

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
am Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

**Prävalenzen der humanen endogenen Retroviren
K113 und K115
bei Patienten mit
akuter/chronischer Leukämie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annette Sternberg
aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. T. Burmeister
 2. Prof. Dr. Mi. Hummel
 3. Prof. Dr. med. H. Rieder

Datum der Promotion: 07.09.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
I Einleitung.....	1
I.1 Retroviren (RV)	1
I.2 Klassifikation der Retroviren	1
I.3 Morphologie der Retroviren.....	2
I.4 Genetik der Retroviren.....	3
I.5 Humane endogene Retroviren.....	6
I.6 Beschreibung von HERV-K.....	9
I.7 HERV-K113 und HERV-K115	10
I.8 Klassifikation der Leukämien	12
I.9 Zielsetzung der Arbeit.....	12
II Material und Methoden.....	14
II.1 Patienten-Proben	14
II.2 DNA-Isolierung.....	14
II.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure	15
II.4 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	15
II.4.1 Oligonukleotid-Sequenzen (Primer).....	15
II.4.2 Primer-Paare für die konventionelle PCR	16
II.4.3 PCR-Reaktionsansatz	17
II.4.4 Cyclor-Programme	17
II.5 Auftrennung der DNA- Fragmente im Agarosegel	18
II.6 Wahl der Primer	19
II.7 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR).....	20
II.7.1 Oligonukleotidsequenzen (Primer / Sonden)	21
II.7.2 Primer/ Sonden-Paare	21

Inhaltsverzeichnis	IV
II.7.3 Reaktionsansatz für qPCR.....	22
II.7.4 qPCR Programm:.....	23
II.8 Reaktionsablauf.....	23
II.9 Verdünnungsreihe	25
III Ergebnisse	27
III.1 Proben der Leukämiepatienten.....	27
III.2 Ergebnisse der PCR-Schemata.....	27
III.3 Auftrennung im Agarosegel.....	30
III.4 Vergleichsgruppe	31
III.5 Auswertung	33
III.6 Quantitative Real-Time-PCR.....	34
III.7 Verdünnungsreihe	34
IV Diskussion	37
V Zusammenfassung.....	40
VI Literaturverzeichnis	41
VII Anhang	45
VII.1 Tabellenverzeichnis.....	45
VII.2 Abbildungsverzeichnis	45
VII.3 Abkürzungen.....	46

I Einleitung

I.1 Retroviren (RV)

Die Retroviren (*Retroviridae*, RV) bilden eine große und bedeutende Familie der Viren. Sie sind die einzigen RNA-Viren mit einem polyfunktionalen Enzym, der Reversen Transkriptase, das es ihnen erlaubt, sich regulär in ein Wirtsgenom zu integrieren. Es ist seit langem bekannt, dass Retroviren auch Krebserkrankungen verursachen können. Ein Zusammenhang zwischen Retroviren und Tumorerkrankungen konnte erstmals für das Rous-Sarkom-Virus (RSV) bei Hühnern (Rous P, 1910) und für das Maus-Mammatumovirus (MMTV) (Bittner JJ, 1936) bei Mäusen nachgewiesen werden. Bittner konnte zeigen, dass das Virus nicht nur auf exogenem Wege durch die von der Zelle freigesetzten viralen Partikel (horizontale Infektion), sondern auch auf endogenem Wege, als Bestandteil des Genoms von Keimbahnzellen auf die Folgegeneration (vertikale Infektion) übertragen werden kann (Bittner JJ, 1936).

Bisher wurden vier humanpathogene Retroviren entdeckt: die humanen T-Zell-lymphotropen Viren 1 und 2 (HTLV-1/-2) (Kalyanaraman VS et al, 1982; Poiesz BJ et al, 1980) und die humanen Immundefizienzviren (HIV-1/-2) (Barré-Sinoussi F et al, 1983). HTLV-1 ist der Erreger sowohl der adulten T-Zell-Leukämie (ATL) als auch der tropischen spastischen Paraparese (TSP) bzw. der HTLV-1-assoziierten Myelopathie (HAM) beim Menschen. Erkrankungen durch das seltene HTLV-2 sind bisher nicht sicher belegt. Das HI-Virus löst beim Menschen die Immunschwächekrankheit AIDS aus.

