRT-PCR verwendet wurden, gezeigt. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

### 4.2.3.2 Quantifizierung der HERV-K(HML-2) ERVK-5 Transkription in Brustdrüsengewebe mittels absoluter qRT-PCR

Um eine Quantifizierung der HERV-K(HML-2)-ERVK-5 Transkripte zu ermöglichen, wurden ERVK-5 spezifische Primer designt, die im *gag*-ORF lokalisiert sind (vgl. Abb. 4.14). Die Primer-Spezifität wurde durch eine Amplikon-Sequenzierung nach Sanger zunächst überprüft. Hierfür wurde vorher mit ERVK-5 spezifischen qRT-PCR Primern eine konventionelle PCR, analog zu der PCR, die bei der Generierung der HML-2/HML-6 cDNA-Bibliothek für die Locusbestimmung mittels cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung zum Einsatz kam, durchgeführt. Als Matrize wurde sowohl genomische DNA, als auch cDNA

## ERGEBNISSE

verwendet. Die Amplifikate wurden anschließend aufgereinigt, in den pGEM-T Vektor mittels TA-Klonierung ligiert, in *E.coli* transformiert, eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt und abschließend präparierte Plasmide mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Da eine Analyse von 20 Klonen nur die Amplifikation des gewünschten ERVK-5 Abschnittes zeigte, wurde davon ausgegangen, dass die ERVK-5 qRT-PCR Primer spezifisch für ERVK-5 sind (Daten nicht gezeigt).

Mithilfe dieser spezifischen ERVK-5 qRT-PCR Primer wurde eine absolute qRT-PCR derselben 40 Brustkrebspatientinnen wie unter 4.2.1.2 durchgeführt. Dabei wurde analog zur absoluten Quantifizierung der HML-2 Transkripte, jeweils das gesunde und das dazugehörige maligne Brustdrüsengewebe derselben Patientin miteinander verglichen. Die Ergebnisse der absoluten ERVK-5 Gag-Quantifizierungen sind in der Abbildung 4.15 A und B dargestellt.

**Abbildung 4.15 (auf der nächsten Seite): Quantifizierung der HERV-K(HML-2)-ERVK-5 Transkriptzahlen in gesundem und malignem Brustdrüsengewebe mittels absoluter qRT-PCR.**

**A: Absolute HERV-K(HML-2)-ERVK-5 gag-Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA.**

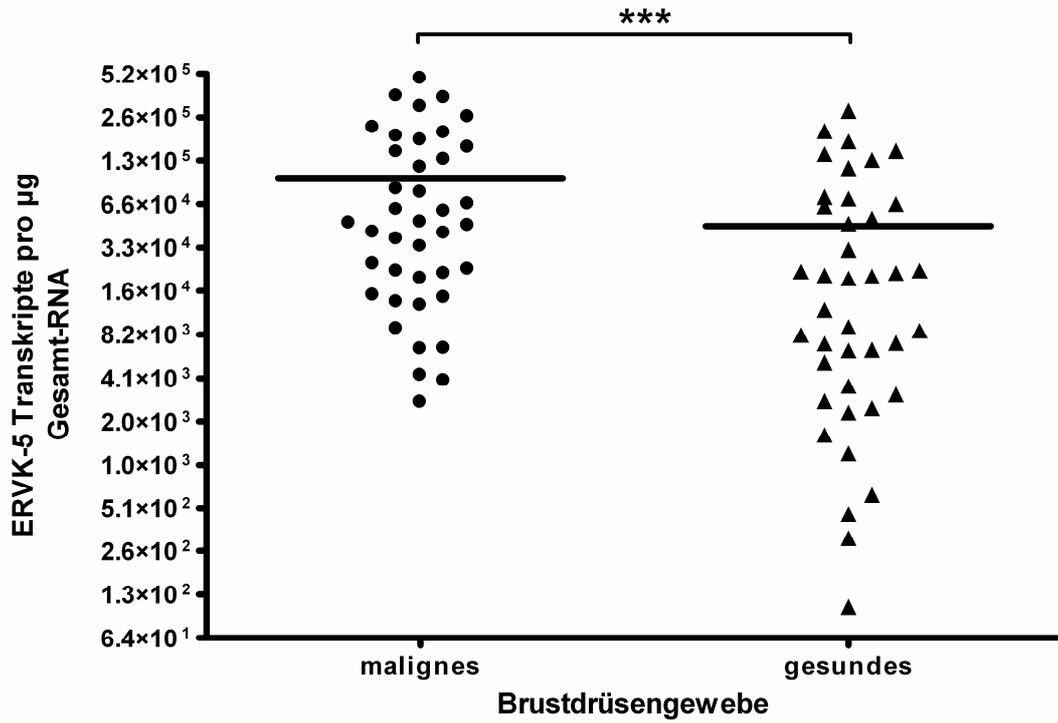
Dargestellt sind die per Plasmid-Standardkurve berechneten ERVK-5 Transkriptzahlen pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA, aufgeteilt nach malignem und gesundem Brustdrüsengewebe. Insgesamt wurden 40 Brustdrüsentumorpatientinnen untersucht. Der statistische Unterschied, zwischen den Transkriptzahlen ist signifikant ( $p = 0,0001 = ***$ ). Zur Berechnung wurde der paired student's t-test angewendet, damit die Zusammengehörigkeit von gesunder und maligner Gewebeprobe aus einer Patientin berücksichtigt werden konnte.

**B: Relative Darstellung der Unterschiede der HERV-K(HML-2)-ERVK-5 Transkription zwischen gesundem und malignem Brustdrüsengewebe von 40 Patientinnen.**

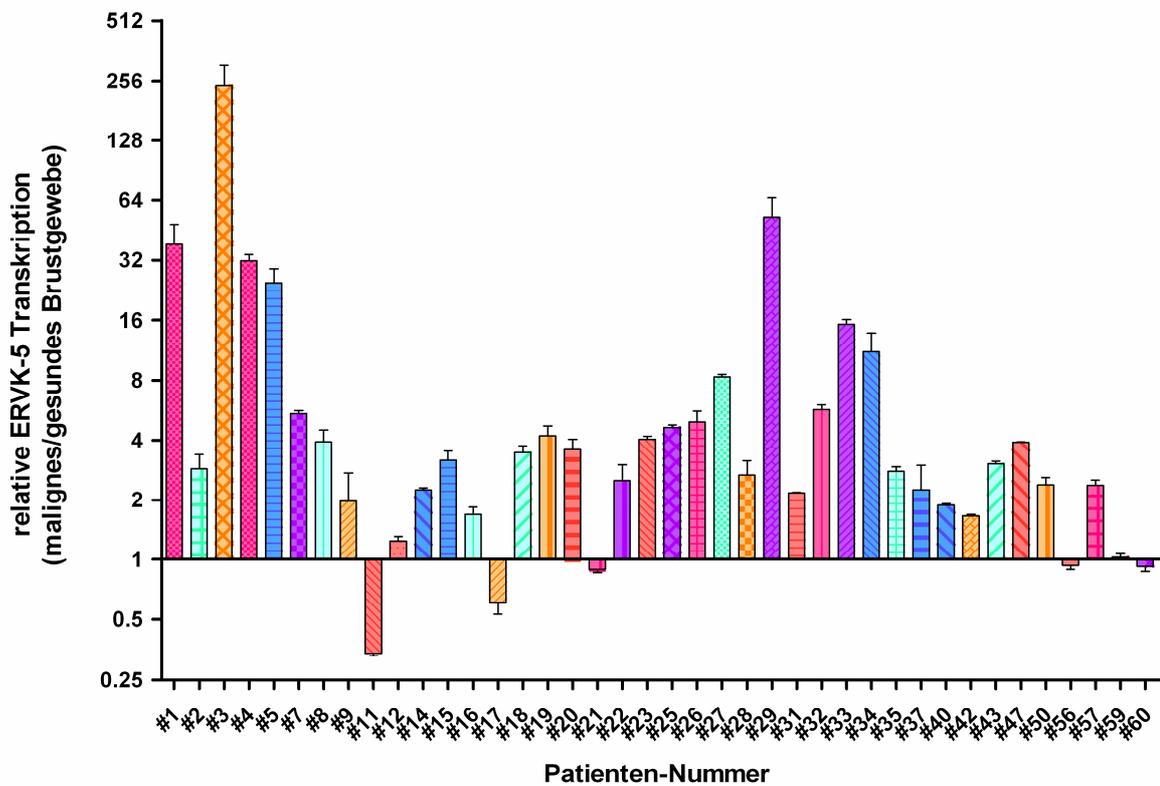
Dargestellt ist der Quotient der ERVK-5 Transkriptzahlen (aus A) von malignem und gesundem Brustdrüsengewebe nach Patientinnennummer aufgeschlüsselt. X-Achsen Werte über 1,5 wurden als eine Tumor-assoziiert erhöhte ERVK-5 Transkription, Werte unter 0,75 als Tumor-assoziiert erniedrigte ERVK-5 Transkription festgelegt. Werte zwischen 0,75 und 1,5 werden als nicht signifikanter individueller Schwankungsbereich angesehen. Zusätzlich ist für jeden relativen Wert die Standardabweichung angegeben, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $y \geq 3$ ) berechnet wurde.

ERGEBNISSE

A



B



## ERGEBNISSE

Wie aus Abbildung 4.15 A ersichtlich, konnte im Brustdrüsentumorgewebe mit ca.  $1,0 \times 10^5$  ERVK-5 Transkripten pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA im Vergleich zu ca.  $4,6 \times 10^4$  Transkripten im gesunden Brustdrüsen-Gewebe, eine im Schnitt ca. 2,2 fache Tumor-assoziierte Erhöhung der ERVK-5 Transkripte festgestellt werden. Die statistische Analyse mittels paired student's t-test, der die Berücksichtigung der Zusammengehörigkeit von gesunder und maligner Gewebeprobe ermöglicht, bestätigte eine statistisch hoch signifikante Erhöhung der ERVK-5 Transkriptzahlen im Tumor im Vergleich zum jeweils dazugehörigen gesunden Brustdrüsen-Gewebe ( $p = 0,0001 = ***$ ). Zudem konnten deutliche individuelle Unterschiede in der ERVK-5 Transkription zwischen den einzelnen Patientinnen verzeichnet werden. So unterscheiden sich die absoluten ERVK-5 Transkriptzahlen zwischen einzelnen Patientinnen teilweise um mehr als  $1 \times 10^3$  Transkripte (vgl. Abb. 4.15 A).

Fünf Patientinnen (= 12,5%) zeigten keine nennenswerte Änderung der ERVK-5 Transkriptzahlen und nur bei zwei Patientinnen (= 5%) konnten im Mammakarzinom geringere Transkriptzahlen als im gesunden Brustdrüsen-Gewebe detektiert werden.

Generell konnte jedoch in ca. 33 der 40 (~82,5%) untersuchten Mammakarzinom-Patientinnen eine Erhöhung der ERVK-5 Transkriptzahlen zwischen gesundem und malignem Brustdrüsen-Gewebe festgestellt werden (vgl. Abb. 4.15 B, relative Werte über 1,5). Dabei zeigten einige Patientinnen, wie z.B. #1, #29 und #3 einen Krebs-assoziierten Anstieg der absoluten ERVK-5 *gag*-Transkriptzahlen um einen Faktor von über 30 bis zu 243 ( vgl. Abb. 4.15 B).

Diese Daten bestärken die Annahme, dass der ERVK-5 Locus als potentieller Tumormarker, bzw. als Tumorantigen in Frage kommen könnte.

### **4.2.4 Verknüpfung klinischer Tumorparameter mit Ergebnissen der HERV-K(HML-2) und HERV-K(HML-2) ERVK-5 Transkription**

Die absolute Quantifizierung der HML-2 *gag* und der ERVK-5 *gag*-Transkripte zeigte zwar eine Tumor-assoziiert signifikante Erhöhung der Transkripte (vgl. 4.2., 1.2 und 4.2.3.2), jedoch konnten auch teilweise deutliche individuelle Unterschiede im Grad der Aktivierung der Transkription im Zuge einer malignen Transformation des Brustdrüsen-Gewebes zwischen den einzelnen Patientinnen detektiert werden (vgl. Abb. 4.12 B, 4.15 B). Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität der HML-2/ERVK-5 Transkription individuellen Einflüssen/Faktoren unterliegt.

Die Ursache für die Entstehung von Tumoren ist vielfältig, was sich auch in den unterschiedlichen Eigenschaften, anhand derer Tumoren klassifiziert werden, widerspiegelt.

## ERGEBNISSE

Aufgrund dessen ist es denkbar, dass bestimmte Eigenschaften von Tumoren die Transkription von HML-2/ERVK-5 beeinflussen bzw. in Verbindung mit dem Grad der HML-2/ERVK-5 Transkription stehen könnten.

Um mögliche Zusammenhänge zu untersuchen, wurden diverse Tumorparameter (HER2-Rezeptorstatus, TNM-Klassifikation, RLV-Einstufung, assoziiertes DCIS, multifokaler und multizentrischer Status) als auch Patientinneninformationen wie Alter und BMI mit den Daten aus den absoluten HML-2/ERVK-5 qRT-PCR Analysen verglichen. Im Folgenden werden nur statistisch signifikante Beobachtungen aufgeführt.

### **4.2.4.1. Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus in Brustdrüsengewebe**

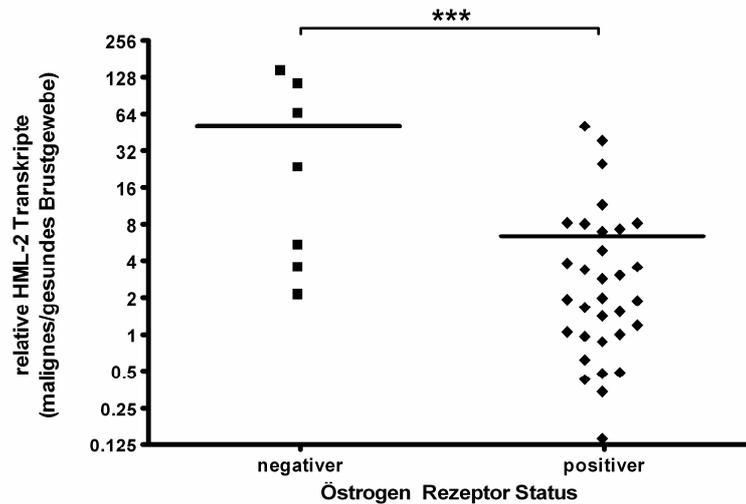
Für die Brustkrebsdiagnostik wichtige Tumorparameter sind der Progesteron- und Östrogenrezeptorstatus. Diese werden anhand einer immunhistologischen Färbung von Tumorzellen einer/s Biopsie/Gewebeschnittes bestimmt. Je nach prozentualem Anteil von gefärbten, also Rezeptor-positiven Zellen innerhalb der Biopsie/Gewebeschnittes und der Intensität der Färbung wird ein sogenannter "immunoreaktiver Score" (IRS) bestimmt. Dabei gilt ein Tumor mit einem IRS von 0-2 als negativ, 3-4 als schwach, 6-8 als mäßig und 9-12 als stark positiv für den entsprechenden Rezeptor.

Da unter den 40 mittels absoluten qRT-PCR untersuchten Brustkrebspatientinnen nicht für jede der vier IRS-Einteilungen genügend Patientinnen zur Verfügung standen, wurden die Patientinnen jeweils nur in Rezeptor-positiv (IRS = 3-12) und Rezeptor-negativ (IRS = 0-2) eingeteilt.

#### **4.2.4.1.1 Östrogenrezeptorstatus in Verbindung mit der HERV-K(HML-2) Transkription**

Eine Analyse der möglichen Assoziation zwischen der HML-2 Transkription und dem Östrogenrezeptorstatus zeigte, dass Rezeptor-negative Mammakarzinome einen im Schnitt stärkeren Anstieg der HML-2 Transkriptzahlen im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Brustdrüsengewebe aufweisen, als Rezeptor-positive Tumoren. Nach einer statistischen Auswertung mit dem student's test konnte ein statistisch signifikant stärkerer Anstieg der HML-2 Transkription in Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomen bestätigt werden (vgl. Abb. 4.16).

## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.16: Vergleich der HERV-K(HML-2) Transkriptzahlen mit dem Östrogenrezeptorstatus.**

Dargestellt sind die relativen HML-2 Transkriptionsänderungen (aus Abb. 4.12) zwischen malignem und gesundem Brustdrüsengewebe aufgeteilt nach Östrogenrezeptorstatus. Brustkrebspatientinnen mit einem IRS Score von 0-2 wurden als Rezeptor-negativ, Patientinnen mit einem Score von 3-12 als Rezeptor-positiv eingestuft. Der statistische Unterschied ist signifikant (student's t-test,  $p = 0,0002 = ***$ ).

Für die Transkription des ERVK-5 Locus konnte keine statistisch signifikante Assoziation zum Östrogenrezeptorstatus festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

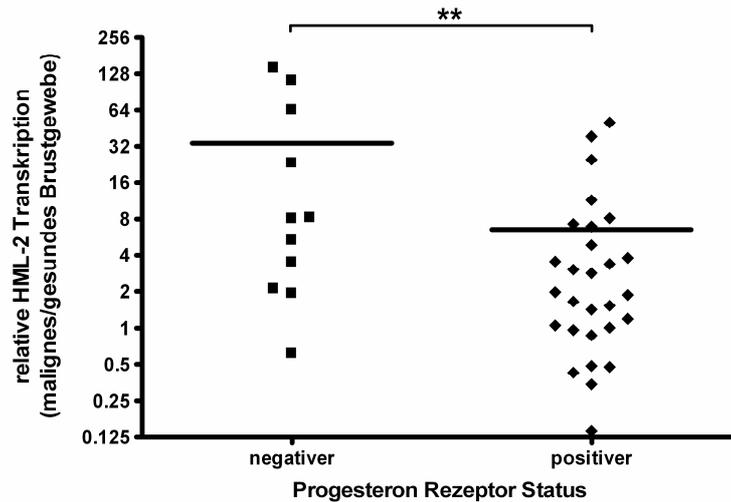
### 4.2.4.1.2 Progesteronrezeptorstatus in Verbindung mit der HERV-K(HML-2) Transkription

Ein Vergleich des Progesteronrezeptorstatus mit den Ergebnissen aus der absoluten HML-2 qRT-PCR zeigte, dass Patientinnen, deren Tumoren Progesteronrezeptor-negativ sind, im Schnitt einen statistisch signifikant stärkeren Anstieg der HML-2 Transkriptwerte im Tumorgewebe als im gesunden Gewebe aufweisen (vgl. Abb.4.17,  $p = 0,0095 = **$ ). Aufgrund der relativ geringen Anzahl an Patientinnen konnten keine Korrelationsanalysen oder die Einteilung in alle vier IRS Kategorien durchgeführt werden.

**Abbildung 4.17 (auf der nächsten Seite): Vergleich der HERV-K(HML-2) Transkriptzahlen mit dem Progesteronrezeptorstatus.**

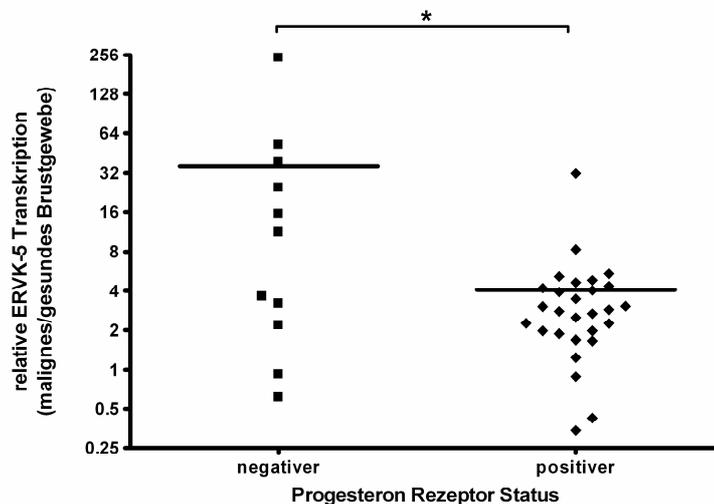
Dargestellt ist die relative HML-2 Transkription errechnet aus dem Quotienten der absoluten HML-2 Transkriptzahlen von malignem und gesundem Brustdrüsengewebe (aus Abb. 4.12) aufgeteilt nach Progesteronrezeptorstatus. Brustkrebspatientinnen mit einem IRS Score von 0-2 wurden als Rezeptor-negativ, Patientinnen mit einem Score von 3-12 als Rezeptor-positiv eingestuft. Der statistische Unterschied ist signifikant (student's t-test,  $p = 0,0095 = ***$ ).

## ERGEBNISSE



### 4.2.4.1.3 Progesteronrezeptorstatus in Verbindung mit der ERVK-5 Transkription

Auch für den ERVK-5 Locus konnte ein statistisch signifikant stärkerer Transkriptionsanstieg in Progesteronrezeptor-negativen Tumoren nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.18 student's t-test,  $p = 0,0206 = *$ ).



**Abbildung 4.18: Vergleich der HERV-K(HML-2)-ERVK-5 Transkriptzahlen mit dem Progesteronrezeptorstatus.**

Dargestellt ist die relative ERVK-5 Transkription errechnet aus dem Quotienten der absoluten ERVK-5 Transkriptzahlen von malignem und gesundem Brustdrüsengewebe (aus Abb. 4.15) aufgeteilt nach Progesteronrezeptorstatus. Brustkrebspatientinnen mit einem IRS Score von 0-2 wurden als Rezeptor-negativ, Patientinnen mit einem Score von 3-12 als Rezeptor-positiv eingestuft. Der statistische Unterschied ist signifikant (student's t-test,  $p = 0,0206 = *$ ).

## 5. Diskussion

Die Beobachtung, dass in Säugetieren endogene Retroviren mit onkogenem Potential existieren wie MLV (Maus Leukämie Virus), MMTV (Maus Mamma Tumor Virus), JSRV (Jaagsiekte Schaf Retrovirus) und KoRV (Koala Retrovirus), legt nahe, dass auch die im menschlichen Genom enthaltenen HERV-Elemente eine tumorfördernde Wirkung besitzen könnten (Palmarini *et al.* 1999, Tarlinton *et al.* 2006, Indik *et al.* 2007, Review: Tai *et al.* 2008). In der Tat können in mehreren Studien HERVs mit verschiedenen malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Review: Ruprecht *et al.* 2008, Review: Romanish *et al.* 2010, Review: Hohn *et al.* 2013, Review: Katoh *et al.* 2013). Die am häufigsten mit Tumorerkrankungen assoziierte HERV-Gruppe ist die HERV-K(HML-2) Gruppe. Häufig kann in Melanomen, Ovarialkarzinomen, Keimbahnzelltumoren, Lymphomen, Prostatakarzinomen aber auch Mammakarzinomen eine erhöhte HML-2 RNA-Transkription, Protein-Expression oder auch RT-Aktivität detektiert werden (Boller *et al.* 1993, Gotzinger *et al.* 1996, Muster *et al.* 2003, Buscher *et al.* 2005, Tomlins *et al.* 2007, Contreras-Galindo *et al.* 2008). Seltener wurde die Produktion von nicht-infektiösen Retrovirus-ähnlichen Partikeln in Tumoren oder Tumorzelllinien der Haut, der Brust und des Blutes nachgewiesen (Seifarth *et al.* 1995, Muster *et al.* 2003, Hirschl *et al.* 2007, Contreras-Galindo *et al.* 2008). Aber auch die verstärkte Expression von Proteinen anderer HERV-Gruppen wie HERV-H, HERV-E, oder HERV-W konnte in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Menendez *et al.* 2004, Wang-Johanning *et al.* 2007, Wentzensen *et al.* 2007, Alves *et al.* 2008). Dabei ist bis heute nicht geklärt, ob eine erhöhte Transkription und Expression von HERV-Elementen ursächlich für die Entstehung von Tumoren ist, die Entstehung von Tumoren begünstigt oder nur eine Begleiterscheinung aberranter Zellen ist. Dennoch wird eine mögliche Verwendung von HERV-Transkripten oder auch HERV-Proteinen als Tumormarker, oder als Antigen für eine Anti-Krebstherapie diskutiert. Tatsächlich konnten Wang-Johanning *et al.* bereits im Serum von DCIS-Patientinnen („duktalen Karzinoma *in situ*“ = eine Vorstufe von Brustkrebs), im Vergleich zu gesunden Frauen sowohl signifikant erhöhte HML-2 Antikörper-Titer als auch erhöhte env-Transkriptzahlen nachweisen (Wang-Johanning *et al.* 2014). Ebenso konnten in Tumoren, die eine erhöhte HERV-Expression zeigten, gegen HERV-Proteine gerichtete Antikörper oder sogar HERV-Protein-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (Wang-Johanning *et al.* 2008). Kleiman *et al.* identifizierten Anti-HML-2-Gag und Anti-HML-2-Env Antikörper in Keimbahnzelltumoren (Kleiman *et al.* 2004). HML-2-Antigene können auch eine Immunantwort auslösen und HML-2-spezifische zytotoxische T-Zellen gezielt HML-2-Antigen-präsentierende Zellen lysieren (Wang-Johanning *et al.* 2008). Zusammenfassend

## DISKUSSION

führen diese Beobachtungen zu dem Schluss, dass HERVs als Tumor-Biomarker für diagnostische Anwendungen, oder als Antigen für eine Anti-Krebstherapie in Frage kommen könnten.

Ob generell alle HERV-Elemente einer bestimmten HERV-Gruppe, oder nur gezielt einzelne HERV-Loci innerhalb bestimmter HERV-Gruppen in Tumoren verstärkt transkribiert oder exprimiert werden ist noch unklar.

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob einzelne HERV-Loci identifizierbar sind, die in malignem Brustdrüsen- bzw. Urothelgewebe eine erhöhte Transkription aufweisen und daher das Potential besitzen als diagnostischer Tumormarker und/oder Antigen für eine Anti-Krebstherapie zu dienen.

### **5.1 Trend zu einer in malignem Urothelgewebe verminderten HERV-Transkription**

Durch die Erstellung von HERV-Transkriptionsprofilen mittels HERV-spezifischen Microarray-Analysen von gesundem und malignem Urothelgewebe mehrerer PatientenInnen sollten HERV-Gruppen identifiziert werden, deren Transkription bei einer malignen Transformation dysreguliert ist. Bereits die Arbeitsgruppe von Gosenca *et al.* publizierte ein, mittels desselben HERV-spezifischen Microarrays erstelltes, HERV-„Core“-Transkriptionsprofil (Gosenca *et al.* 2012), das beschreibt welche HERV-(Sub)Gruppen in Urothelgewebe ubiquitär transkribiert werden. Ein Vergleich des Gosenca Core-Profiles mit den Daten aus dieser Arbeit zeigt, dass sich diese Daten hier nur zum Teil reproduzieren ließen. Einige von Gosenca *et al.* als für Urothelgewebe ubiquitär transkribiert beschriebenen HERV-(Sub)Gruppen wie HERV-E(4-1), HERV-W, HERV-Rb und HERVK-T47D waren in einigen PatientenInnen transkriptionell aber nicht ubiquitär aktiv. Umgekehrt waren hier die HERV-(Sub)Gruppen Seq59, Seq26, Seq34, HML-3, SLE66676, Seq10 und Seq38 ubiquitär aktiv, bei Gosenca *et al.* konnte nur in einem Teil der PatientenInnen deren Transkripte nachgewiesen werden. Gründe für diese Unterschiede könnten auf die, in der Publikation von Gosenca *et al.* relativ geringe Anzahl von untersuchten PatientenInnen (13 PatientenInnen) im Vergleich zu den hier untersuchten 28 PatientenInnen zurückzuführen sein.

Ähnlich wie in der Studie von Gosenca *et al.* zeigen sich auch in dieser Arbeit deutliche individuelle Unterschiede bezüglich der transkriptionell aktiven HERV-(Sub)Gruppen, was aber als Merkmal der HERV-Transkription in menschlichem Gewebe gilt (Frank *et al.* 2005, Frank *et al.* 2008, Haupt *et al.* 2011). Individuelle Unterschiede in der HERV-Transkription

## DISKUSSION

könnten auf verschiedene epigenetische Modifikationen wie Methylierungsmuster oder Chromatinmodifizierungen im Bereich einzelner HERV-LTRs oder den Locus-flankierenden DNA-Abschnitten zurückzuführen sein (Khodosevich *et al.* 2004, Lavie *et al.* 2005, Review: Huang *et al.* 2014, Diem *et al.* unpubliziert).

Obwohl häufig in Tumorerkrankungen eine erhöhte HERV-Transkription beobachtet wurde (Review: Ruprecht *et al.* 2008, Review: Romanish *et al.* 2010, Review: Kassiotis 2014), konnte hier für Tumoren des Urothels eine tendenziell reduzierte HERV-Transkription im Vergleich zu dem jeweiligen korrespondierenden gesunden Urothelgewebe beobachtet werden. So zeigten die meisten, mittels Microarray analysierten HERV-(Sub)Gruppen in über 25% (bis hin zu über 50%) der PatientInnen eine im Tumor erniedrigte Transkription. Die Quantifizierung der absoluten HERV-K(HML-2) Transkriptzahlen aller 28 UrothelkarzinompatientInnen bestätigte, ebenso wie die absolute Quantifizierung der HERV-W, ERV-9 und HERV-K(HML-6) Transkriptzahlen für das mit einer Amplikon-NGS untersuchte Gewebe von fünf Patienten, einen Trend zu einer im Tumorgewebe generell verminderten HERV-Transkription. Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen von Gosenca *et al.* (Gosenca *et al.* 2012).

Eine maligne Transformation von Zellen des Urothels hat zur Folge, dass eine ganze Reihe von zellulären Genen, unter denen sich neben Transkriptionsfaktoren auch regulatorische RNAs (miRNAs) und epigenetische Remodellingfaktoren befinden können, aberrant transkribiert werden (Riester *et al.* 2012, Review: Kim *et al.* 2008, Review: Izquierdo *et al.* 2014). Hierdurch könnte es als Nebeneffekt zur Änderung der Transkription einzelner HERV-Elemente kommen, die in den meisten Fällen letztendlich nur die aberrante Transkription der zellulären Gene innerhalb der Tumorzelle widerspiegelt und nicht zwingend für eine aktive Beteiligung von HERV-Elementen an der Tumorentstehung spricht.

Häufig wird in Tumoren eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Hypermethylierung beobachtet (Review: Ehrlich 2002, Review: Choi *et al.* 2013). Gerade in Urothelkarzinomen scheint eine Hypermethylierung der Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen wie RASSF1A, APC und MGMT häufiger aufzutreten (Bilgrami *et al.* 2014). Als Folge dessen könnte auch die Transkription benachbarter HERV-Loci in Urothelkarzinomen epigenetisch reprimiert werden. Dies könnte die tendenziell verminderte HERV-Transkription im Urothelkarzinom erklären.

Allerdings wurde eine Tumor-assoziierte Hypomethylierung von HERV-Elementen in verschiedenen Tumoren beschrieben (Szpakowski *et al.* 2009, Stengel *et al.* 2010). Auch in Urothelkarzinomen konnten Florl *et al.* reduzierte Methylierungslevel der HERV-K Gruppe detektieren (Florl *et al.* 1999). HERV-Elemente können somit infolge unterschiedlicher

Methylierungsmuster je nach Tumorart oder Tumorstadium unterschiedlich transkribiert bzw. exprimiert werden.

### **5.2 Kein präferenziell tumorspezifisch aktiver ERV-9, HERV-W, HERV-K(HML-6) oder HERV-K(HML-2) Locus in Urothelgewebe identifizierbar**

Die Daten aus der Identifizierung der transkriptionell aktiven ERV-9, HERV-W, HML-2 und HML-6 Loci in gesundem und malignem Urothelgewebe zeigen, dass es zu individuell unterschiedlich transkribierten Loci sowohl zwischen einzelnen Patienten als auch bei einem Patienten zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe kommen kann.

Für die ERV-9 Gruppe konnten sehr viele transkriptionell aktive Loci identifiziert werden, von denen insgesamt 21 in Urothelgewebe ubiquitär transkribiert sind. Dabei zeigten alle fünf Patienten ein ähnliches Aktivitätsmuster, wobei die Loci 2q33.2, 6p22.3 und 11q21 in allen Gewebeproben am stärksten transkribiert werden. Bisher existieren kaum Informationen über einzelne transkriptionell aktive ERV-9 Loci. In dieser Arbeit wurde erstmalig eine detaillierte und umfangreiche Analyse transkriptionell aktiver proviraler ERV-9 Loci durchgeführt.

Eine erhöhte ERV-9 Transkription wurde bisher nur im Serum/Plasma, in B-Zellen oder Gehirnproben von PatientInnen mit Multipler-Sklerose, oder nach Infektion mit exogenen Retroviren wie CMV beobachtet (Review: Clausen 2003, Assinger *et al.* 2013). Man nimmt an, dass eine Aktivierung der ERV-9 Transkription in diesen Zellen auf ein inflammatorisches Milieu zurückzuführen ist (Review: Clausen 2003, Assinger *et al.* 2013). Tatsächlich spielen Entzündungsvorgänge in malignen Urothelkarzinomen eine bedeutende Rolle, wie die Existenz einer ganzen Reihe von möglicherweise prognostisch relevanten Entzündungs-Biomarkern für Blasenkarzinome zeigen (Metaanalyse: Masson-Lecomte *et al.* 2014). Die hier gezeigten ERV-9 Daten deuten jedoch eher daraufhin, dass zumindest keine Tumortypische Dysregulation der Transkription spezifischer ERV-9 Loci in malignem Urothelgewebe im Vergleich zu gesundem Urothelgewebe vorliegt. Dennoch konnte zumindest bei zwei der fünf Urothelkarzinompatienten ein teilweise drastischer Anstieg der ERV-9 Gesamttranskription im Tumorgewebe detektiert werden, wodurch folglich auch die Transkription einer Vielzahl verschiedenster ERV-9 Loci in den Patienten ansteigt. Vermutlich sind die Tumoren zu heterogen mit individuell unterschiedlichen Gegebenheiten/Dysregulationen, die einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Transkription einzelner ERV-9 Loci oder der gesamten ERV-9-Transkription haben können.

## DISKUSSION

Möglicherweise ist die Zahl der untersuchten Gewebeproben einfach zu gering um ein Transkriptionsmuster zu erkennen.

Für die HERV-K(HML-6) Gruppe konnte ähnlich wie für die ERV-9 Gruppe in Urotheltumoren keine spezifisch dysregulierte Transkription von Loci detektiert werden. Insgesamt wurden sechs in Urothelgewebe ubiquitär transkribierte HML-6 Loci nachgewiesen. Bisher ist relativ wenig über die Transkription von HML-6 in Tumorgewebe bekannt. Frank *et al.* konnten zeigen, dass zumindest in einem Teil von Brustkrebspatientinnen eine tumorspezifisch erhöhte HML-6 Transkription vorliegt (Frank *et al.* 2008). Über transkriptionell aktive HML-6 Loci in Urothelgewebe war bisher nichts bekannt.

Auch für die HERV-W Gruppe konnten keine präferenziell tumorspezifisch transkribierten Loci identifiziert werden. Interessanterweise kodieren die Env-Genabschnitte zweier hier als ubiquitär transkribiert nachgewiesener HERV-W Loci für Syncytin-1 (ERVW-1 bzw. ERVWE-1) und für ERVW-2 (bzw. ERVWE-2). Syncytin-1, welches im *env*-Abschnitt des HERV-W Locus auf Chromosom 7q21.2 liegt, ist für die Entwicklung der Plazenta maßgeblich verantwortlich, indem es für die Fusion von Zytotrophoblasten, die die Syncytiotrophoblasten-Schicht bilden, verantwortlich ist (Blond *et al.* 1999, Mi *et al.* 2000, Frendo *et al.* 2003). Eine tumorfördernde Wirkung von Syncytin-1 wird aufgrund seiner Zellfusionseigenschaft vermutet, da in vielen verschiedenen Tumorerkrankungen wie colorektalem, testikulärem, endometrialem und ovariellen Krebsgewebe erhöhte mRNA- und Proteinlevel von Syncytin-1 nachgewiesen werden konnten (Menendez *et al.* 2004, Bjerregaard *et al.* 2006, Strick *et al.* 2007, Larsen *et al.* 2009, Maliniemi *et al.* 2013, Review: Huang *et al.* 2014). Eine Tumor-assoziierte Aktivierung des Syncytin-1 scheint dennoch nur in bestimmten Tumoren oder bestimmten Tumorstadien aufzutreten, weshalb eine tumorfördernde Wirkung Syncytin-1 umstritten ist (Larsen *et al.* 2009, Strissel *et al.* 2012, Review: Huang *et al.* 2014). Eine Auswirkung von Syncytin-1 auf die Entstehung von Urothel-Karzinomen ist bisher nicht bekannt. Auch hier zeigt sich keine tumorspezifische Dysregulation der Transkription des Syncytin-1 Locus.

Der HERV-W Locus auf Chromosom Xq22.3 (ERVW-2) kodiert für ein unvollständiges Env-Protein (N-Trnev). Da dieses *ex vivo* exprimiert werden kann, könnte es theoretisch auch *in vivo* gebildet werden. Seine Funktion ist bisher nicht bekannt (Roebke *et al.* 2010). Der Locus konnte als der am stärksten in Urothelgewebe ubiquitär transkribierte nachgewiesen werden, dessen Transkription zeigte jedoch keine präferenzielle Dysregulation zwischen gesundem und malignem Urothelgewebe.

Für die HML-2 Gruppe konnte ebenfalls keine tumorspezifisch dysregulierte Transkription von Proviren identifiziert werden. Trotz der häufig beschriebenen Tumor-assoziiert erhöhten

HML-2 Aktivität in verschiedenen Geweben konnte bislang keine aberrante HML-2 Transkription in Karzinomen des Urothels nachgewiesen werden.

### **5.3 Erhöhte HERV-Aktivität, insbesondere der HERV-K(HML-2) Gruppe, in malignem Brustdrüsengewebe**

Der Vergleich der HERV-Transkriptionsprofile von gesunden und malignen Brustdrüsengewebeproben zeigte, dass 14 HERV-Gruppen in mindestens 25% der Tumorseiten erhöht transkribiert werden. HERV-Gruppen mit reduzierter Aktivität im Tumorgewebe wurden nur in wenigen Ausnahmefällen identifiziert. Dies deutet, anders als im Urothelgewebe, auf eine in malignem Brustdrüsengewebe tendenziell erhöhte HERV-Transkription hin. Die absolute Quantifizierung der HERV-K(HML-2) Gesamttranskription bestätigt diese Beobachtung, da in über 70% der untersuchten Patientinnen erhöhte HML-2 Transkriptwerte nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an aktiven HML-2 Loci im Tumorgewebe verglichen mit gesundem Brustdrüsengewebe festgestellt werden. Dies führt zu dem Schluss, dass es zu einer erhöhten HERV-Transkription im Zuge der malignen Transformation von Brustdrüsengewebe kommt.

Mehrere Publikationen berichteten bereits über eine Brusttumor-assoziiert erhöhte HML-2 *env*-Gesamttranskription und Env-Protein-Expression sowohl in Gewebeproben als auch in Plasma von Patientinnen (Wang-Johanning *et al.* 2001, Wang-Johanning *et al.* 2003, Wang-Johanning *et al.* 2008, Zhao *et al.* 2011, Wang-Johanning *et al.* 2014, Rhyu *et al.* 2014). Ursachen für diese Erhöhung könnten z.B. gewebespezifische Unterschiede im Methylierungsstatus der Zellen sein (Review: Ehrlich 2002, Review: Romanish *et al.* 2010).

Frank *et al.* beschrieben bereits 2007 ein mittels HERV-spezifischen Microarray-Analysen erstelltes HERV-Core-Transkriptionsprofil, welches angibt, welche HERV-Gruppen in Brustdrüsengewebe als generell transkriptionell aktiv gelten (Frank *et al.* 2008). Ein Vergleich der hier erstellten HERV-Transkriptionsprofile mit dem HERV-Core-Transkriptionsprofil von Frank *et al.* zeigt eine relativ hohe Übereinstimmung. So konnten hier die in Brustdrüsengewebe ubiquitär transkribierten HERV-(Sub)Gruppen Seq46, HERV-E(4-1), HERV-K(HML-3), Seq59, ERV9, sowie HML-2 und HML-4 bestätigt werden. Kleinere Abweichungen betreffen die HERV-Fb und die HML-6 (Sub)Gruppe, die nicht in allen gesunden Brustdrüsengewebeproben nachgewiesen werden konnten, sowie die HML-3 und KC4 Gruppen die in dieser Arbeit ubiquitär transkribiert wurden. Auch hier können, wie bereits oben beschrieben, individuelle epigenetische Unterschiede zwischen einzelnen

## DISKUSSION

Patientinnen für diese Abweichungen verantwortlich sein (Khodosevich *et al.* 2004, Lavie *et al.* 2005, Review: Huang *et al.* 2014, Diem unpubliziert).

Frank *et al.* beobachteten eine generell niedrigere HERV-Transkription in Brustdrüsentumorgewebe im Vergleich zu gesundem Brustdrüsengewebe, konnten jedoch auch in einigen Patientinnen mit besonders aggressiven invasiven Tumoren einen Trend zu einer allgemein erhöhten HERV-Transkription feststellen (Frank *et al.* 2008). Dies bestätigt nochmals, dass je nach Art und je nach Typ oder Stadium des Tumors die HERV-Transkription beeinflusst sein kann.

Interessanterweise zeigen HERV-Transkriptionsprofile von Lymphknotenmetastasen eine größere Übereinstimmung mit dem HERV-Transkriptionsprofil ihres primären Tumors, als mit dem des gesunden Brustdrüsengewebes. Dies scheint auf den ersten Blick relativ selbstverständlich zu sein, da letztendlich eine Metastase aus Zellen des primären Tumors entstanden ist, die andere Organe/Gewebe infiltriert haben. Allerdings zeigte sich in den letzten Jahren, dass doch gravierendere (epi)genetische Unterschiede zwischen Metastasen und Primärtumoren existieren, als ursprünglich angenommen. Diese sind wahrscheinlich auf Unterschiede des Selektionsdrucks innerhalb verschiedener umgebender Gewebe zurückzuführen (Review: Klein *et al.* 2009). Dadurch könnten auch die Unterschiede zwischen den HERV-Transkriptionsprofilen von Primärtumor und Metastase erklärt werden, die bei einigen Patientinnen auftraten.