I.2 Klassifikation der Retroviren

Die Retroviren wurden früher in drei Gruppen unterteilt: Onkoviren (z. B. Maus-Leukämievirus), Lentiviren (z. B. die humanen Immundefizienzviren 1 und 2, HIV-1/-2) und Spumaviren.

Aufgrund der heute bekannten morphologischen und genetischen Unterschiede wird die Familie der *Retroviridae* vom *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) derzeit in sieben Genera eingeteilt (siehe Tabelle I-1).

Tabelle I-1: Klassifizierung der Retroviren

GENUS	Vertreter/ Beispiele	<i>Besonderheiten/asso- ziierte Krankheiten</i>
Alpharetrovirus	- Rous-Sarkom-Virus - aviäres Leukämie-Virus	B-Zell-Lymphom/Leukämie bei Vögeln
Betaretrovirus	Maus-Mammatumovirus (MMTV)	Mammatumor bei Mäusen
Gammaretrovirus	Murines Leukämie-Virus (MLV)	Leukämie bei Mäusen
Deltaretrovirus	HTLV-1/2	Adulte T-Zell-Leukämie
Epsilonretrovirus	Walleye Dermal Sarcoma- Virus	benigner saisonaler Tumor bei Fischen
Lentivirus	Humanes Immundefizienz- virus (HIV)	chronischer Immundefekt
Spumavirus	Bovines und Felines Spumavirus	keine Assoziation mit einem Krankheitsbild bekannt