### **5.4 Identifizierung des potentiellen Brustdrüsentumormarkers ERVK-5**

Der Großteil der Publikationen, die eine erhöhte HERV-K(HML-2) Transkription mit Brustkrebs in Verbindungen bringen, können keine detaillierte Aussage darüber treffen welche der ca. 91 bekannten HML-2 Proviren tatsächlich transkriptionell aktiv sind, da nur die HML-2 Gesamttranskription quantifiziert wurde (Wang-Johanning *et al.* 2001, WangWang-Johanning *et al.* 2003, Subramanian *et al.* 2011, Wang-Johanning *et al.* 2014). In dieser Arbeit wurde dagegen untersucht, welche spezifischen proviralen HML-2 Loci für die HML-2 Aktivität verantwortlich sind. Dabei konnte gezeigt werden, dass der HERV-K(HML-2) Locus ERVK-5 eine tumorspezifisch erhöhte, bzw. Tumor-exklusive Transkription aufweist. Absolute Quantifizierungen der ERVK-5 Transkriptzahl in Gewebe von 40 Patientinnen bestätigten weiterhin eine in über 80% der untersuchten Patientinnen vorliegende signifikante Erhöhung der Transkriptzahlen im Mammakarzinom im Vergleich zum gesunden

## DISKUSSION

Brustdrüsengewebe. Diese tumorspezifisch erhöhte Transkription deutet auf eine mögliche Eignung des ERVK-5 Locus als Tumormarker hin.

Möglicherweise führt eine epigenetische Aktivierung des gesamten chromosomalen-Abschnittes, auf dem ERVK-5 lokalisiert ist, zu dessen Aktivierung. Hierfür spricht, dass ca. 11 kb oberhalb des ERVK-5 Locus das 60s ribosomale Protein L24 liegt, dass vor kurzem in über 70% von Brusttumoren, verglichen mit dem gesunden Brustdrüsengewebe, als erhöht transkribiert nachgewiesen werden konnte (Wilson-Edell *et al.* 2014). Eine gezielte Reprimierung der RPL24 Expression in einer Brusttumorzelllinie mittels shRNAs resultierte nicht nur in einer verminderten Lebensfähigkeit der Tumorzellen, sondern auch in einer Reduzierung der eIF4E-regulierten Proteine Cyclin D1, Survivin und NBS1 (Wilson-Edell *et al.* 2014). Dementsprechend ist anzunehmen, dass eine Überexpression RPL24 zu einer verstärkten Translation von tumorfördernden eIF4E-abhängigen Proteinen führt.

Wieso RPL24 eine erhöhte Transkription in den Brusttumorzellen aufweist, ist nicht bekannt. Möglicherweise liegt eine epigenetische Aktivierung durch DNA-Methylierung und/oder aktivierende Histonmodifikationen vor. Bert und Kollegen zeigten, dass in Prostatatumorzelllinien ganze Genomabschnitte von ca. 1Mb, in denen Onkogene, miRNAs und Tumormarker liegen, unter anderem durch den Austausch von reprimierenden Histonmodifikationen (wie H3K27me3) mit aktivierenden Histonmodifikationen (wie H3K9ac) hoch transkriptionell aktiv sind (Bert *et al.* 2013). Somit könnte durch die epigenetische Modifikation eines ganzen Genabschnittes, die durch die Aktivierung des RPL24 Gens zu einem Selektionsvorteil der Tumorzelle führt, das ERVK-5 Provirus in Brusttumorzellen ko-exprimiert werden.

Aber auch eine direkte Wirkung von ERVK-5 auf die Entstehung von Tumoren ist denkbar und könnte die beobachtete Tumor-assoziiert erhöhte Transkription erklären. Der *env*-Abschnitt des ERVK-5 Locus kodiert für das virale Onkogen Np9 (Armbruster *et al.* 2002). Np9 bindet an das „promyelocytic leukemia zinc-finger“ Protein (PLZF), einen transkriptionellen Repressor des c-Myc Proto-Onkogens, wodurch dieses in der Zelle akkumuliert und aktiv zur malignen Transformation beitragen kann (Denne *et al.* 2007). Np9 ist auch am NUMB/NOTCH Signalweg beteiligt, da es mit der E3 Ubiquitin Ligase LNX interagiert (Armbruster *et al.* 2002). Der NUMB/NOTCH Signalweg wiederum ist an der Regulation der Proliferation von malignen Brustdrüsenzellen beteiligt (Pece *et al.* 2004, Review: Roy *et al.* 2007).

Vor allem in leukämischen Zellen scheint eine Np9 Überexpression häufiger aufzutreten (Chen *et al.* 2013, Fischer *et al.* 2014). So konnten Chen und Kollegen zeigen, dass Np9 für die Koaktivierung von  $\beta$ -Catenin, Akt, Notch1 und ERK notwendig ist und dadurch die Proliferation von humanen Leukämie-Vorläuferzellen fördert (Chen *et al.* 2013). Aber auch in

## DISKUSSION

Brusttumorzellen konnte eine erhöhte Np9 Expression beobachtet werden (Denne *et al.* 2007). Inwieweit eine Np9 Expression durch den ERVK-5 Locus bedingt ist, müsste in weiteren Versuchen abgeklärt werden. Dies ist jedoch schwierig, da ca. 19 HERV-K(HML-2) Typ-I Loci für Np9 kodieren und somit ERVK-5 nicht der einzige Locus ist, von dem eine Np9-Expression ausgehen könnte (Subramanian *et al.* 2011, Schmitt *et al.* 2013).

### **5.5 Signifikant höherer Anstieg der HERV-K(HML-2) und ERVK-5 Transkription in Progesteron- bzw. Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomen**

Die Steroidhormone Östrogen- und Progesteron sind essentiell für die Ausbildung, Entwicklung und Proliferation von Brustdrüsenzellen (Review: Bocchinfuso *et al.* 1997, Humphreys *et al.* 1997). Häufig wird eine erhöhte Expression von Steroidhormonrezeptoren, zu denen Östrogen- und Progesteronrezeptoren zählen, in Brustdrüsentumorzellen beobachtet (Shoker *et al.* 1999, Marquez *et al.* 2001, Review: D'Abreo *et al.* 2013). Dementsprechend spielen Östrogen- und Progesteronrezeptoren vor allem bei der Behandlung von Mammakarzinomen eine wichtige Rolle, da durch die therapeutische Verabreichung entsprechender Hormonantagonisten, eine effiziente Behandlung von Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor-exprimierenden Tumorzellen möglich ist (Review: D'Abreo *et al.* 2013).

Der Vergleich der HML-2 und ERVK-5 Transkriptzahlen mit diversen klinischen Tumorparametern offenbarte einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Transkriptionsaktivierung in malignem Brustdrüsengewebe und dem Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorstatus der Tumorzellen. So wurde ein besonders hoher Anstieg der HML-2 Transkription in Östrogen- und Progesteronrezeptor-negativen und ein besonders hoher Anstieg der ERVK-5 Transkription in Progesteronrezeptor-negativen Tumoren festgestellt. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Transkription der HML-2 Gruppe und somit auch des ERVK-5 Locus mit der Expression der Steroidhormonrezeptoren assoziiert ist.

Tatsächlich sind innerhalb der LTR-Regionen von HML-2 Loci mehrere sogenannter Progesteron- bzw. Östrogen-abhängige Elemente (progesterone or estrogen responsive elements) lokalisiert, an die Östrogen- bzw. Progesteron-abhängige Transkriptionsfaktoren binden können, wodurch in der Regel die Transkription initialisiert wird (Ono *et al.* 1987, Golan *et al.* 2008, Review: Manghera *et al.* 2013). Ono und Kollegen konnten zeigen, dass die Progesteron- und Östrogenrezeptor-positive Brustkrebszelllinie T47D nach Behandlung

## DISKUSSION

mit Östradiol eine erhöhte HML-2 Transkription aufwies (Ono *et al.* 1987). Dementsprechend müsste eine besonders hohe Aktivierung der HML-2 bzw. ERVK-5 Transkription in Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor-positiven Zellen vorzufinden sein, und nicht umgekehrt wie hier gezeigt.

Andererseits konnten Wang-Johanning *et al.* zeigen, dass nicht nur Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor-positive Brustkrebszelllinien wie z.B. MCF-7 und T47D, sondern auch Östrogen- und Progesteronrezeptor-negative Brustkrebszelllinien, wie z.B. MDA-MB-231, eine im Vergleich zu einer neoplastischen Zelllinie erhöhte HERV-K(HML-2) Env-Expression aufwiesen (Wang-Johanning *et al.* 2012). Eine Transkription bzw. Expression von HML-2 Elementen kann zwar durch Stimulation mit Östrogen bzw. Progesteron induziert werden, muss aber nicht zwangsläufig nur über diese erfolgen. Tatsächlich finden sich eine Vielzahl verschiedenster Transkriptionsfaktorbindestellen innerhalb von HML-2 LTRs, die zeigen, dass eine ganze Reihe von diversen Signalwegen die Transkription beeinflussen können (Review: Manghera *et al.* 2013). Zudem ist bekannt, dass eine Östrogen-induzierte Signalkaskade nicht nur ausschließlich über den Östrogenrezeptor, sondern auch über andere Rezeptoren, wie z.B. GPR30, erfolgen kann (Filardo *et al.* 2000, Review: Filardo 2002, Bulayeva *et al.* 2004).

Des Weiteren führt eine Aktivierung des Östrogenrezeptors und anderer Steroidhormone unter anderem zur Aktivierung der MAPK/ERK und PI3K/AKT/mTOR Signalwege (Castoria *et al.* 2001, Review: Kelly *et al.* 2001, Song *et al.* 2002, Stoica *et al.* 2003). Auch Np9 scheint in diese Signalwege involviert zu sein, da eine Überexpression bzw. ein shRNA vermittelter Knock-down von Np9 in leukämischen Zellen unter anderem zu einer Aktivierung bzw. Reprimierung der MAPK/ERK und PI3K/AKT/mTOR Signalwege führte (Chen *et al.* 2013). Möglicherweise macht eine durch Np9 vermittelte Aktivierung dieser Signalwege die Aktivierung durch den Östrogenrezeptor obsolet, wodurch dieser in seiner Expression reprimiert wird. Tatsächlich führt eine Stimulierung der Östrogenrezeptoren mit Estradiol in normalen und malignen Brustdrüsenzellen zur Reprimierung des Rezeptors (Borras *et al.* 1994, Saceda *et al.* 1998, Hatsumi *et al.* 2006). Folglich kommt es zu einer Selbstregulierung der Östrogenrezeptor-Expression, die vermutlich ebenfalls über den MAPK/ERK und/oder PI3K/AKT/mTOR Signalweg stattfindet. So konnten Stoica *et al.* zeigen, dass ein konstitutiv aktives Akt-Protein in der Brusttumorzelllinie MCF-7 die Östrogenrezeptor-Expression, ähnlich wie die Stimulation mit Estradiol, reprimiert (Stoica *et al.* 2003).

## 5.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten lassen vermuten, dass es in malignem Urothelgewebe eher zu einer generell erniedrigten HERV-Transkription kommt. In Urothelkarzinomen wird häufiger eine Hypermethylierung der Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen beobachtet, wodurch diese inaktiviert werden (Bilgrami *et al.* 2014). Dadurch könnten auch benachbarte HERV Elemente epigenetisch inaktiviert werden, was die hier beobachtete tendentiell Tumor-assoziierte Reprimierung der HERV-Transkription erklären würde. Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, könnten epigenetische Analysen z.B. des DNA-Methylierungsstatus und der Chromatiumgebung der entsprechenden Loci hilfreich sein.

Die hier gezeigten Daten der Brustkrebsstudie deuten daraufhin, dass HERV-Transkripte der gesamten HERV-K(HML-2) Gruppe, insbesondere des ERVK-5 Locus, als Biomarker für diagnostische Anwendungen in der Brustkrebstherapie Verwendung finden könnten, da sie eine brustdrüsentumorspezifisch signifikant erhöhte Transkription aufweisen. Dies müsste jedoch mit einer weit größeren Anzahl an Brustkrebspatientinnen validiert werden. Interessant wäre dabei vor allem inwieweit sich Transkriptions-Daten mit diversen Tumorparametern korrelieren lassen und ob sich, wie bereits Wang-Johanning und Kollegen für HML-2 *env*-Transkripte/Env-Proteine berichteten, erhöhte HML-2 oder ERVK-5 *gag*-Transkripte in Blutproben von Brustkrebspatientinnen nachweisen lassen (Wang-Johanning *et al.* 2014).

Zusätzlich wäre es von großem Interesse zu überprüfen, ob auch eine Translation von ERVK-5 Gag-Proteinen stattfindet. ERVK-5 Proteine oder Peptide könnten eventuell auch als Antigene die Tumorzellen kennzeichnen und somit als Ziel für eine Immuntherapie infrage kommen. Ähnliches wurde bereits ebenfalls von der Arbeitsgruppe von Wang-Johanning für Env-Proteine in Brusttumorzellen vorgeschlagen, jedoch ist bisher nicht bekannt ob die immunogenen HML-2-Proteine/Peptide von mehreren HML-2 Loci oder primär nur von einem Locus abstammen (Wang-Johanning *et al.* 2008).

Erste selbst durchgeführte Expressionversuche mit HA- bzw. Flag-Tag markierten ERVK-5 Gag-Proteinen in HeLa und HEK293T Zellen verliefen bisher negativ. Möglicherweise sind die hierfür verwendeten Zellmodelle weniger geeignet und Expressionsversuche in Brustkrebszelllinien wie z.B. T47D oder MCF-7 eher von Erfolg gekrönt. Dies bedarf jedoch weiterer Analysen.

## 6. Zusammenfassung

Gut 8-9 % des menschlichen Genoms bestehen aus humanen endogenen Retroviren (HERVs). Man nimmt an, dass HERVs Relikte exogener Retroviren sind, die vor Jahrmillionen Keimbahnzellen von Primatenvorfahren des Menschen infizierten und sich durch wiederholte Neuinfektionen und Retrotransposition im Genom ausbreiten konnten. Aufgrund zahlreicher Mutationen und reprimierender epigenetischer Modifikationen sind HERVs heutzutage nicht mehr infektiös und nicht oder kaum transkriptionell aktiv. Dennoch kann für jeden Gewebetyp ein spezifisches basales HERV-Aktivitätsmuster nachgewiesen werden. Da in Tumoren häufig erhöhte HERV-mRNA und Protein Level gefunden wurden, wird ein Zusammenhang mit verschiedenen malignen Erkrankungen angenommen. Obwohl die zugrunde liegenden Mechanismen nicht gänzlich geklärt sind, könnten tumorspezifisch aktivierte HERV-Elemente als Tumormarker oder als Antigene für eine Antikörper-basierte Immuntherapie Verwendung finden. Eine Identifizierung potentieller HERV-basierter Tumormarker oder Antigene wird jedoch dadurch erschwert, dass tausende verschiedener HERV-Elemente mit hohen Sequenzhomologien über das ganze Genom verteilt vorliegen. In dieser Arbeit sollten HERV-Elemente identifiziert werden, die in malignem Gewebe eine erhöhte Transkription aufweisen und dadurch möglicherweise als Tumormarker bzw. Antigen für eine Anti-Krebstherapie in Frage kommen könnten. Dazu wurde gesundes und malignes Urothel- und Brustdrüsengewebe untersucht.

### **Urothelkarzinomstudie:**

Um eine Vorauswahl von tumorspezifisch dysregulierter HERV-(Sub)Gruppen zu treffen, wurden HERV-Transkriptionsprofile vom gesunden und dem jeweils korrespondierendem malignen Urothelgewebe von 28 PatientInnen mittels eines HERV-spezifischen Microarrays erstellt. Wie sich zeigte kommt es während einer malignen Transformation von Urothelgewebe tendenziell eher zu einer Reprimierung der HERV-Transkription. Dies konnte mit spezifischen qRT-PCRs für ausgewählte HERV-Gruppen bestätigt werden. Eine eingehendere Untersuchung der Transkription der HERV-K(HML-2), HERV-K(HML-6), ERV-9 und HERV-W Gruppen in malignem und gesundem Urothelgewebe von fünf Patienten mittels einer „Next Generation Amplikon-Sequenzierung“ (Roche 454 GS FLX+) führte zur Identifizierung der transkribierten Proviren. Es konnte jedoch kein diagnostisch relevanter, tumorspezifisch dysregulierter HERV-Locus detektiert werden. Diese Ergebnisse führen zur Annahme, dass die untersuchten HERV-Elemente keine relevante tumorspezifische Aktivität aufweisen, da es vermutlich im Zuge einer malignen Transformation des Urothels eher zu einer epigenetischen Reprimierung von HERV-Elementen kommt.

### **Brustkrebsstudie:**

## ZUSAMMENFASSUNG

Analog zur Urothelkarzinomstudie wurden Microarray-Analysen von gesundem und korrespondierendem malignen Brustdrüsengewebe von 31 Brustkrebspatientinnen durchgeführt, um tumorspezifisch dysregulierte HERV-(Sub)Gruppen zu identifizieren. In einem Teil der Patientinnen konnte eine tumorspezifische Transkriptions-Erhöhung der häufig mit Brustkrebs-assoziierten HERV-K(HML-2) Gruppe detektiert werden. Die Quantifizierung der Transkription der HML-2 Gruppe mittels qRT-PCR ergab eine statistisch signifikante Erhöhung der HML-2 *gag*-Transkripte im malignen Brustdrüsengewebe in 70% der 40 untersuchten Patientinnen. Eine Identifizierung der transkribierten HML-2 Proviren in gesundem und malignem Brustdrüsengewebe von sechs Patientinnen mittels cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung führte zudem zur Detektion des ERVK-5 Locus, der eine Tumor-exklusive bzw. Tumor-assoziiert erhöhte *gag*-Transkription aufwies. Ferner wurde mittels spezifischer qRT-PCR eine im Mammakarzinom signifikant erhöhte ERVK-5 *gag*-Transkription in über 80% der 40 Patientinnen detektiert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es während der malignen Transformation von Brustdrüsenzellen zu einer transkriptionellen Aktivierung der HML-2 Gruppe und insbesondere des ERVK-5 Locus kommt. Durch den Vergleich der *gag*-Transkriptionsdaten mit verschiedenen Tumorparametern konnte zudem eine besonders starke Tumor-assoziierte Erhöhung der HML-2 Gesamttranskription sowohl mit einem Progesteron-, als auch einem Östrogenrezeptor-negativen Status assoziiert werden. Eine verstärkte tumorspezifische Erhöhung der ERVK-5 Transkription konnte hingegen nur mit einem negativen Progesteronrezeptorstatus verknüpft werden. Die Daten der Brustkrebsstudie sprechen dafür, dass erhöhte HML-2 *gag*- bzw. ERVK-5 *gag*-Transkriptwerte möglicherweise als Brustkrebs Biomarker für diagnostische Anwendungen Verwendung finden könnten.

## 7. Summary

About 8-9 % of the human genome consists of human endogenous retroviruses (HERVs). It is believed that HERVs are relicts of exogenous retroviruses, which infected the germline of primate ancestors of humans million years ago and were able to spread all over the genome by repeated events of new infection and retrotransposition. HERV elements are nowadays uninfecious and not or only marginally transcribed due to numerous mutations and repressive epigenetic modifications. Nevertheless a specific basal HERV activity pattern is detectable in every tissue type. As increased HERV mRNA and protein levels have been detected in many tumors, it is supposed that HERVs may be involved in carcinogenesis. Although the underlying mechanisms for these observations are not completely understood, tumor-specifically activated HERV elements might be useful as tumor markers or targets for antibody based anticancer immunotherapies. Identification of potential HERV derived tumor markers or therapeutic targets is complicated, because thousands of different HERV elements with highly homologous DNA sequences are scattered all over the human genome. In this thesis HERV elements should be identified which show an increased transcription in malignant tissue and therefore might be used as tumor markers or targets for anticancer therapies. For this purpose malignant urothelial and mammary gland tissue was examined.

### **Urothelial cancer study:**

To preselect tumor-specifically dysregulated HERV (sub)groups, HERV transcription profiles of healthy and corresponding cancerous urothelial tissue of 28 patients were generated by HERV-specific microarray analysis. Apparently, HERV transcription is preferentially down-regulated during the malignant transformation of urothelial tissue. This was further confirmed by specific qRT-PCR for selected HERV groups. In-depth transcriptional analysis of the HERV-K(HML-2), HERV-K(HML-6), ERV-9 and HERV-W groups in malignant and healthy urothelial tissue of five patients by next-generation amplicon-sequencing (Roche 454 GS FLX+) led to the identification of the transcribed proviruses. However detection of a diagnostic relevant tumor-specifically dysregulated HERV-element was not possible. These results suggest that the examined HERV elements do not show any tumor-specific activity, probably because they are epigenetically repressed during malignant transformation of urothelial tissue.

### **Breast cancer study:**

Analogous to the urothelial cancer study microarray analyses of corresponding healthy and malignant mammary gland tissue of 31 breast cancer patients were performed in order to preselect tumor-specifically dysregulated HERV (sub)groups. The majority of patients showed tumor-specifically increased transcript levels of the HERV-K(HML-2) group that was

## SUMMARY

associated with breast cancer previously. Quantification of HML-2 transcripts by qRT-PCR analysis showed a statistically significant increase of HML-2 *gag* transcripts in breast tumors in 70% of 40 examined patients. Identification of the transcribed HML-2 proviruses in healthy and malignant mammary gland tissue of six patients using cDNA-cloning and Sanger-sequencing led to the identification of the ERVK-5 locus, which was tumor-exclusively active or tumor-specifically up-regulated. Furthermore, specific qRT-PCR revealed tumor-specifically increased ERVK-5 *gag* transcripts in over 80% of 40 patients examined. These results indicate that a malignant transformation of mammary gland tissue leads to the transcriptional activation of the HML-2 group and particularly of the ERVK-5 locus. Comparing the *gag* transcription data with different tumor parameters a particularly strong tumor-specifically transcriptional activation of the HML-2 group could be associated with both, a progesterone and an oestrogen negative receptor status. Whereas a particularly strong tumor-specific activation of the ERVK-5 *gag* transcription was only associated with a negative progesterone receptor status. The results of the breast cancer study suggest that increased HML-2 *gag* and/or ERVK-5 *gag* transcript levels might be used as breast cancer biomarkers for diagnostics.