Gifford R, Tristem M, 2003

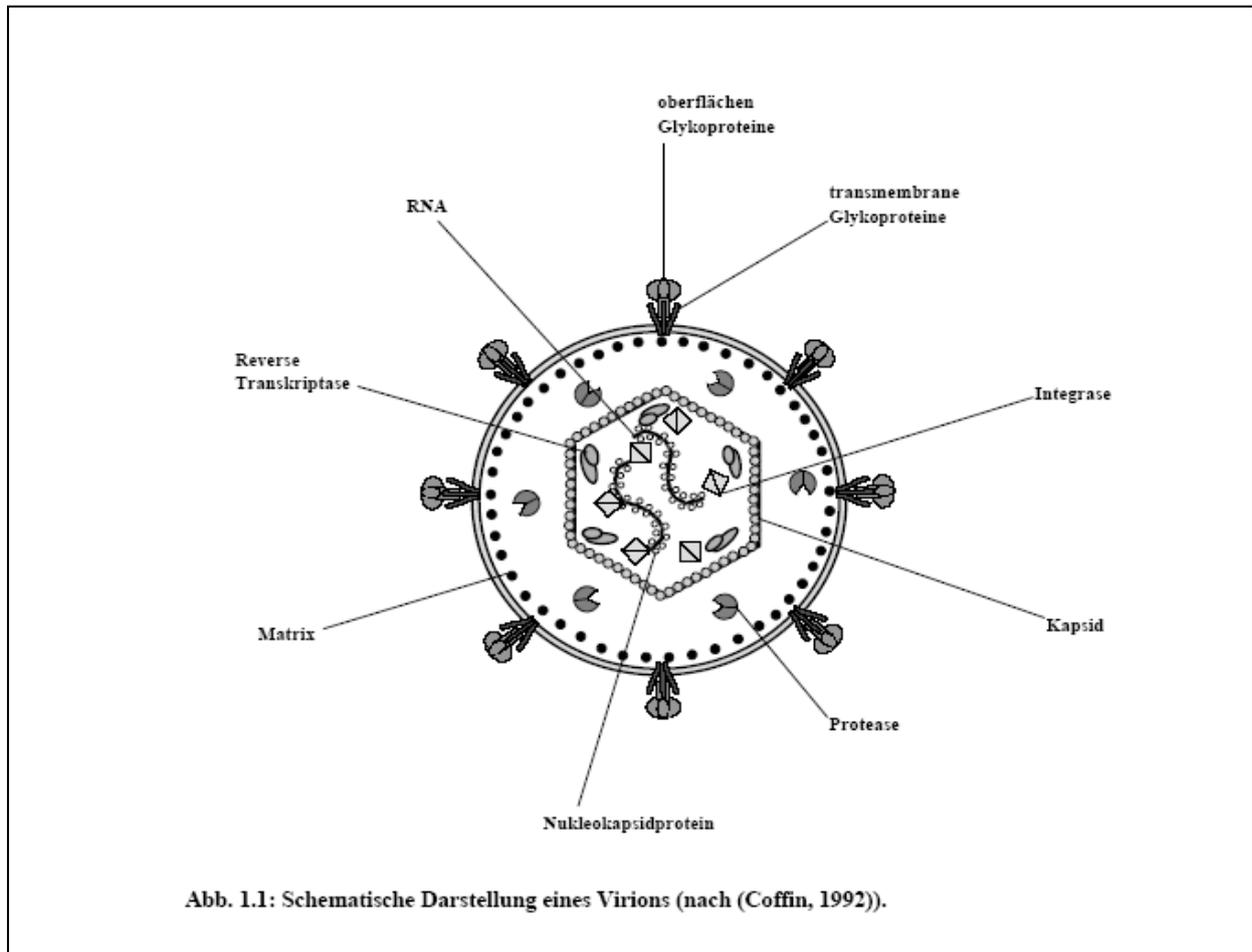
I.3 Morphologie der Retroviren

Die Retroviren haben einen Durchmesser von ungefähr 120 nm und ähneln sich in ihrem Aufbau und Lebenszyklus. Das innere Kapsid schließt die viralen Enzyme und das Genom ein. Das Virusgenom liegt als Komplex mit den Nukleokapsidproteinen vor und ist umgeben von der Reversen Transkriptase (RT) und der Integrase. Die Hüllmembran stammt von der Plasmamembran der Wirtszelle. Sie enthält virusspezifische Glykoproteine, die entweder als Transmembranproteine in der Membran liegen oder als Oberflächenproteine außen mit der Hülle assoziiert sind.

Über diese Glykoproteine vermittelt erfolgt die Fusion mit der Zielzelle. Während die Oberflächenproteine für die Adsorption des Virus an die Wirtszelle zuständig sind, steuern Transmembranproteine die Fusion des Virus mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Die An- bzw. Abwesenheit eines geeigneten Rezeptors auf der Zielzelle legt fest, ob die Zelle von einem be-

stimmten Virus infiziert wird. Die Rezeptoren, die die RV zur Aufnahme in die Wirtszelle verwenden, sind normale physiologische Zellproteine (siehe Abbildung I-1).

Abbildung I-1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Virus



I.4 Genetik der Retroviren

Das Genom der RV liegt in Form von Einzelstrang-RNA ähnlich einer mRNA mit (+)-Polarität vor und hat eine Größe von 8 bis 13 kb. RV sind diploid, d.h. jedes Viruspartikel besitzt zwei Kopien seines Genoms. Jeder Einzelstrang trägt eine Cap-Struktur am 5`- und einen poly-A-Schwanz am 3`-Ende. Die kodierende Region eines jeden replikationsfähigen Retrovirus besteht aus drei spezifischen Genen: *gag*, *pol* und *env*, die je nach Virus unterschiedlich lang sein können.

gag („gruppenspezifisches Antigen“) – kodiert Struktur-Proteine:

- das Kapsid,
- das Nukleokapsid-Protein, an das die RNA gebunden ist,
- das Matrixprotein, welches eine Verbindung zwischen Kapsid und Virushülle herstellt.

pol („Polymerase“) – kodiert die Virus-Enzyme:

- Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase,
- Protease spaltet Vorläuferproteine in ihre Einzelkomponenten,
- Integrase baut das Virus in das Wirtsgenom ein,
- Ribonuklease-H trennt den RNA-DNA-Doppelstrang und baut die RNA ab.

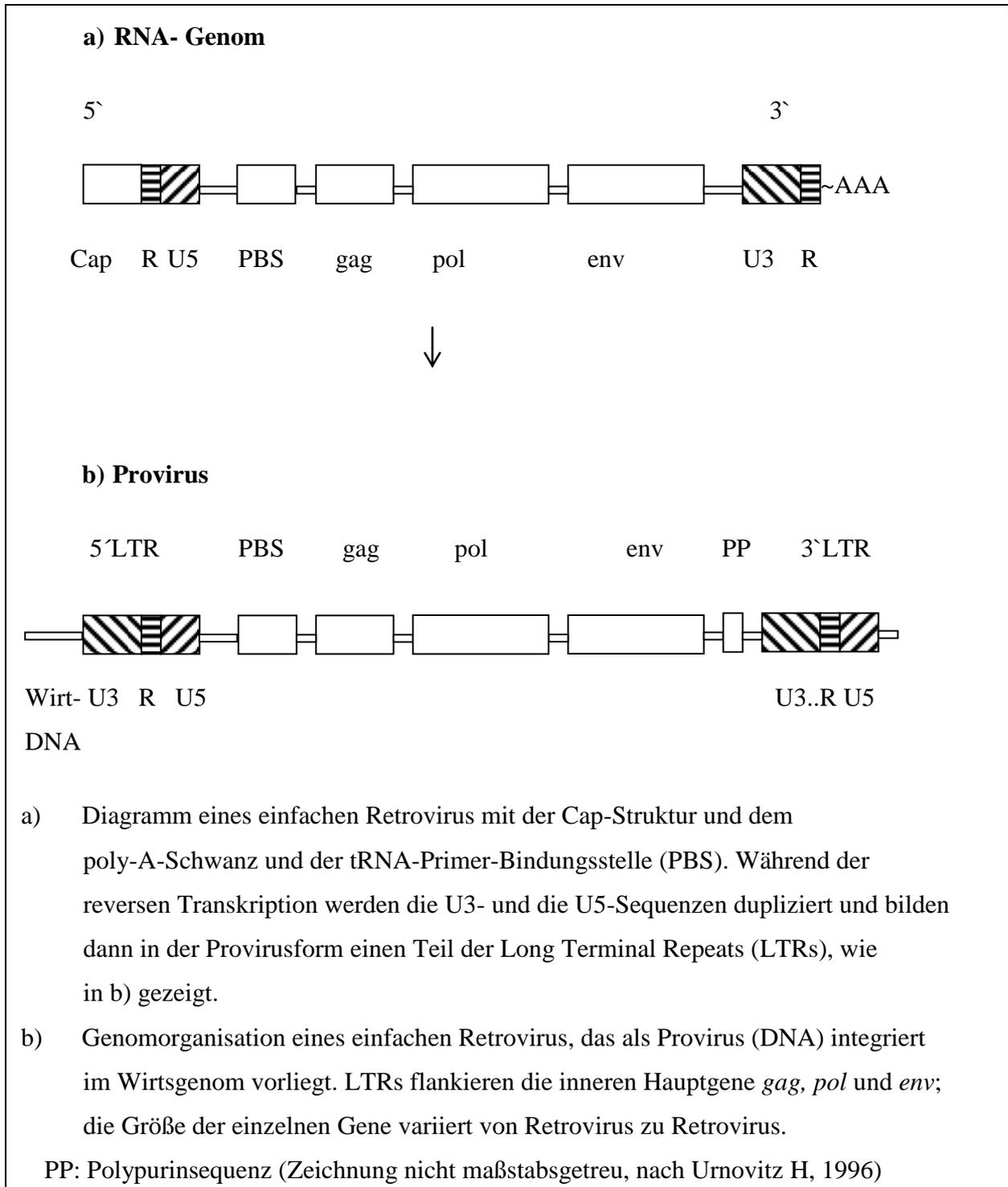
env („envelope“) – kodiert Bestandteile der Virushülle:

- Transmembran-Proteine,
- glykosylierte Oberflächen-Proteine, die für die virale Adsorption und für die Penetration in die Wirtszelle verantwortlich sind.

Die codierende Region (*gag*, *pol* und *env*) wird sowohl am 3'- wie auch am 5'-Ende von regulatorischen Sequenzen, den U3-, U5- (U=unique), und R-Regionen (R=redundant), flankiert. Diese sind sowohl für die reverse Transkription als auch für die darauf folgende Integration des viralen Genoms in die zelluläre DNA essentiell. Die U3-Region enthält Enhancer- und Promotersequenzen. Der 5'-3'-Orientierung folgend schließt sich dem 5'-LTR eine als Primerbindungsstelle (PBS) bezeichnete Sequenzfolge an. Sie hybridisiert mit einer zellulären tRNA und dient der Reversen Transkriptase als Ansatzstelle für die Synthese der (-)-Strang DNA. Die Synthese der (+)-Strang-DNA wird über die Polypurinsequenz, die ebenfalls als Primer dient, vom 3'-Ende ermöglicht. Nach der reversen Transkription wird die virale Doppelstrang-DNA in das zelluläre Genom integriert (Abbildung I-2).