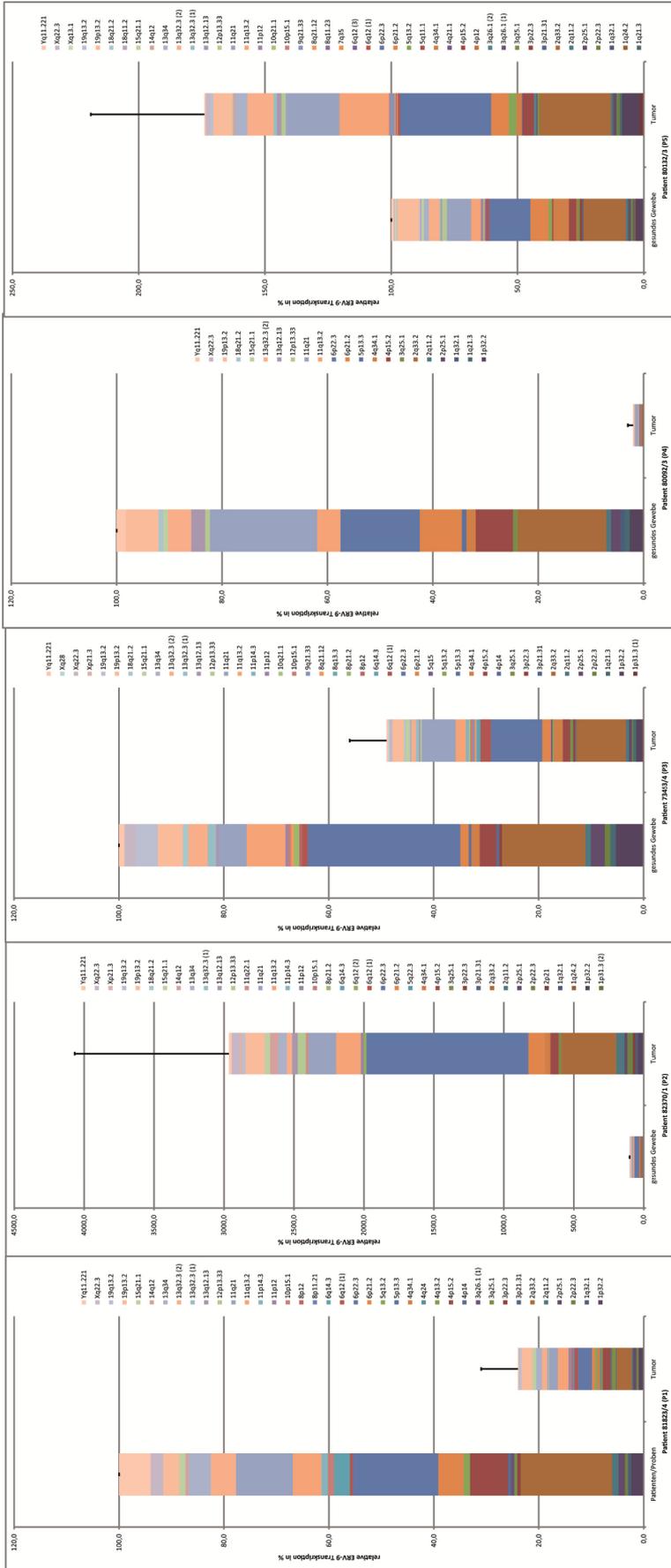
## 8. Anhang

### 8.1 Zusätzliche Abbildungen

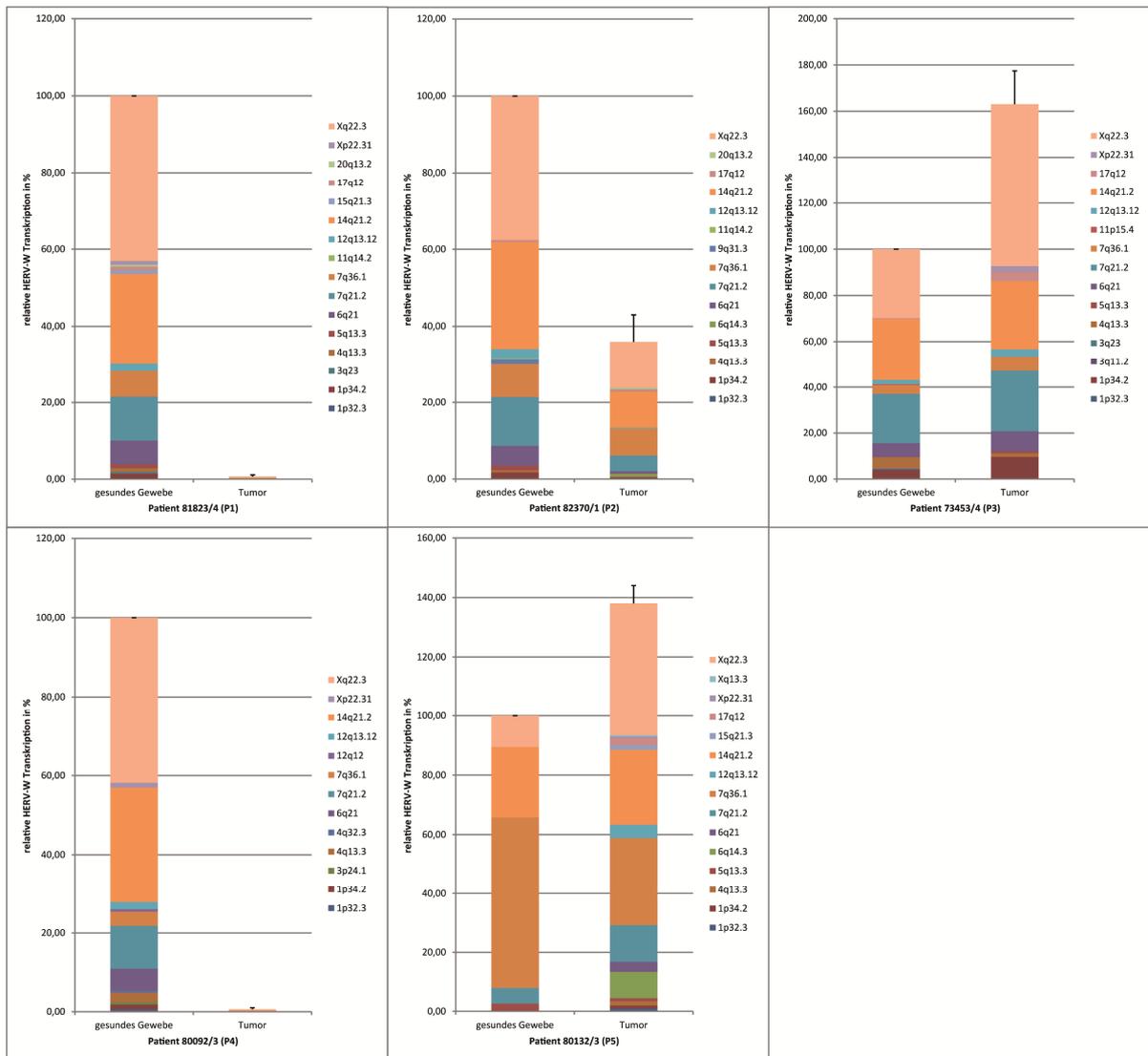
**Abbildung 8.1 (auf der nächsten Seite): Relative ERV-9 Transkription von gesundem und malignem Urothelgewebe mit prozentuaalem Anteil der per Locusbestimmung identifizierten ERV-9 Loci.**

Dargestellt ist die relative ERV-9 Transkription in % quantifiziert mittels absoluter qRT-PCR. Die Transkription im gesunden Gewebe wurde auf 100% festgelegt. Zusätzlich ist die Standardabweichung angegeben ( $\gamma=3$ ). Gleichzeitig sind die Balken entsprechend der prozentualen Anteile der jeweiligen, mittels Amplikon-NGS, als transkriptionell aktiv nachgewiesenen ERV-9 Loci an der ERV-9 Gesamttranskription farblich segmentiert.

# ANHANG



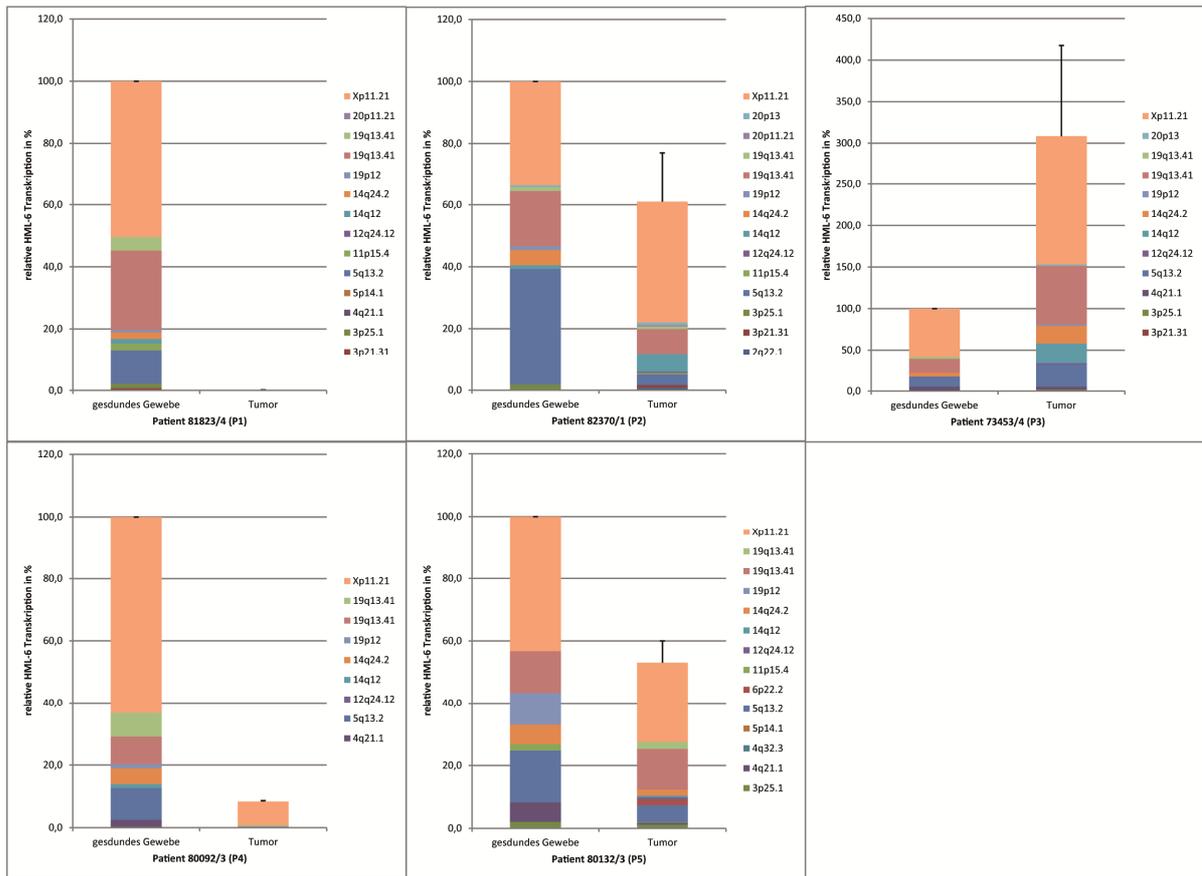
## ANHANG



**Abbildung 8.2: Relative HERV-W Transkription von gesundem und malignem Urothelgewebe mit prozentalem Anteil der per Locusbestimmung identifizierten HERV-W Loci.**

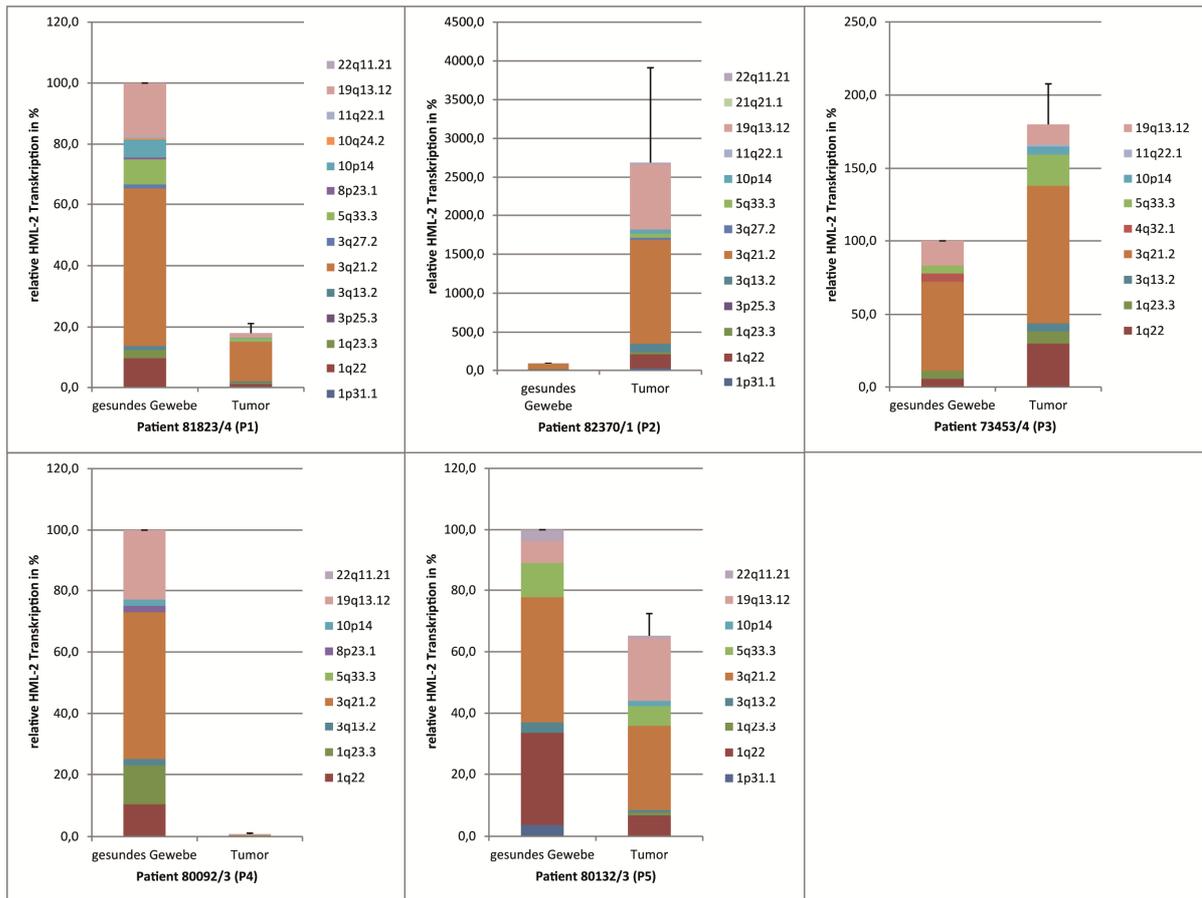
Dargestellt ist die relative HERV-W Transkription in % quantifiziert mittels absoluter qRT-PCR. Die Transkription im gesunden Gewebe wurde auf 100% festgelegt. Zusätzlich ist die Standardabweichung angegeben ( $y = 3$ ). Gleichzeitig sind die Balken entsprechend der prozentualen Anteile der jeweiligen, mittels Amplikon-NGS, als transkriptionell aktiv nachgewiesenen HERV-W Loci an der HERV-W Gesamttranskription farblich segmentiert.

## ANHANG



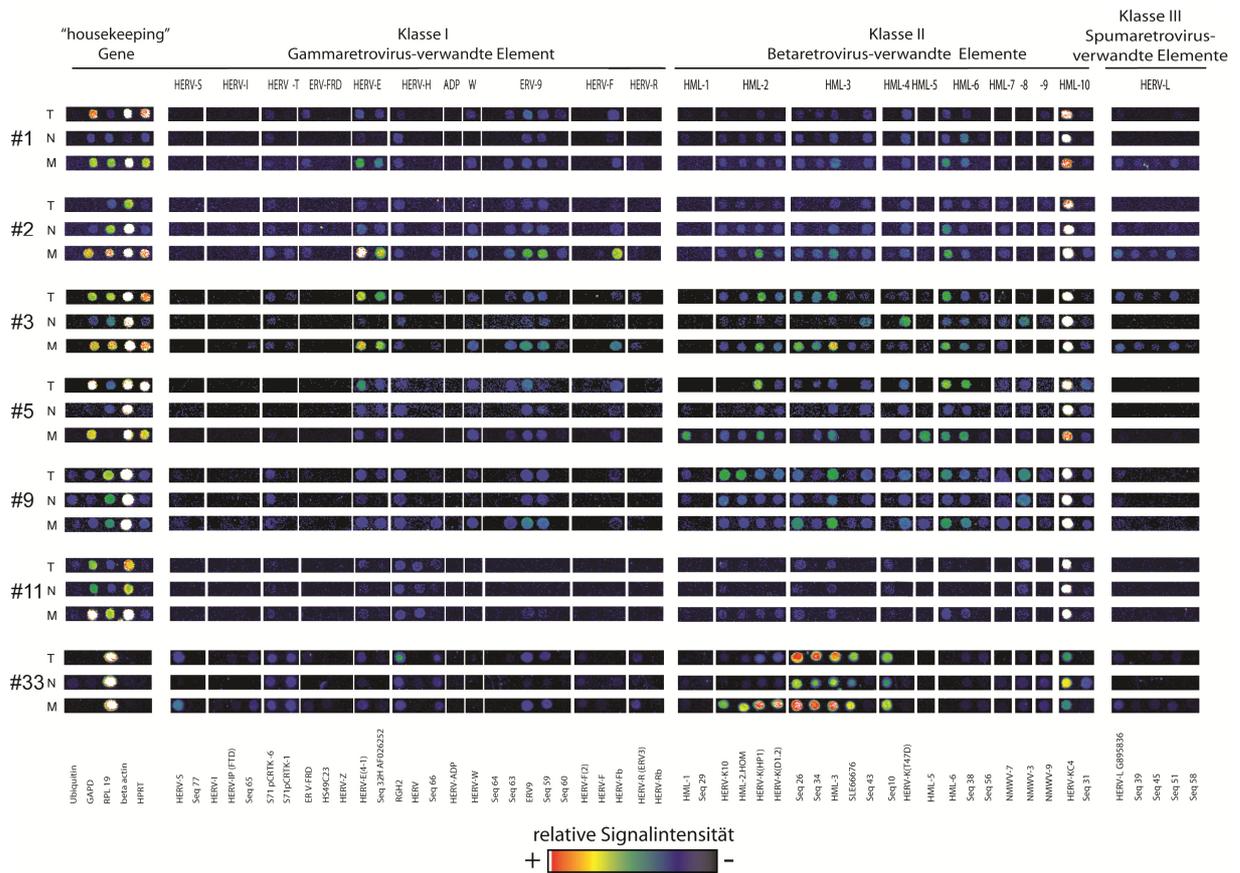
**Abbildung 8.3: Relative HERV-K(HML-6) Transkription von gesundem und malignem Urothelgewebe mit prozentuaem Anteil der per Locusbestimmung identifizierten HML-6 Loci.** Dargestellt ist die relative HML-6 Transkription in % quantifiziert mittels absoluter qRT-PCR. Die Transkription im gesunden Gewebe wurde auf 100% festgelegt. Zusätzlich ist die Standardabweichung angegeben ( $y = 3$ ). Gleichzeitig sind die prozentualen Anteile der jeweiligen, mittels Amplikon-NGS, als transkriptionell aktiv nachgewiesenen HML-6 Loci an der HML-6 Gesamttranskription farblich segmentiert.

## ANHANG



**Abbildung 8.4: Relative HERV-K(HML-2) Transkription von gesundem und malignem Urothelgewebe mit prozentualen Anteil der per Locusbestimmung identifizierten HML-2 Loci.** Dargestellt ist die relative HML-2 Transkription in % quantifiziert mittels absoluter qRT-PCR. Die Transkription im gesunden Gewebe wurde auf 100% festgelegt. Zusätzlich ist die Standardabweichung angegeben ( $y = 3$ ). Gleichzeitig sind die Balken entsprechend der prozentualen Anteile der jeweiligen, mittels Amplikon-NGS, als transkriptionell aktiv nachgewiesenen HML-2 Loci an der HML-2 Gesamttranskription farblich segmentiert.