Diese so genannte Provirus-DNA, die ein Bestandteil des Wirtsgenoms darstellt, dient als Vorlage für die Produktion viraler Proteine durch die körpereigenen zellulären Transkriptions- und Translationsmechanismen.

Abbildung I-2: Genomorganisation eines Retrovirus als a) RNA-Genom und b) Provirus



Die integrierte Provirus-DNA wird beiderseits von *Long Terminal Repeats* (LTRs) mit 5`-U3-R-U5-3` Sequenzen flankiert. Auf ihnen sind zahlreiche Signale wie Promoter oder Enhancer enthalten, die für die Expression des viralen Genoms von Bedeutung sind.

RV können auf exogenem Wege als durch von der Zelle freigesetzte virale Partikel übertragen werden (horizontale Transmission, exogene Retroviren). Alternativ können sie auch nach den Mendelschen Regeln auf endogenem Weg als Bestandteil des Genoms von Keimbahnzellen auf die Folgegeneration vererbt werden (endogene Transmission, endogene Retroviren) (Bittner JJ, 1936).

Unter dem Einfluss von Karzinogenen und Mutagenen, zum Beispiel Strahlung oder auch physiologischen Prozessen wie dem Altern, können endogene Retroviren (ERV) aktiviert und so zur Expression von Virusproteinen und zur Produktion von infektiösen viralen Partikeln angeregt werden (Hehlmann R, 1988).

I.5 Humane endogene Retroviren

Die Humanen endogenen Retroviren (HERV) haben sich wahrscheinlich innerhalb der letzten 30 Millionen Jahre durch exogene Infektionen von Keimbahnzellen der Primatenvorfänger in das menschliche Genom integriert (Johnson WE, 1999). Viele der HERV-Familien haben sich durch Reinfektionen und wohl nur zum kleinen Teil durch intrazelluläre Transposition im menschlichen Genom verbreitet (Belshaw R, 2004). Dort liegen sie meist in höherer Kopienzahl vor (Löwer R, 1996). Zusammen machen die endogenen Retroviren und die von ihnen abgeleiteten Sequenzen wie zum Beispiel solitäre LTR-Sequenzen („Solo-LTRs“) etwa acht Prozent des menschlichen Genoms aus (Griffith DJ, 2001).

Für die Einteilung der humanen endogenen Retroviren gibt es aufgrund der Komplexität keine universellen und allgemein akzeptierten Klassifizierungen. Sie werden häufig anhand ihrer Sequenzhomologien zu unterschiedlichen exogenen Retroviren in drei Klassen eingeteilt: Klasse I lässt sich von den Gammaretroviren wie dem Murinen Leukämie-Virus (MLV) ableiten, Klasse II, zu der die HERV-K-Gruppe gehört, sind den Betaretroviren wie zum Beispiel dem Maus-Mammatumor-Virus (MMTV) ähnlich, und die Klasse III weist Ähnlichkeiten zu den Spumaviren auf (Griffith DJ, 2001).

Anhand des basenspezifischen Codes für die Aminoacyltransferase an der Primer-tRNA können die HERV außerdem in einzelne Familien unterteilt werden. Die spezifische Aminosäure wird mit einem Buchstaben im *one-letter-code* abgekürzt (Larsson E, 1989). Die HERV-K-Familie ist als die biologisch aktivste und phylogenetisch jüngste der humanen endogenen Retroviren bezeichnet worden.