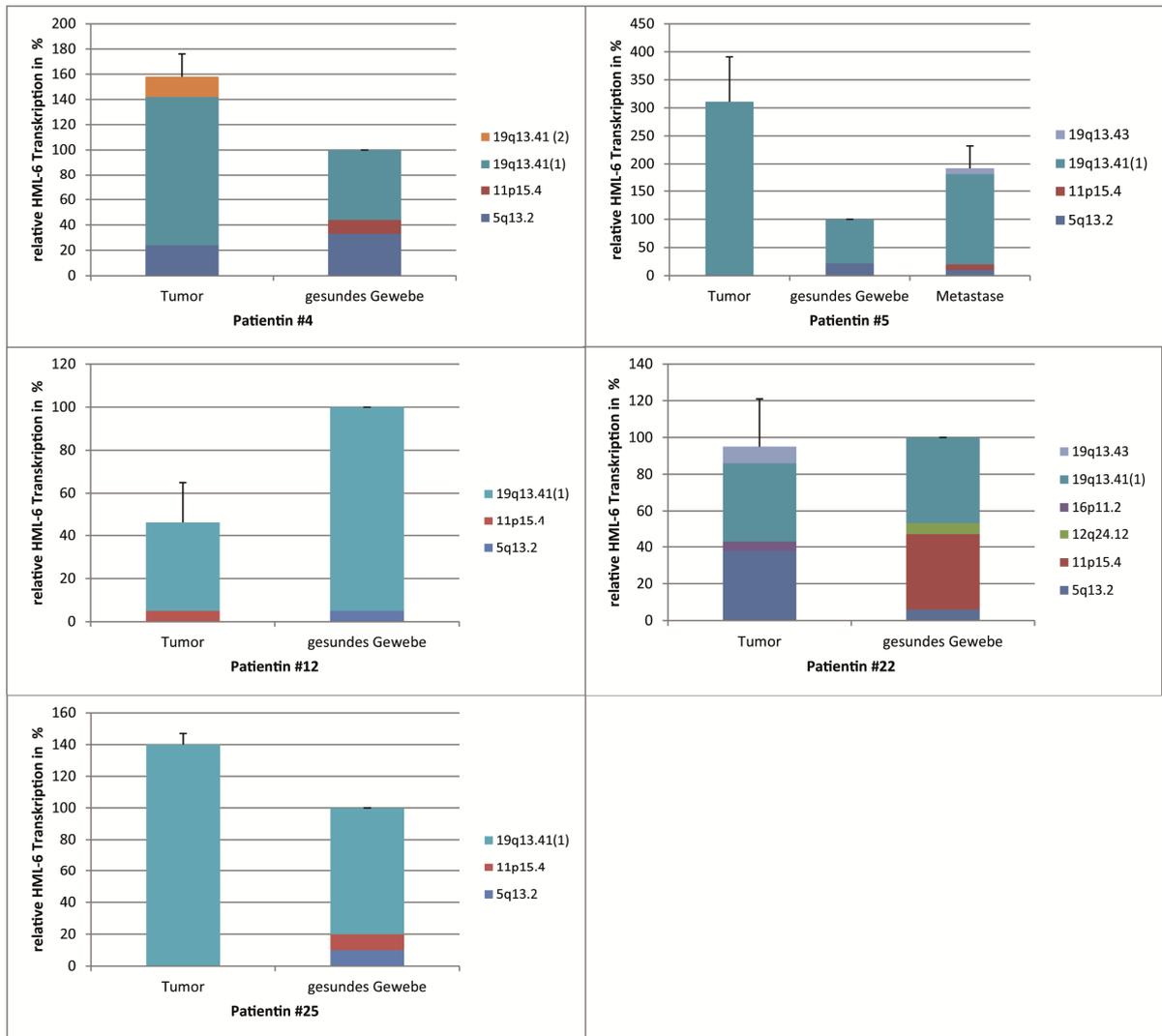
# ANHANG



**Abbildung 8.5: HERV-Transkriptionsprofile von 7 Mammakarzinompatientinnen inklusive Lymphknoten-Metastasen.**

Insgesamt wurden 54 HERV-Subgruppen mit einem Retrovirus-spezifischen Microarray analysiert (Seifarth *et al.* 2003). Es wurde jeweils das Brustdrüsentumorgewebe (T) mit dem normalen, gesunden Brustdrüsengewebe (N) und einer Lymphknotenmetastase (M) derselben Patientin verglichen. Die Zahlen geben die Nummer der Patientinnen an. Des Weiteren ist eine Signalintensitäts-Skala aufgeführt, an Hand derer die relative transkriptionelle Aktivität der einzelnen HERV-Gruppen abgelesen werden kann.

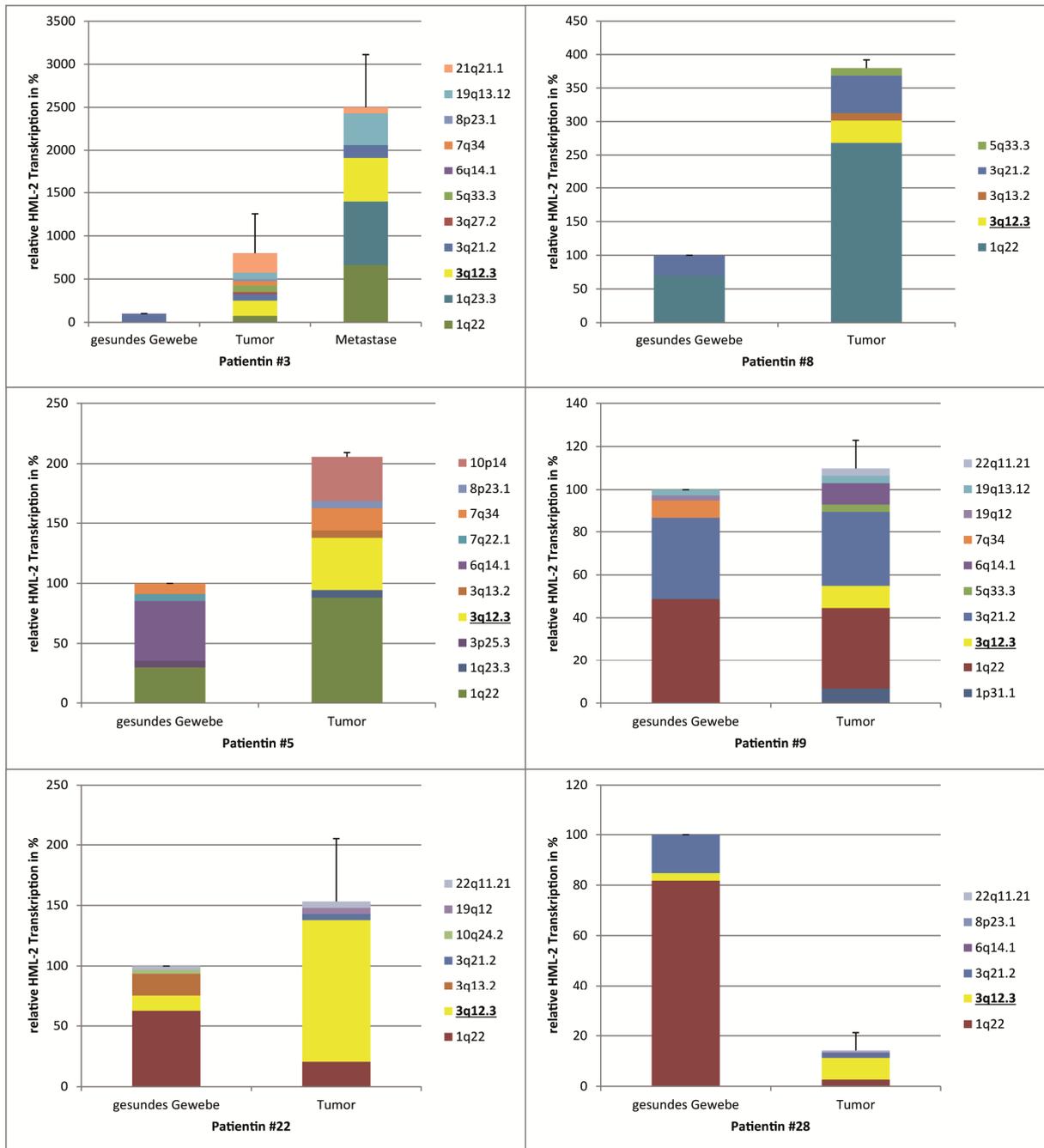
## ANHANG



**Abbildung 8.6: Relative HERV-K(HML-6) Transkription von gesundem und malignem Brustdrüsengewebe und einer Lymphknoten-Metastase mit prozentualen Anteil der per Locusbestimmung identifizierten HML-6 Loci.**

Dargestellt ist die relative HML-6 Transkription in % quantifiziert mittels relativer qRT-PCR normalisiert auf RPII. Die Transkription im gesunden Gewebe wurde auf 100% festgelegt. Zusätzlich ist die Standardabweichung angegeben ( $y = 3$ ). Eine Berechnung erfolgte nach Livak *et al.* (Livak *et al.* 2001). Gleichzeitig sind die Balken entsprechend der prozentualen Anteile der jeweiligen, mittels cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung, als transkriptionell aktiv nachgewiesenen HML-6 Loci an der HML-6 Gesamttranskription farblich segmentiert.

## ANHANG



**Abbildung 8.7: Relative HERV-K(HML-2) Transkription von gesundem und malignem Brustdrüsengewebe und einer Lymphknoten-Metastase mit prozentualen Anteil der per Locusbestimmung identifizierten HML-6 Loci.**

Dargestellt ist die relative HML-2 Transkription in % quantifiziert mittels absoluter qRT-PCR. Die Transkription im gesunden Gewebe wurde auf 100% festgelegt. Zusätzlich ist die Standardabweichung angegeben ( $y = 3$ ). Gleichzeitig sind die Balken entsprechend der prozentualen Anteile der jeweiligen, mittels cDNA-Klonierung und Sanger-Sequenzierung, als transkriptionell aktiv nachgewiesenen HML-2 Loci an der HML-2 Gesamttranskription farblich segmentiert.

## 8.2 Zusätzliche Tabellen

Tabelle 8.1: Zusammenfassung der ERV-9 Ergebnisse aus Abbildung 8.1

chromosomale Bande	Amplikon-Koordinaten		Anteil der Transkripte einzelner ERV-9 Loci an der per qRT-PCR quantifizierten ERV-9 Gesamttranskription (in %)									
	Start	Stop	P1H	P1C	P2H	P2C	P3H	P3C	P4H	P4C	P5H	P5C
1p22.3	87267516	87275316	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
1p31.3 (1)	63218929	63228333	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	1,3
1p31.3 (2)	66880443	66890762	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1p32.2	58632832	58641151	2,4	1,0	3,8	39,3	5,3	1,1	2,7	0,0	3,3	7,0
1q21.3	154643044	154651789	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,6	0,9	0,0	0,0	0,9
1q24.2	169630866	169639877	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
1q32.1	199060243	199067183	0,6	0,0	0,0	19,6	0,0	0,0	0,9	0,0	0,5	0,0
2p21	47327335	47335597	0,0	0,0	0,0	19,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2p22.3	33278588	33283059	0,6	0,5	0,9	39,3	1,1	0,3	0,0	0,0	1,0	1,3
2p25.1	9034777	9043376	1,2	0,6	1,3	19,6	2,6	0,6	1,8	0,0	1,0	1,3
2q11.2	98437573	98445919	1,2	0,2	1,3	58,9	1,1	0,6	0,9	0,0	1,0	0,9
2q33.2	203361451	203369341	17,5	2,9	12,8	392,7	15,9	9,5	16,8	0,3	16,7	28,3
3p21.31	44583974	44592255	0,0	0,1	0,9	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,5	0,0
3p22.3	33488517	33494770	0,6	0,0	0,4	0,0	0,5	0,3	0,0	0,0	1,0	0,0
3q25.1	151381890	151388250	0,6	0,8	0,4	19,6	0,0	0,6	0,9	0,0	1,0	0,9
3q26.1 (1)	163519390	163525104	0,6	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
3q26.1 (2)	164531866	164537378	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9
4p12	45532299	45538850	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
4p14	35858193	35866552	0,6	0,1	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4p15.2	25240055	25248794	7,2	1,4	2,1	58,9	3,2	1,4	7,1	0,0	2,9	4,4
4q13.2	68141512	68147667	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4q21.1	76964922	76972381	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
4q24	102551997	102559593	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4q34.1	173285647	173296811	0,0	0,5	1,7	39,3	1,6	1,7	1,8	0,1	6,2	2,2
5p13.3	32548561	32560530	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0
5q11.1	49665091	49673818	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
5q13.2	72221145	72232162	1,2	0,5	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	1,4	3,0
5q15	96644592	96653851	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
5q22.3	114325225	114335804	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6p21.2	38584305	38592261	4,8	0,6	5,1	117,8	1,6	1,7	8,0	0,1	7,2	7,0
6p22.3	16455961	16464847	16,3	2,7	32,3	1158,5	29,1	9,8	15,0	0,2	16,3	36,1
6q12 (1)	64031223	64045749	0,6	0,7	0,9	0,0	1,1	2,0	0,0	0,0	1,0	0,9
6q12 (2)	63787408	63796651	0,0	0,0	0,0	19,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6q12 (3)	64733900	64742685	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
6q14.3	87381417	87391269	3,0	0,1	0,9	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
7q35	144114152	144121697	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
8p11.21	42415026	42423410	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8p12	29161589	29170086	0,0	0,1	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8p21.2	27349970	27355890	0,0	0,0	0,4	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8q11.23	54371997	54381514	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
8q13.3	73300084	73307813	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
8q21.12	79059929	79063797	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,3	0,0	0,0	0,0	0,4
9q21.33	88762111	88778465	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	1,7
10p15.1	5096639	5102960	1,2	0,1	1,3	0,0	0,5	0,6	0,0	0,0	0,5	0,4
10q21.1	59592125	59601965	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,5	0,0
11p12	42895286	42904471	0,0	0,5	0,9	19,6	0,5	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
11p14.3	25021588	25028687	1,2	0,0	0,4	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
11q13.2	67386324	67394514	5,4	2,1	6,0	176,7	7,4	2,0	4,4	0,1	3,8	19,6
11q21	93851410	93859004	10,8	1,7	8,1	196,4	5,3	6,4	20,4	0,5	9,6	21,3
11q22.1	101100835	101112537	0,0	0,0	0,4	19,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12p13.33	1819237	1825304	0,0	0,1	1,7	58,9	0,0	0,3	0,9	0,0	1,9	1,7
13q12.13	27786128	27794955	0,0	0,1	1,3	39,3	0,5	0,3	2,7	0,2	0,5	1,7
13q32.3 (1)	100732258	100742473	0,0	0,1	0,0	0,0	1,8	0,6	0,0	0,0	0,5	1,3
13q32.3 (2)	100934518	100938212	4,8	1,0	2,1	39,3	3,7	0,8	4,4	0,0	4,3	10,4
13q34	111841561	111851460	4,2	1,1	0,4	58,9	0,0	0,3	0,0	0,0	1,9	4,8
14q12	32171196	32181419	0,6	0,0	0,4	58,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9
15q21.1	45156237	45166558	1,2	0,7	0,9	39,3	0,0	0,8	0,9	0,0	1,0	0,4
18q11.2	23811639	23825764	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
18q21.2	48637529	48647345	0,0	0,0	0,9	0,0	1,1	0,3	0,9	0,0	0,5	0,0
19p13.2	8440462	8451997	3,0	2,1	6,8	137,5	4,8	2,2	6,2	0,1	8,6	7,4
19q13.2	39311977	39317659	0,0	0,4	0,4	19,6	4,2	0,0	0,0	0,0	0,5	1,3
Xp21.3	26059492	26065835	0,0	0,0	0,0	19,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Xq13.1	70714933	70721797	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
Xq22.3	104127516	104141731	2,4	0,2	1,7	58,9	2,1	0,6	0,0	0,1	0,5	1,7
Xq28	150719396	150731087	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
Yq11.221	15999559	16009875	6,0	0,1	0,0	19,6	1,1	0,3	1,8	0,1	1,0	0,4
	<b>relative Transkription</b>		<b>100,0</b>	<b>24,0</b>	<b>100,0</b>	<b>2965,0</b>	<b>100,0</b>	<b>49,0</b>	<b>100,0</b>	<b>2,0</b>	<b>100,0</b>	<b>174,0</b>

P1 = 81823/4, P2 = 82370/1, P3 = 73453/4, P4 = 80092/3, P5 = 80132/3; C = kanzeröses Urothelgewebe, H = gesundes Urothelgewebe

## ANHANG

**Tabelle 8.2: Zusammenfassung der HERV-W Ergebnisse aus Abbildung 8.2**

chromosomale Bande	Amplikon-Koordinaten		Anteil der Transkripte einzelner HERV-W Loci an der per qRT-PCR quantifizierten HERV-W Gesamttranskription (in %)									
	Start	Stop	P1H	P1C	P2H	P2C	P3H	P3C	P4H	P4C	P5H	P5C
1p32.3	55372937	55384183	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
1p34.2	42410514	42419487	1,4	0,0	1,7	0,2	3,4	9,6	1,2	0,0	0,0	1,0
3p24.1	27042929	27049366	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
3q11.2	96385319	96394289	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3q23	141538632	141540356	0,5	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4q13.3	73791293	73798904	1,0	0,0	0,6	0,2	5,0	1,6	2,4	0,0	0,0	1,5
4q32.3	165575837	165576991	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
5q13.3	76203971	76210085	1,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	2,6	1,0
6q14.3	85421420	85430889	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,9
6q21	106676012	106683690	6,2	0,0	5,2	0,7	6,1	8,8	5,5	0,0	0,0	3,5
7q21.2	92097285	92107507	11,5	0,1	12,7	4,1	21,4	26,4	10,9	0,0	5,3	12,4
7q36.1	151725764	151735154	6,7	0,0	8,7	7,1	3,8	6,4	3,6	0,0	57,9	29,7
9q31.3	114098693	114100460	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11p15.4	9368353	9371165	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11q14.2	86556584	86562093	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12q12	38422071	38424983	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
12q13.12	51296259	51307151	1,9	0,0	2,3	0,2	1,9	3,2	1,8	0,0	0,0	4,5
14q21.2	45488688	45492898	23,4	0,2	27,7	9,3	26,7	29,6	29,1	0,2	23,7	25,2
15q21.3	55597048	55604632	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5
17q12	35687524	35692995	1,0	0,0	0,6	0,7	0,4	4,0	0,0	0,0	0,0	2,5
20q13.2	53965419	53970279	0,5	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Xp22.31	7617210	7622110	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	1,2	0,0	0,0	0,5
Xq13.3	75113201	75125851	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5
Xq22.3	106295361	106298102	43,1	0,2	37,6	12,1	29,8	70,3	41,8	0,3	10,5	44,5
<b>relative Transkription</b>			<b>100,0</b>	<b>0,7</b>	<b>100,0</b>	<b>36,0</b>	<b>100,0</b>	<b>163,0</b>	<b>100,0</b>	<b>0,6</b>	<b>100,0</b>	<b>138,0</b>

P1 = 81823/4, P2 = 82370/1, P3 = 73453/4, P4 = 80092/3, P5 = 80132/3; C = kanzeröses Urothelgewebe, H = gesundes Urothelgewebe

**Tabelle 8.3: Zusammenfassung der HERV-K(HML-6) Ergebnisse aus Abbildung 8.3**

chromosomale Bande	Amplikon-Koordinaten		Anteil der Transkripte einzelner HML-6 Loci an der per qRT-PCR quantifizierten HML-6 Gesamttranskription (in %)									
	Start	Stop	P1H	P1C	P2H	P2C	P3H	P3C	P4H	P4C	P5H	P5C
2q22.1	136829409	136834784	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3p21.31	46087749	46095834	0,7	0,0	0,0	0,8	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3p25.1	14266711	14271683	1,5	0,0	1,8	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	2,1	1,2
4q21.1	78313421	78321358	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	3,5	2,5	0,0	6,2	0,4
4q32.3	165916842	165927444	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
5p14.1	24647626	24654517	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5q13.2	70867879	70874148	10,9	0,0	37,4	3,4	12,3	26,4	10,1	0,2	16,5	5,3
6p22.2	26288250	26298495	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8
11p15.4	7921235	7927823	2,2	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0
12q24.12	112253979	112263659	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,6
14q12	28885639	28889754	1,5	0,0	1,2	5,9	0,0	24,7	1,3	0,0	0,0	0,6
14q24.2	70278067	70282766	2,2	0,1	4,9	0,0	4,4	21,2	5,1	0,1	6,2	1,8
19p12	21966551	21977609	0,7	0,0	1,2	0,0	0,0	1,8	1,3	0,1	10,3	0,0
19q13.41	52307623	52315204	25,5	0,0	17,8	8,0	16,7	70,5	8,9	0,1	13,4	12,9
19q13.41	52911334	52917986	4,4	0,0	1,2	0,8	2,6	0,0	7,6	0,4	0,0	2,3
20p11.21	25374847	25383857	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20p13	1377441	1382992	0,0	0,0	0,6	0,8	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Xp11.21	57128970	57136632	50,4	0,0	33,7	39,0	58,8	155,1	63,3	7,5	43,3	25,5
<b>relative Transkription</b>			<b>100,0</b>	<b>0,2</b>	<b>100,0</b>	<b>61,0</b>	<b>100,0</b>	<b>308,5</b>	<b>100,0</b>	<b>8,3</b>	<b>100,0</b>	<b>53,0</b>

P1 = 81823/4, P2 = 82370/1, P3 = 73453/4, P4 = 80092/3, P5 = 80132/3; C = kanzeröses Urothelgewebe, H = gesundes Urothelgewebe

**Tabelle 8.4: Zusammenfassung der HERV-K(HML-2) Ergebnisse aus Abbildung 8.4**

chromosomale Bande	Amplikon-Koordinaten		Anteil der Transkripte einzelner HML-2 Loci an der per qRT-PCR quantifizierten HML-2 Gesamttranskription (in %)									
	Start	Stop	P1H	P1C	P2H	P2C	P3H	P3C	P4H	P4C	P5H	P5C
1p31.1	75842771	75849144	0,0	0,3	0,6	27,1	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7	0,0
1q22	155596457	155605637	9,9	0,9	11,5	190,0	5,6	30,2	10,4	0,0	29,6	6,8
1q23.3	160660575	160669807	2,6	0,5	1,7	27,1	5,6	8,2	12,5	0,0	0,0	0,8
3p25.3	9883434	9896394	0,0	0,1	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3q13.2	112743124	112752283	1,3	0,3	1,1	108,6	0,0	5,5	2,1	0,0	3,7	0,8
3q21.2	125609302	125618417	51,3	13,1	68,4	1330,2	61,1	93,4	47,9	0,3	40,7	27,1
3q27.2	185280336	185289516	1,3	0,1	0,6	27,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4q32.1	161580212	161582651	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5q33.3	156084717	156093897	8,6	1,2	4,6	54,3	5,6	22,0	0,0	0,1	11,1	6,8
8p23.1	12340969	12354099	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0
10p14	6866144	6875604	5,9	0,2	1,7	54,3	0,0	5,5	2,1	0,0	0,0	1,7
10q24.2	101579816	101587714	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11q22.1	101565794	101575260	0,7	0,1	2,3	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0
19q13.12	37597549	37607067	17,1	1,3	5,7	841,5	16,7	13,7	22,9	0,2	7,4	20,3
21q21.1	19933322	19942324	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22q11.21	18926187	18935362	0,0	0,1	0,6	27,1	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7	0,8
<b>relative Transkription</b>			<b>100,0</b>	<b>18,0</b>	<b>100,0</b>	<b>2687,5</b>	<b>100,0</b>	<b>180,0</b>	<b>100,0</b>	<b>0,8</b>	<b>100,0</b>	<b>65,2</b>

P1 = 81823/4, P2 = 82370/1, P3 = 73453/4, P4 = 80092/3, P5 = 80132/3; C = kanzeröses Urothelgewebe, H = gesundes Urothelgewebe

## 9. Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
BMI	„Body-Mass-Index“
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
Bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	Komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
Cp	„crossing poin“
DCIS	„duktales Karzinoma <i>in situ</i> “
DEPC	Diethylpyrocarbonat/ Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>env</i>	Gen für retrovirales Hüllprotein (Env)
Env	Retrovirales Hüllprotein Env
ERV	Endogenes Retrovirus
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i>
etc.	et cetera
FeLV	Felines Leukämie Virus
For	„Forward“
g	Gramm
<i>gag</i>	Gen für retrovirales, gruppenspezifisches Antigen (Gag)
Gag	Retrovirales, gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRE	„Glucocorticoid response element“
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	Destilliertes Wasser
HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HKG	„housekeeping“ Gen
HML	„Human MMTV-like“
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HSRV	Humanes Spumaretrovirus
HTLV	Humanes T-Zell Leukämie Virus
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRS	Immunoreaktiver „Score“
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton

## ABKÜRZUNGEN

KoRV	Koala-Retrovirus
l	Liter
kDA	Kilodalton
LB-Medium	„Luria-bertani“-Medium
LINEs	„Long interspersed nuclear elements“
LTR	„Long terminal repeat“
M	Molar
mb	Megabasenpaare
min	Minute
miRNA	„micro-RNA“
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMTV	„Mouse mammary tumor virus“
MoMLV	„Molony murine leukemia virus“
MOP	„Mixed oligonucleotide primer“
mRNA	„messenger-RNA“
MS	Multiple Sklerose
MSRV	Multiple Sklerose-assoziiertes Retrovirus
ncRNA	„non-coding-RNA“
ng	Nanogramm
NGS	„Next-Generation-Sequencing“
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	„Open reading frame“
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PERV	Porcine endogene Retroviren
Pfu	„ <i>Pyrococcus furiosus</i> “
piRNA	„piwi-interacting-RNA“
<i>pol</i>	Gen für Polymerase
Pol	Polymerase
<i>pro</i>	Gen für Protease
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase-PCR
R	„Redundant“
Rev	„Reverse“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPII	RNA Polymerase II
RPL19	60s ribosomales Protein L19
RPL24	60s ribosomales Protein L24
rpm	„Revolutions per minute“
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SA	Spleißakzeptor
SAG	Superantigen
SD	Spleißdonor

## ABKÜRZUNGEN

shRNA	„short-hairpin-RNA“
siRNA	„silencing-RNA“
snoRNA	„small-nucleolar-RNA“
SOC	„Super optimal broth with catabolite repression“
SSC	„Saline-sodium citrate“
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tm	Schmelztemperatur (Primer)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	„transfer-RNA“
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
U3	„3C end unique“
U5	„5C end unique“
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
vgl.	vergleiche
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

## 10. Literatur

- Agoni, L., J. Lenz and C. Guha (2013). "Variant splicing and influence of ionizing radiation on human endogenous retrovirus K (HERV-K) transcripts in cancer cell lines." PLoS One **8**(10): e76472.
- Alves, P. M., N. Levy, B. J. Stevenson, H. Bouzourene, G. Theiler, G. Bricard, S. Viatte, M. Ayyoub, H. Vuilleumier, J. C. Givel, D. Rimoldi, D. E. Speiser, C. V. Jongeneel, P. J. Romero and F. Levy (2008). "Identification of tumor-associated antigens by large-scale analysis of genes expressed in human colorectal cancer." Cancer Immun **8**: 11.
- Andersson, G., A. C. Svensson, N. Setterblad and L. Rask (1998). "Retroelements in the human MHC class II region." Trends in genetics : TIG **14**(3): 109-114.
- Andersson, M. L., M. Lindeskog, P. Medstrand, B. Westley, F. May and J. Blomberg (1999). "Diversity of human endogenous retrovirus class II-like sequences." The Journal of general virology **80** ( Pt 1): 255-260.
- Antoniou, A., P. D. Pharoah, S. Narod, H. A. Risch, J. E. Eyfjord, J. L. Hopper, N. Loman, H. Olsson, O. Johannsson, A. Borg, B. Pasini, P. Radice, S. Manoukian, D. M. Eccles, N. Tang, E. Olah, H. Anton-Culver, E. Warner, J. Lubinski, J. Gronwald, B. Gorski, H. Tulinius, S. Thorlacius, H. Eerola, H. Nevanlinna, K. Syrjakoski, O. P. Kallioniemi, D. Thompson, C. Evans, J. Peto, F. Lalloo, D. G. Evans and D. F. Easton (2003). "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." American journal of human genetics **72**(5): 1117-1130.
- Antony, J. M., A. M. Deslauriers, R. K. Bhat, K. K. Ellestad and C. Power (2011). "Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants?" Biochimica et biophysica acta **1812**(2): 162-176.
- Antony, J. M., K. K. Ellestad, R. Hammond, K. Imaizumi, F. Mallet, K. G. Warren and C. Power (2007). "The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes." J Immunol **179**(2): 1210-1224.
- Antony, J. M., G. van Marle, W. Opii, D. A. Butterfield, F. Mallet, V. W. Yong, J. L. Wallace, R. M. Deacon, K. Warren and C. Power (2004). "Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination." Nat Neurosci **7**(10): 1088-1095.
- Armbruster, V., M. Sauter, E. Krautkraemer, E. Meese, A. Kleiman, B. Best, K. Roemer and N. Mueller-Lantzsch (2002). "A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **8**(6): 1800-1807.
- Armbruster, V., M. Sauter, K. Roemer, B. Best, S. Hahn, A. Nty, A. Schmid, S. Philipp, A. Mueller and N. Mueller-Lantzsch (2004). "Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X." Journal of virology **78**(19): 10310-10319.
- Assinger, A., K. C. Yaiw, I. Göttesdorfer, C. Leib-Mösch and C. Söderberg-Naucler (2013). "Human cytomegalovirus (HCMV) induces human endogenous retrovirus (HERV) transcription." Retrovirology **10**: 132.
- Balada, E., J. Ordi-Ros and M. Vilardell-Tarres (2009). "Molecular mechanisms mediated by human endogenous retroviruses (HERVs) in autoimmunity." Reviews in medical virology **19**(5): 273-286.
- Bankl, H. (2000). Arbeitsbuch Pathologie, Facultas Verlag. **Band 2+3**: 344.

## LITERATUR

- Baust, C., W. Seifarth, H. Germaier, R. Hehlmann and C. Leib-Mosch (2000). "HERV-K-T47D-Related long terminal repeats mediate polyadenylation of cellular transcripts." Genomics **66**(1): 98-103.
- Becker, N. and L. v. Karsa (2006). "Sekundäre Prävention (Krebsfrüherkennung)." Kompendium Internistische Onkologie: 307-339.
- Belshaw, R., A. L. Dawson, J. Woolven-Allen, J. Redding, A. Burt and M. Tristem (2005). "Genomewide screening reveals high levels of insertional polymorphism in the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML2): implications for present-day activity." J Virol **79**(19): 12507-12514.
- Belshaw, R., A. Katzourakis, J. Paces, A. Burt and M. Tristem (2005). "High copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection." Molecular biology and evolution **22**(4): 814-817.
- Belshaw, R., V. Pereira, A. Katzourakis, G. Talbot, J. Paces, A. Burt and M. Tristem (2004). "Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(14): 4894-4899.
- Benit, L., J. B. Lallemand, J. F. Casella, H. Philippe and T. Heidmann (1999). "ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals." Journal of virology **73**(4): 3301-3308.
- Bert, S. A., M. D. Robinson, D. Strbenac, A. L. Statham, J. Z. Song, T. Hulf, R. L. Sutherland, M. W. Coolen, C. Stirzaker and S. J. Clark (2013). "Regional activation of the cancer genome by long-range epigenetic remodeling." Cancer Cell **23**(1): 9-22.
- Bi, S., O. Gavrilova, D. W. Gong, M. M. Mason and M. Reitman (1997). "Identification of a placental enhancer for the human leptin gene." The Journal of biological chemistry **272**(48): 30583-30588.
- Bieda, K., A. Hoffmann and K. Boller (2001). "Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines." The Journal of general virology **82**(Pt 3): 591-596.
- Bilgrami, S. M., S. A. Qureshi, S. Pervez and F. Abbas (2014). "Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes correlates with tumor grade and invasiveness in patients with urothelial bladder cancer." Springerplus **3**: 178.
- Bjerregaard, B., S. Holck, I. J. Christensen and L. I. Larsson (2006). "Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions." Cellular and molecular life sciences : CMLS **63**(16): 1906-1911.
- Blond, J. L., F. Beseme, L. Duret, O. Bouton, F. Bedin, H. Perron, B. Mandrand and F. Mallet (1999). "Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family." Journal of virology **73**(2): 1175-1185.
- Blond, J. L., D. Lavillette, V. Cheynet, O. Bouton, G. Oriol, S. Chapel-Fernandes, B. Mandrand, F. Mallet and F. L. Cosset (2000). "An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor." Journal of virology **74**(7): 3321-3329.
- Bocchinfuso, W. P. and K. S. Korach (1997). "Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice." J Mammary Gland Biol Neoplasia **2**(4): 323-334.
- Boller, K., H. König, M. Sauter, N. Mueller-Lantzsch, R. Lower, J. Lower and R. Kurth (1993). "Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV." Virology **196**(1): 349-353.
- Borras, M., L. Hardy, F. Lempereur, A. H. el Khissii, N. Legros, R. Gol-Winkler and G. Leclercq (1994). "Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression." J Steroid Biochem Mol Biol **48**(4): 325-336.

## LITERATUR

- Brodsky, I., B. Foley and D. Gillespie (1993). "Expression of human endogenous retrovirus (HERV-K) in chronic myeloid leukemia." Leukemia & lymphoma **11 Suppl 1**: 119-123.
- Bulayeva, N. N., B. Gametchu and C. S. Watson (2004). "Quantitative measurement of estrogen-induced ERK 1 and 2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways." Steroids **69**(3): 181-192.
- Büscher, K., S. Hahn, M. Hofmann, U. Trefzer, M. Ozel, W. Sterry, J. Lower, R. Lower, R. Kurth and J. Denner (2006). "Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines." Melanoma research **16**(3): 223-234.
- Buscher, K., U. Trefzer, M. Hofmann, W. Sterry, R. Kurth and J. Denner (2005). "Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines." Cancer research **65**(10): 4172-4180.
- Callahan, R., W. Drohan, S. Tronick and J. Schlom (1982). "Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**(18): 5503-5507.
- Castoria, G., A. Migliaccio, A. Bilancio, M. Di Domenico, A. de Falco, M. Lombardi, R. Fiorentino, L. Varricchio, M. V. Barone and F. Auricchio (2001). "PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells." EMBO J **20**(21): 6050-6059.
- Chen, T., Z. Meng, Y. Gan, X. Wang, F. Xu, Y. Gu, X. Xu, J. Tang, H. Zhou, X. Zhang, X. Gan, C. Van Ness, G. Xu, L. Huang, Y. Fang, J. Wu, S. Zheng, J. Jin, W. Huang and R. Xu (2013). "The viral oncogene Np9 acts as a critical molecular switch for co-activating beta-catenin, ERK, Akt and Notch1 and promoting the growth of human leukemia stem/progenitor cells." Leukemia **27**(7): 1469-1478.
- Choi, J. D. and J. S. Lee (2013). "Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer." Genomics Inform **11**(4): 164-173.
- Christensen, T. (2010). "HERVs in neuropathogenesis." Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology **5**(3): 326-335.
- Clausen, J. (2003). "Endogenous retroviruses and MS: using ERVs as disease markers." Int MS J **10**(1): 22-28.
- Coffin, J. M. (1992). "Genetic diversity and evolution of retroviruses." Current topics in microbiology and immunology **176**: 143-164.
- Coffin, J. M., S. H. Hughes and H. E. Varmus (1997). The Interactions of Retroviruses and their Hosts. Retroviruses. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor (NY).
- Colmegna, I. and R. F. Garry (2006). "Role of endogenous retroviruses in autoimmune diseases." Infectious disease clinics of North America **20**(4): 913-929.
- Conley, A. B., W. J. Miller and I. K. Jordan (2008). "Human cis natural antisense transcripts initiated by transposable elements." Trends in genetics : TIG **24**(2): 53-56.
- Conley, A. B., J. Piriyaongsa and I. K. Jordan (2008). "Retroviral promoters in the human genome." Bioinformatics **24**(14): 1563-1567.
- Conrad, B., R. N. Weissmahr, J. Boni, R. Arcari, J. Schupbach and B. Mach (1997). "A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes." Cell **90**(2): 303-313.
- Contreras-Galindo, R., M. H. Kaplan, P. Leissner, T. Verjat, I. Ferlenghi, F. Bagnoli, F. Giusti, M. H. Dosik, D. F. Hayes, S. D. Gitlin and D. M. Markovitz (2008). "Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer." Journal of virology **82**(19): 9329-9336.

## LITERATUR

- Cordonnier, A., J. F. Casella and T. Heidmann (1995). "Isolation of novel human endogenous retrovirus-like elements with foamy virus-related pol sequence." Journal of virology **69**(9): 5890-5897.
- Costas, J. (2002). "Characterization of the intragenomic spread of the human endogenous retrovirus family HERV-W." Mol Biol Evol **19**(4): 526-533.
- D'Abreo, N. and A. A. Hindenburg (2013). "Sex hormone receptors in breast cancer." Vitam Horm **93**: 99-133.
- Dangel, A. W., A. R. Mendoza, B. J. Baker, C. M. Daniel, M. C. Carroll, L. C. Wu and C. Y. Yu (1994). "The dichotomous size variation of human complement C4 genes is mediated by a novel family of endogenous retroviruses, which also establishes species-specific genomic patterns among Old World primates." Immunogenetics **40**(6): 425-436.
- De Pergola, G. and F. Silvestris (2013). "Obesity as a major risk factor for cancer." Journal of obesity **2013**: 291546.
- Denne, M., M. Sauter, V. Armbruester, J. D. Licht, K. Roemer and N. Mueller-Lantsch (2007). "Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein." Journal of virology **81**(11): 5607-5616.
- Dewannieux, M., F. Harper, A. Richaud, C. Letzelter, D. Ribet, G. Pierron and T. Heidmann (2006). "Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements." Genome research **16**(12): 1548-1556.
- Di Cristofano, A., M. Strazzullo, L. Longo and G. La Mantia (1995). "Characterization and genomic mapping of the ZNF80 locus: expression of this zinc-finger gene is driven by a solitary LTR of ERV9 endogenous retroviral family." Nucleic acids research **23**(15): 2823-2830.
- Douville, R. N. and A. Nath (2014). "Human endogenous retroviruses and the nervous system." Handb Clin Neurol **123**: 465-485.
- Duelli, D. and Y. Lazebnik (2003). "Cell fusion: a hidden enemy?" Cancer cell **3**(5): 445-448.
- Dunn, C. A., P. Medstrand and D. L. Mager (2003). "An endogenous retroviral long terminal repeat is the dominant promoter for human beta1,3-galactosyltransferase 5 in the colon." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(22): 12841-12846.
- Dunn, C. A., L. N. van de Lagemaat, G. J. Baillie and D. L. Mager (2005). "Endogenous retrovirus long terminal repeats as ready-to-use mobile promoters: the case of primate beta3GAL-T5." Gene **364**: 2-12.
- Dupressoir, A., C. Lavialle and T. Heidmann (2012). "From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation." Placenta **33**(9): 663-671.
- Ehrlich, M. (2002). "DNA methylation in cancer: too much, but also too little." Oncogene **21**(35): 5400-5413.
- Ejthadi, H. D., J. H. Martin, J. Junying, D. A. Roden, M. Lahiri, P. Warren, P. G. Murray and P. N. Nelson (2005). "A novel multiplex RT-PCR system detects human endogenous retrovirus-K in breast cancer." Archives of virology **150**(1): 177-184.
- Elde, N. C. and H. S. Malik (2009). "The evolutionary conundrum of pathogen mimicry." Nat Rev Microbiol **7**(11): 787-797.
- Faff, O., A. B. Murray, J. Schmidt, C. Leib-Mosch, V. Erfle and R. Hehlmann (1992). "Retrovirus-like particles from the human T47D cell line are related to mouse mammary tumour virus and are of human endogenous origin." J Gen Virol **73** ( Pt 5): 1087-1097.

## LITERATUR

- Feuchter-Murthy, A. E., J. D. Freeman and D. L. Mager (1993). "Splicing of a human endogenous retrovirus to a novel phospholipase A2 related gene." Nucleic acids research **21**(1): 135-143.
- Filardo, E. J. (2002). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **80**(2): 231-238.
- Filardo, E. J., J. A. Quinn, K. I. Bland and A. R. Frackelton, Jr. (2000). "Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via transactivation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF." Mol Endocrinol **14**(10): 1649-1660.
- Fischer, S., N. Echeverria, G. Moratorio, A. I. Landoni, G. Dighiero, J. Cristina, P. Opezzo and P. Moreno (2014). "Human endogenous retrovirus np9 gene is over expressed in chronic lymphocytic leukemia patients." Leuk Res Rep **3**(2): 70-72.
- Flori, A. R., R. Lower, B. J. Schmitz-Drager and W. A. Schulz (1999). "DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas." Br J Cancer **80**(9): 1312-1321.
- Forsman, A., Z. Yun, L. Hu, D. Uzhameckis, P. Jern and J. Blomberg (2005). "Development of broadly targeted human endogenous gammaretroviral pol-based real time PCRs Quantitation of RNA expression in human tissues." Journal of virological methods **129**(1): 16-30.
- Frank, O., M. Giehl, C. Zheng, R. Hehlmann, C. Leib-Mosch and W. Seifarth (2005). "Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders." Journal of virology **79**(17): 10890-10901.
- Frank, O., C. Verbeke, N. Schwarz, J. Mayer, A. Fabarius, R. Hehlmann, C. Leib-Mosch and W. Seifarth (2008). "Variable transcriptional activity of endogenous retroviruses in human breast cancer." Journal of virology **82**(4): 1808-1818.
- Frendo, J. L., D. Olivier, V. Cheynet, J. L. Blond, O. Bouton, M. Vidaud, M. Rabreau, D. Evain-Brion and F. Mallet (2003). "Direct involvement of HERV-W env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation." Molecular and Cellular Biology **23**(10): 3566-3574.
- Gabriel, U., A. Steidler, L. Trojan, M. S. Michel, W. Seifarth and A. Fabarius (2010). "Smoking increases transcription of human endogenous retroviruses in a newly established in vitro cell model and in normal urothelium." AIDS research and human retroviruses **26**(8): 883-888.
- Galli, U. M., M. Sauter, B. Lecher, S. Maurer, H. Herbst, K. Roemer and N. Mueller-Lantzsch (2005). "Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors." Oncogene **24**(19): 3223-3228.
- Girard, A., R. Sachidanandam, G. J. Hannon and M. A. Carmell (2006). "A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins." Nature **442**(7099): 199-202.
- Goering, W., T. Ribarska and W. A. Schulz (2011). "Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer." Carcinogenesis **32**(10): 1484-1492.
- Gogvadze, E., E. Stukacheva, A. Buzdin and E. Sverdlov (2009). "Human-specific modulation of transcriptional activity provided by endogenous retroviral insertions." Journal of virology **83**(12): 6098-6105.
- Golan, M., A. Hizi, J. H. Resau, N. Yaal-Hahoshen, H. Reichman, I. Keydar and I. Tsarfaty (2008). "Human endogenous retrovirus (HERV-K) reverse transcriptase as a breast cancer prognostic marker." Neoplasia **10**(6): 521-533.
- Gonzalez-Hernandez, M. J., J. D. Cavalcoli, M. A. Sartor, R. Contreras-Galindo, F. Meng, M. Dai, D. Dube, A. K. Saha, S. D. Gitlin, G. S. Omenn, M. H. Kaplan and D. M. Markovitz (2014). "Regulation of