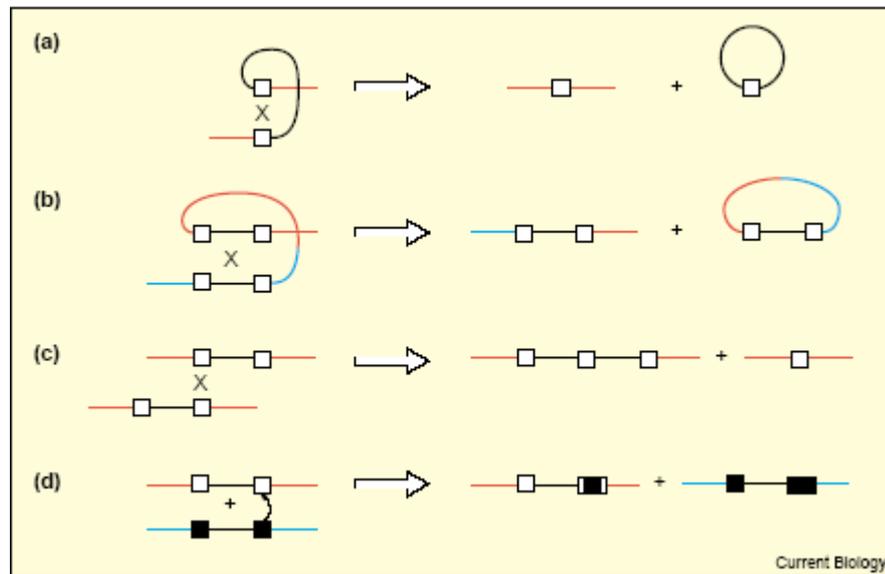
In ihrer Familie finden sich auch die meisten vollständigen viralen Genome mit allen drei Hauptsequenzen *pol*, *env* und *gag* (Turner G, 2001).

Während exogene RV in der Lage sind, infektiöse Nachkommen zu produzieren, haben die endogenen Retroviren im Laufe der Evolution auf Grund von Mutationen und Deletionen im Bereich der kodierenden Sequenz in der Regel die Fähigkeit zur Bildung infektiöser Formen verloren (Löwer R, 1996).

Bei den in Abbildung I-3 aufgeführten möglichen Mutationen kommt es zum Beispiel durch Rekombination zweier LTR-Sequenzen zur Deletion der dazwischen liegenden Virussequenz. Hierbei kann eine so genannte Solo-LTR entstehen (Abb.I-3).

Die Genexpression von HERV steht hauptsächlich unter der Kontrolle der flankierenden LTRs, die verschiedene Startsignale für die zelleigene Transkription enthalten. Die regulatorischen Sequenzen dieser LTRs können mit benachbarten Genbereichen interferieren und auf diese Weise den Zellzyklus, zum Beispiel über die Dysregulation wichtiger Gene, beeinflussen (Goodchild et al, 1992). Zelluläre Gene, die unter Normalbedingungen keine onkogenen Eigenschaften entwickeln, aber an wesentlichen Prozessen wie zum Beispiel Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung beteiligt sind (sogenannte Protoonkogene, *c-onc* = cellular oncogene), können durch die Integration eines Provirus in der Nähe aktiviert oder gehemmt und damit zu Onkogenen werden.

Die retroviralen Kontrollelemente können sich sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung orientieren und so auch über Entfernungen von mehreren 100 bis 1000 Basenpaaren Einfluss auf benachbarte Gene nehmen (Ruda VM, 2004). Das Ergebnis ist entweder der Funktionsverlust der Zelle und die damit verbundene Apoptose, oder es kommt zu einer verstärkten oder dysregulierten Expression benachbarter zellulärer Gene. Bei betroffenen Protoonkogenen kann dies zur Tumorentwicklung führen (Akopov SB et al, 1998; Knössl M et al, 1999).

Abbildung I-3: DNA-Rekombination bei endogenen Retroviren

Quelle: Stoye JP, 2001

Linien zeigen den DNA-Strang

- Rekombination zwischen zwei LTRs (Kästchen) eines einzelnen Provirus mit dem Ergebnis einer Solo-LTR; der Rest des Virus geht verloren.
- Homologe Rekombination zwischen zwei Proviren auf dem gleichen Chromosom mit dem Ergebnis einer Deletion der dazwischen liegenden Sequenz
- Rekombination zwischen den 3'- und den 5'-LTRs eines Provirus mit der Bildung eines „Tandem-Virus“ und einer solitären LTR
- Genkonversion, die zu einem nicht homologen Genaustausch und zu keinem Verlust von genomischer Sequenzen führt.

Untersuchungen der humoralen Immunantwort brachten Aufschluss über die Expression von HTDV/HERV-K-Proteinen. Bei Patienten mit Leukämie und testikulären Tumoren ist der