## LITERATUR

- the Human Endogenous Retrovirus K (HML-2) Transcriptome by the HIV-1 Tat Protein." J Virol **88**(16): 8924-8935.
- Goodchild, N. L., D. A. Wilkinson and D. L. Mager (1992). "A human endogenous long terminal repeat provides a polyadenylation signal to a novel, alternatively spliced transcript in normal placenta." Gene **121**(2): 287-294.
- Gosenca, D., U. Gabriel, A. Steidler, J. Mayer, O. Diem, P. Erben, A. Fabarius, C. Leib-Mosch, W. K. Hofmann and W. Seifarth (2012). "HERV-E-mediated modulation of PLA2G4A transcription in urothelial carcinoma." PloS one **7**(11): e49341.
- Gotzinger, N., M. Sauter, K. Roemer and N. Mueller-Lantsch (1996). "Regulation of human endogenous retrovirus-K Gag expression in teratocarcinoma cell lines and human tumours." J Gen Virol **77** ( Pt **12**): 2983-2990.
- Griffiths, D. J. (2001). "Endogenous retroviruses in the human genome sequence." Genome biology **2**(6): REVIEWS1017.
- Ha, H., J. Song, S. Wang, A. Kapusta, C. Feschotte, K. C. Chen and J. Xing (2014). "A comprehensive analysis of piRNAs from adult human testis and their relationship with genes and mobile elements." BMC Genomics **15**: 545.
- Hakim, S. T., M. Alsayari, D. C. McLean, S. Saleem, K. C. Addanki, M. Aggarwal, K. Mahalingam and O. Bagasra (2008). "A large number of the human microRNAs target lentiviruses, retroviruses, and endogenous retroviruses." Biochemical and biophysical research communications **369**(2): 357-362.
- Haltmeier, M., W. Seifarth, J. Blusch, V. Erfle, R. Hehlmann and C. Leib-Mosch (1995). "Identification of S71-related human endogenous retroviral sequences with full-length pol genes." Virology **209**(2): 550-560.
- Hatsumi, T. and Y. Yamamuro (2006). "Downregulation of estrogen receptor gene expression by exogenous 17beta-estradiol in the mammary glands of lactating mice." Exp Biol Med (Maywood) **231**(3): 311-316.
- Haupt, S., M. Tisdale, M. Vincendeau, M. A. Clements, D. T. Gauthier, R. Lance, O. J. Semmes, A. Turqueti-Neves, E. Noessner, C. Leib-Mosch and A. D. Greenwood (2011). "Human endogenous retrovirus transcription profiles of the kidney and kidney-derived cell lines." J Gen Virol **92**(Pt 10): 2356-2366.
- Hirschl, S., O. Schanab, H. Seppel, A. Waltenberger, J. Humer, K. Wolff, H. Pehamberger and T. Muster (2007). "Sequence variability of retroviral particles derived from human melanoma cells melanoma-associated retrovirus." Virus Res **123**(2): 211-215.
- Hohenadl, C., H. Germaier, M. Walchner, M. Hagenhofer, M. Herrmann, M. Sturzl, P. Kind, R. Hehlmann, V. Erfle and C. Leib-Mosch (1999). "Transcriptional activation of endogenous retroviral sequences in human epidermal keratinocytes by UVB irradiation." J Invest Dermatol **113**(4): 587-594.
- Hohn, O., K. Hanke and N. Bannert (2013). "HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease." Front Oncol **3**: 246.
- Huang, Q., H. Chen, J. Li, M. Oliver, X. Ma, D. Byck, Y. Gao and S. W. Jiang (2014). "Epigenetic and non-epigenetic regulation of syncytin-1 expression in human placenta and cancer tissues." Cell Signal **26**(3): 648-656.
- Huang, W. J., Z. C. Liu, W. Wei, G. H. Wang, J. G. Wu and F. Zhu (2006). "Human endogenous retroviral pol RNA and protein detected and identified in the blood of individuals with schizophrenia." Schizophrenia research **83**(2-3): 193-199.

## LITERATUR

- Hughes, J. F. and J. M. Coffin (2004). "Human endogenous retrovirus K solo-LTR formation and insertional polymorphisms: implications for human and viral evolution." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(6): 1668-1672.
- Humphreys, R. C., J. Lydon, B. W. O'Malley and J. M. Rosen (1997). "Mammary gland development is mediated by both stromal and epithelial progesterone receptors." Mol Endocrinol **11**(6): 801-811.
- Indik, S., W. H. Gunzburg, P. Kulich, B. Salmons and F. Rouault (2007). "Rapid spread of mouse mammary tumor virus in cultured human breast cells." Retrovirology **4**: 73.
- Izquierdo, L., M. Ingelmo-Torres, C. Mallofre, J. J. Lozano, M. Verhasselt-Crinquette, X. Leroy, P. Colin, E. Comperat, M. Roupert, A. Alcaraz and L. Mengual (2014). "Prognostic value of microRNA expression pattern in upper tract urothelial carcinoma." BJU Int **113**(5): 813-821.
- Jern, P., G. O. Sperber and J. Blomberg (2005). "Use of Endogenous Retroviral Sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy." Retrovirology **2**.
- Jurka, J. (2000). "Repbse update: a database and an electronic journal of repetitive elements." Trends Genet **16**(9): 418-420.
- Kaatsch, P., C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttmann and C. Stegmair (2013). "Krebs in Deutschland 2009/2010." Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin(9. Ausgabe).
- Kalden, J. R. and M. Herrmann (1993). "Autoimmune diseases in humans, e.g. autoimmune rheumatic diseases." Intervirolgy **35**(1-4): 176-185.
- Kapitonov, V. V. and J. Jurka (1999). "The long terminal repeat of an endogenous retrovirus induces alternative splicing and encodes an additional carboxy-terminal sequence in the human leptin receptor." Journal of molecular evolution **48**(2): 248-251.
- Karlsson, H., S. Bachmann, J. Schroder, J. McArthur, E. F. Torrey and R. H. Yolken (2001). "Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(8): 4634-4639.
- Karlsson, H., J. Schroder, S. Bachmann, C. Bottmer and R. H. Yolken (2004). "HERV-W-related RNA detected in plasma from individuals with recent-onset schizophrenia or schizoaffective disorder." Molecular psychiatry **9**(1): 12-13.
- Kassiotis, G. (2014). "Endogenous retroviruses and the development of cancer." Journal of immunology **192**(4): 1343-1349.
- Katalinic, A. and C. Bartel (2006). "Epidemiologie Mammakarzinom." Institut für Krebsepidemiologie e.V. an der Universität zu Lübeck.
- Katoh, I. and S. Kurata (2013). "Association of endogenous retroviruses and long terminal repeats with human disorders." Front Oncol **3**: 234.
- Katzourakis, A., A. Rambaut and O. G. Pybus (2005). "The evolutionary dynamics of endogenous retroviruses." Trends Microbiol **13**(10): 463-468.
- Kelly, M. J. and E. R. Levin (2001). "Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors." Trends Endocrinol Metab **12**(4): 152-156.
- Khodosevich, K. V., B. Lebedev lu and E. D. Sverdlov (2004). "[The tissue-specific methylation of human-specific endogenous retroviral long terminal repeats]." Bioorg Khim **30**(5): 493-498.
- Kibbe, W. A. (2007). "OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator." Nucleic acids research **35**(Web Server issue): W43-W46.

## LITERATUR

- Kim, W. J. and S. C. Bae (2008). "Molecular biomarkers in urothelial bladder cancer." Cancer Sci **99**(4): 646-652.
- Kitamura, M., N. Maruyama, T. Shirasawa, R. Nagasawa, K. Watanabe, M. Tateno and T. Yoshiki (1994). "Expression of an endogenous retroviral gene product in human placenta." International journal of cancer. Journal international du cancer **58**(6): 836-840.
- Kleiman, A., N. Senyuta, A. Tryakin, M. Sauter, A. Karseladze, S. Tjulandin, V. Gurtsevitch and N. Mueller-Lantzsch (2004). "HERV-K(HML-2) GAG/ENV antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumors." Int J Cancer **110**(3): 459-461.
- Klein, C. A. and N. H. Stoecklein (2009). "Lessons from an aggressive cancer: evolutionary dynamics in esophageal carcinoma." Cancer Res **69**(13): 5285-5288.
- Kowalski, P. E., J. D. Freeman and D. L. Mager (1999). "Intergenic splicing between a HERV-H endogenous retrovirus and two adjacent human genes." Genomics **57**(3): 371-379.
- Kulski, J. K. and R. L. Dawkins (1999). "The P5 multicopy gene family in the MHC is related in sequence to human endogenous retroviruses HERV-L and HERV-16." Immunogenetics **49**(5): 404-412.
- La Mantia, G., D. Maglione, G. Pengue, A. Di Cristofano, A. Simeone, L. Lanfrancone and L. Lania (1991). "Identification and characterization of novel human endogenous retroviral sequences preferentially expressed in undifferentiated embryonal carcinoma cells." Nucleic acids research **19**(7): 1513-1520.
- Lamprecht, B., C. Bonifer and S. Mathas (2010). "Repeat-element driven activation of proto-oncogenes in human malignancies." Cell Cycle **9**(21): 4276-4281.
- Lamprecht, B., K. Walter, S. Kreher, R. Kumar, M. Hummel, D. Lenze, K. Kochert, M. A. Bouhrel, J. Richter, E. Soler, R. Stadhouders, K. Johrens, K. D. Wurster, D. F. Callen, M. F. Harte, M. Giefing, R. Barlow, H. Stein, I. Anagnostopoulos, M. Janz, P. N. Cockerill, R. Siebert, B. Dorken, C. Bonifer and S. Mathas (2010). "Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma." Nat Med **16**(5): 571-579, 571p following 579.
- Landry, J. R. and D. L. Mager (2003). "Functional analysis of the endogenous retroviral promoter of the human endothelin B receptor gene." J Virol **77**(13): 7459-7466.
- Landry, J. R., A. Rouhi, P. Medstrand and D. L. Mager (2002). "The Opitz syndrome gene Mid1 is transcribed from a human endogenous retroviral promoter." Molecular biology and evolution **19**(11): 1934-1942.
- Larsen, J. M., I. J. Christensen, H. J. Nielsen, U. Hansen, B. Bjerregaard, J. F. Talts and L. I. Larsson (2009). "Syncytin immunoreactivity in colorectal cancer: potential prognostic impact." Cancer Lett **280**(1): 44-49.
- Lavie, L., M. Kitova, E. Maldener, E. Meese and J. Mayer (2005). "CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2)." J Virol **79**(2): 876-883.
- Lee, J. R., K. Ahn, Y. J. Kim, Y. D. Jung and H. S. Kim (2012). "Radiation-induced human endogenous retrovirus (HERV)-R env gene expression by epigenetic control." Radiat Res **178**(5): 379-384.
- Lee, Y. N. and P. D. Bieniasz (2007). "Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus." Plos Pathogens **3**(1): 119-130.
- Lefebvre, S., B. Hubert, F. Tekaiia, M. Brahic and J. F. Bureau (1995). "Isolation from human brain of six previously unreported cDNAs related to the reverse transcriptase of human endogenous retroviruses." AIDS Res Hum Retroviruses **11**(2): 231-237.

## LITERATUR

- Li, M. D., D. L. Bronson, T. D. Lemke and A. J. Faras (1995). "Restricted expression of new HERV-K members in human teratocarcinoma cells." Virology **208**(2): 733-741.
- Lindeskog, M., P. Medstrand, A. A. Cunningham and J. Blomberg (1998). "Coamplification and dispersion of adjacent human endogenous retroviral HERV-H and HERV-E elements; presence of spliced hybrid transcripts in normal leukocytes." Virology **244**(1): 219-229.
- Liu, A. Y. and B. A. Abraham (1991). "Subtractive cloning of a hybrid human endogenous retrovirus and calbindin gene in the prostate cell line PC3." Cancer research **51**(15): 4107-4110.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lock, F. E., R. Rebollo, K. Miceli-Royer, L. Gagnier, S. Kuah, A. Babaian, M. Sistiaga-Poveda, C. B. Lai, O. Nemirovsky, I. Serrano, C. Steidl, M. M. Karimi and D. L. Mager (2014). "Distinct isoform of FABP7 revealed by screening for retroelement-activated genes in diffuse large B-cell lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(34): E3534-3543.
- Löwer, R., K. Boller, B. Hasenmaier, C. Korbmacher, N. Muller-Lantzsch, J. Lower and R. Kurth (1993). "Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(10): 4480-4484.
- Luppi, P., M. M. Zanone, H. Hyoty, W. A. Rudert, C. Haluszczak, A. M. Alexander, S. Bertera, D. Becker and M. Trucco (2000). "Restricted TCR V beta gene expression and enterovirus infection in type I diabetes: a pilot study." Diabetologia **43**(12): 1484-1497.
- Macfarlane, C. and P. Simmonds (2004). "Allelic variation of HERV-K(HML-2) endogenous retroviral elements in human populations." Journal of molecular evolution **59**(5): 642-656.
- Maeda, N. and H. S. Kim (1990). "Three independent insertions of retrovirus-like sequences in the haptoglobin gene cluster of primates." Genomics **8**(4): 671-683.
- Mager, D. L. (1989). "Polyadenylation function and sequence variability of the long terminal repeats of the human endogenous retrovirus-like family RTVL-H." Virology **173**(2): 591-599.
- Mager, D. L. and P. Medstrand (2003). Retroviral Repeat Sequences. Nature encyclopedia of the human genome. D. Cooper. London, United Kingdom, Nature Publishing Group: 57-63.
- Magin, C., R. Lower and J. Lower (1999). "cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K." Journal of virology **73**(11): 9496-9507.
- Maksakova, I. A., D. L. Mager and D. Reiss (2008). "Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective." Cellular and molecular life sciences : CMLS **65**(21): 3329-3347.
- Maksakova, I. A., M. T. Romanish, L. Gagnier, C. A. Dunn, L. N. van de Lagemaat and D. L. Mager (2006). "Retroviral elements and their hosts: insertional mutagenesis in the mouse germ line." PLoS genetics **2**(1): e2.
- Maliniemi, P., M. Vincendeau, J. Mayer, O. Frank, S. Hahtola, L. Karenko, E. Carlsson, F. Mallet, W. Seifarth, C. Leib-Mosch and A. Ranki (2013). "Expression of human endogenous retrovirus-w including syncytin-1 in cutaneous T-cell lymphoma." PLoS One **8**(10): e76281.
- Malkin, D., F. P. Li, L. C. Strong, J. F. Fraumeni, Jr., C. E. Nelson, D. H. Kim, J. Kassel, M. A. Gryka, F. Z. Bischoff, M. A. Tainsky and et al. (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." Science **250**(4985): 1233-1238.

## LITERATUR

- Mameli, G., V. Astone, G. Arru, S. Marconi, L. Lovato, C. Serra, S. Sotgiu, B. Bonetti and A. Dolei (2007). "Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6." J Gen Virol **88**(Pt 1): 264-274.
- Mangeny, M., M. Renard, G. Schlecht-Louf, I. Bouallaga, O. Heidmann, C. Letzelter, A. Richaud, B. Ducos and T. Heidmann (2007). "Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(51): 20534-20539.
- Manghera, M. and R. N. Douville (2013). "Endogenous retrovirus-K promoter: a landing strip for inflammatory transcription factors?" Retrovirology **10**: 16.
- Marchi, E., A. Kanapin, G. Magiorkinis and R. Belshaw (2014). "Unfixed endogenous retroviral insertions in the human population." J Virol **88**(17): 9529-9537.
- Marquez, D. C. and R. J. Pietras (2001). "Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells." Oncogene **20**(39): 5420-5430.
- Martin, M. A., T. Bryan, S. Rasheed and A. S. Khan (1981). "Identification and cloning of endogenous retroviral sequences present in human DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **78**(8): 4892-4896.
- Masson-Lecomte, A., M. Rava, F. X. Real, A. Hartmann, Y. Allory and N. Malats (2014). "Inflammatory Biomarkers and Bladder Cancer Prognosis: A Systematic Review." Eur Urol.
- Mattick, J. S. (2001). "Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity." EMBO reports **2**(11): 986-991.
- Mayer, J., E. Meese and N. Mueller-Lantzsch (1998). "Human endogenous retrovirus K homologous sequences and their coding capacity in Old World primates." Journal of virology **72**(3): 1870-1875.
- Mayer, J., M. Sauter, A. Racz, D. Scherer, N. Mueller-Lantzsch and E. Meese (1999). "An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7." Nat Genet **21**(3): 257-258.
- McPherson, K., C. M. Steel and J. M. Dixon (2000). "ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics." BMJ **321**(7261): 624-628.
- Medstrand, P. and J. Blomberg (1993). "Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues." Journal of virology **67**(11): 6778-6787.
- Medstrand, P., J. R. Landry and D. L. Mager (2001). "Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans." The Journal of biological chemistry **276**(3): 1896-1903.
- Medstrand, P., D. L. Mager, H. Yin, U. Dietrich and J. Blomberg (1997). "Structure and genomic organization of a novel human endogenous retrovirus family: HERV-K (HML-6)." The Journal of general virology **78** ( Pt 7): 1731-1744.
- Menendez, L., B. B. Benigno and J. F. McDonald (2004). "L1 and HERV-W retrotransposons are hypomethylated in human ovarian carcinomas." Molecular cancer **3**: 12.
- Mi, S., X. Lee, X. P. Li, G. M. Veldman, H. Finnerty, L. Racie, E. LaVallie, X. Y. Tang, P. Edouard, S. Howes, J. C. Keith and J. M. McCoy (2000). "Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis." Nature **403**(6771): 785-789.
- Mikkelsen, T. S., M. Ku, D. B. Jaffe, B. Issac, E. Lieberman, G. Giannoukos, P. Alvarez, W. Brockman, T. K. Kim, R. P. Koche, W. Lee, E. Mendenhall, A. O'Donovan, A. Presser, C. Russ, X. Xie, A.

## LITERATUR

- Meissner, M. Wernig, R. Jaenisch, C. Nusbaum, E. S. Lander and B. E. Bernstein (2007). "Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells." Nature **448**(7153): 553-560.
- Moore, R., M. Dixon, R. Smith, G. Peters and C. Dickson (1987). "Complete nucleotide sequence of a milk-transmitted mouse mammary tumor virus: two frameshift suppression events are required for translation of gag and pol." J Virol **61**(2): 480-490.
- Moyes, D., D. J. Griffiths and P. J. Venables (2007). "Insertional polymorphisms: a new lease of life for endogenous retroviruses in human disease." Trends in genetics : TIG **23**(7): 326-333.
- Mullins, C. S. and M. Linnebacher (2012). "Endogenous retrovirus sequences as a novel class of tumor-specific antigens: an example of HERV-H env encoding strong CTL epitopes." Cancer immunology, immunotherapy : CII **61**(7): 1093-1100.
- Mullins, C. S. and M. Linnebacher (2012). "Human endogenous retroviruses and cancer: causality and therapeutic possibilities." World journal of gastroenterology : WJG **18**(42): 6027-6035.
- Muradrasoli, S., A. Forsman, L. Hu, V. Blikstad and J. Blomberg (2006). "Development of real-time PCRs for detection and quantitation of human MMTV-like (HML) sequences HML expression in human tissues." Journal of virological methods **136**(1-2): 83-92.
- Muster, T., A. Waltenberger, A. Grassauer, S. Hirschl, P. Caucig, I. Romirer, D. Fodinger, H. Seppel, O. Schanab, C. Magin-Lachmann, R. Lower, B. Jansen, H. Pehamberger and K. Wolff (2003). "An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells." Cancer research **63**(24): 8735-8741.
- Nowell, P. and D. Hungerford (1960). "A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia [abstract]." Science **132**:1497.
- Okahara, G., S. Matsubara, T. Oda, J. Sugimoto, Y. Jinno and F. Kanaya (2004). "Expression analyses of human endogenous retroviruses (HERVs): tissue-specific and developmental stage-dependent expression of HERVs." Genomics **84**(6): 982-990.
- Ono, M., M. Kawakami and H. Ushikubo (1987). "Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D." J Virol **61**(6): 2059-2062.
- Ono, M., T. Yasunaga, T. Miyata and H. Ushikubo (1986). "Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome." Journal of virology **60**(2): 589-598.
- Palmarini, M., J. M. Sharp, M. de las Heras and H. Fan (1999). "Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep." J Virol **73**(8): 6964-6972.
- Pavlicek, A., J. Paces, D. Elleder and J. Hejnar (2002). "Processed pseudogenes of human endogenous retroviruses generated by LINEs: their integration, stability, and distribution." Genome Res **12**(3): 391-399.
- Pece, S., M. Serresi, E. Santolini, M. Capra, E. Hulleman, V. Galimberti, S. Zurrada, P. Maisonneuve, G. Viale and P. P. Di Fiore (2004). "Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis." J Cell Biol **167**(2): 215-221.
- Perron, H., J. A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. ParanhosBaccala, F. KomurianPradel, F. Mallet, P. W. Tuke, C. Voisset, J. L. Blond, B. Lalande, J. M. Seigneurin and B. Mandrand (1997). "Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(14): 7583-7588.
- Perron, H. and A. Lang (2010). "The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation." Clinical reviews in allergy & immunology **39**(1): 51-61.

## LITERATUR

- Portis, J. L. (2002). "Perspectives on the role of endogenous human retroviruses in autoimmune diseases." Virology **296**(1): 1-5.
- Query, C. C. and J. D. Keene (1987). "A human autoimmune protein associated with U1 RNA contains a region of homology that is cross-reactive with retroviral p30gag antigen." Cell **51**(2): 211-220.
- Radonic, A., S. Thulke, I. M. Mackay, O. Landt, W. Siegert and A. Nitsche (2004). "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR." Biochem Biophys Res Commun **313**(4): 856-862.
- Reiss, D., Y. Zhang and D. L. Mager (2007). "Widely variable endogenous retroviral methylation levels in human placenta." Nucleic acids research **35**(14): 4743-4754.
- Repaske, R., P. E. Steele, R. R. O'Neill, A. B. Rabson and M. A. Martin (1985). "Nucleotide sequence of a full-length human endogenous retroviral segment." J Virol **54**(3): 764-772.
- Reus, K., J. Mayer, M. Sauter, H. Zischler, N. Muller-Lantzsch and E. Meese (2001). "HERV-K(OLD): ancestor sequences of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2)." Journal of virology **75**(19): 8917-8926.
- Reynolds, P., S. Hurley, D. E. Goldberg, H. Anton-Culver, L. Bernstein, D. Deapen, P. L. Horn-Ross, D. Peel, R. Pinder, R. K. Ross, D. West, W. E. Wright and A. Ziogas (2004). "Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: evidence from the California Teachers Study." Journal of the National Cancer Institute **96**(1): 29-37.
- Rhyu, D. W., Y. J. Kang, M. S. Ock, J. W. Eo, Y. H. Choi, W. J. Kim, S. H. Leem, J. M. Yi, H. S. Kim and H. J. Cha (2014). "Expression of human endogenous retrovirus env genes in the blood of breast cancer patients." Int J Mol Sci **15**(6): 9173-9183.
- Riester, M., J. M. Taylor, A. Feifer, T. Koppie, J. E. Rosenberg, R. J. Downey, B. H. Bochner and F. Michor (2012). "Combination of a novel gene expression signature with a clinical nomogram improves the prediction of survival in high-risk bladder cancer." Clin Cancer Res **18**(5): 1323-1333.
- Roebke, C., S. Wahl, G. Laufer, C. Stadelmann, M. Sauter, N. Mueller-Lantzsch, J. Mayer and K. Ruprecht (2010). "An N-terminally truncated envelope protein encoded by a human endogenous retrovirus W locus on chromosome Xq22.3." Retrovirology **7**: 69.
- Romanish, M. T., C. J. Cohen and D. L. Mager (2010). "Potential mechanisms of endogenous retroviral-mediated genomic instability in human cancer." Seminars in cancer biology **20**(4): 246-253.
- Rous, P. (1910). "A Transmissible Avian Neoplasm. (Sarcoma of the Common Fowl)." The Journal of experimental medicine **12**(5): 696-705.
- Rous, P. (1911). "A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells." The Journal of experimental medicine **13**(4): 397-411.
- Roy, M., W. S. Pear and J. C. Aster (2007). "The multifaceted role of Notch in cancer." Curr Opin Genet Dev **17**(1): 52-59.
- Ruprecht, K., H. Ferreira, A. Flockerzi, S. Wahl, M. Sauter, J. Mayer and N. Mueller-Lantzsch (2008). "Human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) RNA transcripts are selectively packaged into retroviral particles produced by the human germ cell tumor line Tera-1 and originate mainly from a provirus on chromosome 22q11.21." J Virol **82**(20): 10008-10016.
- Ruprecht, K., J. Mayer, M. Sauter, K. Roemer and N. Mueller-Lantzsch (2008). "Endogenous retroviruses and cancer." Cell Mol Life Sci **65**(21): 3366-3382.
- Saceda, M., R. K. Lindsey, H. Solomon, S. V. Angeloni and M. B. Martin (1998). "Estradiol regulates estrogen receptor mRNA stability." J Steroid Biochem Mol Biol **66**(3): 113-120.

## LITERATUR

- Sambrook, J., E. V. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning - a laboratory manual., Cold Spring Harbour Press.
- Schiavetti, F., J. Thonnard, D. Colau, T. Boon and P. G. Coulie (2002). "A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes." Cancer research **62**(19): 5510-5516.
- Schmitt, K. (2014). "Identifizierung und Charakterisierung transkribierter Loci der humanen endogenen Retrovirus-Gruppen HERV-K(HML-2) und HERV-W im Kontext von Tumorerkrankungen und Multipler Sklerose." Universität des Saarlandes.
- Schmitt, K., J. Reichrath, A. Roesch, E. Meese and J. Mayer (2013). "Transcriptional profiling of human endogenous retrovirus group HERV-K(HML-2) loci in melanoma." Genome Biol Evol **5**(2): 307-328.
- Schmitt, K., C. Richter, C. Backes, E. Meese, K. Ruprecht and J. Mayer (2013). "Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus group HERV-W locus transcription in multiple sclerosis brain lesions by high-throughput amplicon sequencing." J Virol **87**(24): 13837-13852.
- Schön, U., O. Diem, L. Leitner, W. H. Gunzburg, D. L. Mager, B. Salmons and C. Leib-Mosch (2009). "Human endogenous retroviral long terminal repeat sequences as cell type-specific promoters in retroviral Vektors." Journal of virology **83**(23): 12643-12650.
- Schulte, A. M., S. Lai, A. Kurtz, F. Czubyko, A. T. Riegel and A. Wellstein (1996). "Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14759-14764.
- Schulte, A. M., C. Malerczyk, R. Cabal-Manzano, J. J. Gajarsa, H. J. List, A. T. Riegel and A. Wellstein (2000). "Influence of the human endogenous retrovirus-like element HERV-E.PTN on the expression of growth factor pleiotrophin: a critical role of a retroviral Sp1-binding site." Oncogene **19**(35): 3988-3998.
- Seifarth, W., C. Baust, A. Murr, H. Skladny, F. Krieg-Schneider, J. Blusch, T. Werner, R. Hehlmann and C. Leib-Mosch (1998). "Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles." J Virol **72**(10): 8384-8391.
- Seifarth, W., O. Frank, U. Zeilfelder, B. Spiess, A. D. Greenwood, R. Hehlmann and C. Leib-Mosch (2005). "Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray." Journal of virology **79**(1): 341-352.
- Seifarth, W., U. Krause, C. Hohenadl, C. Baust, R. Hehlmann and C. Leib-Mosch (2000). "Rapid identification of all known retroviral reverse transcriptase sequences with a novel versatile detection assay." AIDS Res Hum Retroviruses **16**(8): 721-729.
- Seifarth, W., H. Skladny, F. Krieg-Schneider, A. Reichert, R. Hehlmann and C. Leib-Mosch (1995). "Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences." J Virol **69**(10): 6408-6416.
- Seifarth, W., B. Spiess, U. Zeilfelder, C. Speth, R. Hehlmann and C. Leib-Mosch (2003). "Assessment of retroviral activity using a universal retrovirus chip." J Virol Methods **112**(1-2): 79-91.
- Seifarth, W. F., O. Frank, J. Schreml and C. Leib-Mösch (2009). RetroArray - a comprehensive diagnostic DNA chip for rapid detection and identification of retroviruses, retroviral contaminants, and mistaken identity of cell lines. New York, Nova Science Publishers.
- Shih, A., R. Misra and M. G. Rush (1989). "Detection of multiple, novel reverse transcriptase coding sequences in human nucleic acids: relation to primate retroviruses." J Virol **63**(1): 64-75.
- Shoker, B. S., C. Jarvis, D. R. Sibson, C. Walker and J. P. Sloane (1999). "Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast." J Pathol **188**(3): 237-244.

## LITERATUR

- Simon, M., M. Haltmeier, G. Papakonstantinou, T. Werner, R. Hehlmann and C. Leib-Mosch (1994). "Transcription of HERV-K-related LTRs in human placenta and leukemic cells." Leukemia **8 Suppl 1**: S12-17.
- Sin, H. S., J. W. Huh, D. S. Kim, D. W. Kang, D. S. Min, T. H. Kim, H. S. Ha, H. H. Kim, S. Y. Lee and H. S. Kim (2006). "Transcriptional control of the HERV-H LTR element of the GSDML gene in human tissues and cancer cells." Archives of virology **151**(10): 1985-1994.
- Sin, H. S., J. W. Huh, D. S. Kim, T. H. Kim, H. S. Ha, W. Y. Kim, H. K. Park, C. M. Kim and H. S. Kim (2006). "Endogenous retrovirus-related sequences provide an alternative transcript of MCJ genes in human tissues and cancer cells." Genes & genetic systems **81**(5): 333-339.
- Smit, A. F. (1993). "Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons." Nucleic acids research **21**(8): 1863-1872.
- Song, R. X., R. A. McPherson, L. Adam, Y. Bao, M. Shupnik, R. Kumar and R. J. Santen (2002). "Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation." Mol Endocrinol **16**(1): 116-127.
- Sperber, G. O., T. Airola, P. Jern and J. Blomberg (2007). "Automated recognition of retroviral sequences in genomic data--RetroTector." Nucleic Acids Res **35**(15): 4964-4976.
- Stauffer, Y., S. Marguerat, F. Meylan, C. Ucla, N. Sutkowski, B. Huber, T. Pelet and B. Conrad (2001). "Interferon-alpha-induced endogenous superantigen. a model linking environment and autoimmunity." Immunity **15**(4): 591-601.
- Stauffer, Y., G. Theiler, P. Sperisen, Y. Lebedev and C. V. Jongeneel (2004). "Digital expression profiles of human endogenous retroviral families in normal and cancerous tissues." Cancer immunity **4**: 2.
- Stengel, S., U. Fiebig, R. Kurth and J. Denner (2010). "Regulation of human endogenous retrovirus-K expression in melanomas by CpG methylation." Genes, chromosomes & cancer **49**(5): 401-411.
- Stoica, G. E., T. F. Franke, M. Moroni, S. Mueller, E. Morgan, M. C. Iann, A. D. Winder, R. Reiter, A. Wellstein, M. B. Martin and A. Stoica (2003). "Effect of estradiol on estrogen receptor-alpha gene expression and activity can be modulated by the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway." Oncogene **22**(39): 7998-8011.
- Stoica, G. E., T. F. Franke, A. Wellstein, F. Czubyko, H. J. List, R. Reiter, E. Morgan, M. B. Martin and A. Stoica (2003). "Estradiol rapidly activates Akt via the ErbB2 signaling pathway." Mol Endocrinol **17**(5): 818-830.
- Strick, R., S. Ackermann, M. Langbein, J. Swiatek, S. W. Schubert, S. Hashemolhosseini, T. Koscheck, P. A. Fasching, R. L. Schild, M. W. Beckmann and P. L. Strissel (2007). "Proliferation and cell-cell fusion of endometrial carcinoma are induced by the human endogenous retroviral Syncytin-1 and regulated by TGF-beta." J Mol Med (Berl) **85**(1): 23-38.
- Strissel, P. L., M. Ruebner, F. Thiel, D. Wachter, A. B. Ekici, F. Wolf, F. Thieme, K. Ruprecht, M. W. Beckmann and R. Strick (2012). "Reactivation of codogenic endogenous retroviral (ERV) envelope genes in human endometrial carcinoma and prestages: Emergence of new molecular targets." Oncotarget **3**(10): 1204-1219.
- Subramanian, R. P., J. H. Wildschutte, C. Russo and J. M. Coffin (2011). "Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses." Retrovirology **8**: 90.
- Suggs, S. V., T. Hirose, E. H. Myake, K. M.J., K. I. Johnson and R. B. Wallace (1981). ICN-UCLA symposium for developmental biology using purified gene. D. D. Brown. New York, Academic Press. **23**: 683-693.

## LITERATUR

- Sutkowski, N., B. Conrad, D. A. Thorley-Lawson and B. T. Huber (2001). "Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen." Immunity **15**(4): 579-589.
- Sverdlov, E. e. (2005). "Retroviruses and primate genome evolution." Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA.
- Szpakowski, S., X. Sun, J. M. Lage, A. Dyer, J. Rubinstein, D. Kowalski, C. Sasaki, J. Costa and P. M. Lizardi (2009). "Loss of epigenetic silencing in tumors preferentially affects primate-specific retroelements." Gene **448**(2): 151-167.
- Tai, C. K. and N. Kasahara (2008). "Replication-competent retrovirus Vektors for cancer gene therapy." Front Biosci **13**: 3083-3095.
- Tarlinton, R. E., J. Meers and P. R. Young (2006). "Retroviral invasion of the koala genome." Nature **442**(7098): 79-81.
- Ting, C. N., M. P. Rosenberg, C. M. Snow, L. C. Samuelson and M. H. Meisler (1992). "Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene." Genes & development **6**(8): 1457-1465.
- Tomita, N., A. Horii, S. Doi, H. Yokouchi, M. Ogawa, T. Mori and K. Matsubara (1990). "Transcription of human endogenous retroviral long terminal repeat (LTR) sequence in a lung cancer cell line." Biochemical and biophysical research communications **166**(1): 1-10.
- Tomlins, S. A., B. Laxman, S. M. Dhanasekaran, B. E. Helgeson, X. Cao, D. S. Morris, A. Menon, X. Jing, Q. Cao, B. Han, J. Yu, L. Wang, J. E. Montie, M. A. Rubin, K. J. Pienta, D. Roulston, R. B. Shah, S. Varambally, R. Mehra and A. M. Chinnaiyan (2007). "Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer." Nature **448**(7153): 595-599.
- Toufaily, C., S. Landry, C. Leib-Mosch, E. Rassart and B. Barbeau (2011). "Activation of LTRs from different human endogenous retrovirus (HERV) families by the HTLV-1 tax protein and T-cell activators." Viruses **3**(11): 2146-2159.
- Trejbalova, K., J. Blazkova, M. Matouskova, D. Kucerova, L. Pecnova, Z. Vernerova, J. Heracek, I. Hirsch and J. Hejnar (2011). "Epigenetic regulation of transcription and splicing of syncytins, fusogenic glycoproteins of retroviral origin." Nucleic Acids Res **39**(20): 8728-8739.
- Tristem, M. (2000). "Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database." J Virol **74**(8): 3715-3730.
- Van Beveren, C., J. A. Galleshaw, V. Jonas, A. J. Berns, R. F. Doolittle, D. J. Donoghue and I. M. Verma (1981). "Nucleotide sequence and formation of the transforming gene of a mouse sarcoma virus." Nature **289**(5795): 258-262.
- Vincendeau, M., J. M. H. Schreml, A. Ngouno, J. Mayer, I. Göttesdorfer, A. D. Greenwood, S. Kramer, W. Seifarth, K. Hadian, R. Brack-Werner and C. Leib-Mösch (2014). "Modulation of human endogenous retrovirus (HERV) transcription during persistent and de novo HIV-1 infection. ." Retrovirology **under Revision**.
- Wang-Johanning, F., A. R. Frost, B. Jian, L. Epp, D. W. Lu and G. L. Johanning (2003). "Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer." Oncogene **22**(10): 1528-1535.
- Wang-Johanning, F., A. R. Frost, G. L. Johanning, M. B. Khazaeli, A. F. LoBuglio, D. R. Shaw and T. V. Strong (2001). "Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **7**(6): 1553-1560.

## LITERATUR

- Wang-Johanning, F., M. Li, F. J. Esteva, K. R. Hess, B. Yin, K. Rycaj, J. B. Plummer, J. G. Garza, S. Ambs and G. L. Johanning (2014). "Human endogenous retrovirus type K antibodies and mRNA as serum biomarkers of early-stage breast cancer." International journal of cancer. Journal international du cancer **134**(3): 587-595.
- Wang-Johanning, F., J. Liu, K. Rycaj, M. Huang, K. Tsai, D. G. Rosen, D. T. Chen, D. W. Lu, K. F. Barnhart and G. L. Johanning (2007). "Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer." Int J Cancer **120**(1): 81-90.
- Wang-Johanning, F., L. Radvanyi, K. Rycaj, J. B. Plummer, P. Yan, K. J. Sastry, C. J. Piyathilake, K. K. Hunt and G. L. Johanning (2008). "Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients." Cancer research **68**(14): 5869-5877.
- Wang-Johanning, F., K. Rycaj, J. B. Plummer, M. Li, B. Yin, K. Frerich, J. G. Garza, J. Shen, K. Lin, P. Yan, S. A. Glynn, T. H. Dorsey, K. K. Hunt, S. Ambs and G. L. Johanning (2012). "Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-K envelope protein antibodies in targeting breast tumors." Journal of the National Cancer Institute **104**(3): 189-210.
- Weis, S., I. C. Llenos, S. Sabunciyani, J. R. Dulay, L. Isler, R. Yolken and H. Perron (2007). "Reduced expression of human endogenous retrovirus (HERV)-W GAG protein in the cingulate gyrus and hippocampus in schizophrenia, bipolar disorder, and depression." Journal of Neural Transmission **114**(5): 645-655.
- Wentzensen, N., J. F. Coy, H. P. Knaebel, M. Linnebacher, B. Wilz, J. Gebert and M. von Knebel Doeberitz (2007). "Expression of an endogenous retroviral sequence from the HERV-H group in gastrointestinal cancers." International journal of cancer. Journal international du cancer **121**(7): 1417-1423.
- Wentzensen, N., B. Wilz, P. Findeisen, R. Wagner, W. Dippold, M. von Knebel Doeberitz and J. Gebert (2004). "Identification of differentially expressed genes in colorectal adenoma compared to normal tissue by suppression subtractive hybridization." International journal of oncology **24**(4): 987-994.
- Wildschutte, J. H., D. Ram, R. Subramanian, V. L. Stevens and J. M. Coffin (2014). "The distribution of insertionally polymorphic endogenous retroviruses in breast cancer patients and cancer-free controls." Retrovirology **11**: 62.
- Wilson-Edell, K. A., A. Kehasse, G. K. Scott, C. Yau, D. E. Rothschild, B. Schilling, B. S. Gabriel, M. A. Yevtushenko, I. M. Hanson, J. M. Held, B. W. Gibson and C. C. Benz (2014). "RPL24: a potential therapeutic target whose depletion or acetylation inhibits polysome assembly and cancer cell growth." Oncotarget **5**(13): 5165-5176.
- Witzany, G. (2009). "Noncoding RNAs: persistent viral agents as modular tools for cellular needs." Annals of the New York Academy of Sciences **1178**: 244-267.
- Xiong, Y. and T. H. Eickbush (1988). "Similarity of reverse transcriptase-like sequences of viruses, transposable elements, and mitochondrial introns." Molecular biology and evolution **5**(6): 675-690.
- Yin, H., P. Medstrand, M. L. Andersson, A. Borg, H. Olsson and J. Blomberg (1997). "Transcription of human endogenous retroviral sequences related to mouse mammary tumor virus in human breast and placenta: similar pattern in most malignant and nonmalignant breast tissues." AIDS research and human retroviruses **13**(6): 507-516.
- Yin, H., P. Medstrand, A. Kristofferson, U. Dietrich, P. Aman and J. Blomberg (1999). "Characterization of human MMTV-like (HML) elements similar to a sequence that was highly expressed in a human breast cancer: further definition of the HML-6 group." Virology **256**(1): 22-35.
- Yolken, R. H., H. Karlsson, F. Yee, N. L. Johnston-Wilson and E. F. Torrey (2000). "Endogenous retroviruses and schizophrenia." Brain research. Brain research reviews **31**(2-3): 193-199.

## LITERATUR

- Yolken, R. H. and E. F. Torrey (1995). "Viruses, schizophrenia, and bipolar disorder." Clinical microbiology reviews **8**(1): 131-145.
- Yu, H., T. Liu, Z. Zhao, Y. Chen, J. Zeng, S. Liu and F. Zhu (2013). "Mutations in 3'-long terminal repeat of HERV-W family in chromosome 7 upregulate syncytin-1 expression in urothelial cell carcinoma of the bladder through interacting with c-Myb." Oncogene.
- Zhao, J., K. Rycaj, S. Geng, M. Li, J. B. Plummer, B. Yin, H. Liu, X. Xu, Y. Zhang, Y. Yan, S. A. Glynn, T. H. Dorsey, S. Ambs, G. L. Johanning, L. Gu and F. Wang-Johanning (2011). "Expression of Human Endogenous Retrovirus Type K Envelope Protein is a Novel Candidate Prognostic Marker for Human Breast Cancer." Genes Cancer **2**(9): 914-922.
- Zsiros, J., M. F. Jebbink, P. A. Voute and B. Berkhout (1998). "Identification of novel human endogenous retroviral sequences belonging to the HERV-K family." AIDS Res Hum Retroviruses **14**(12): 1093-1098.

## 11. Danksagung

Vielen Dank an...

Christine Leib-Mösch für die wunderbare Zusammenarbeit, Betreuung, Unterstützung und ihren Rat während der ganzen Promotionszeit.

Iris Antes, die sich dazu bereit erklärt hat meine Arbeit an der Hochschule zu betreuen.

Dmitrij Frishman für die nette Zusammenarbeit sowie für die Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission.

Jens Mayer für die tolle Zusammenarbeit, Unterstützung und die Betreuung im thesis committee.

Katja Schmitt, Beyhan Ataseven, Leonore Thümer, Dieter Hoffmann und Kerstin Haase für die tollen Kooperationsprojekte und Zusammenarbeit.

all meine Kollegen, Kristin, Stephan, Karen, Sascha, Christine, Stephanie, Herwig, Sebastian, Markus, Olivia und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Virologie am HMGU, für die super Zusammenarbeit und die schöne Zeit, die ich mit Euch verbringen durfte.

Regina, Karin und Jutta für die ausgezeichnete Hilfe in bürokratischen Angelegenheiten und in der Spülküche.

Marion, Malena, Lisa und Nadine für die angenehme Zusammenarbeit.

Martha und meine Familie, die mich stets liebevoll unterstützt und mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Ihr habt mich stets motiviert und angespornt und dadurch zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen.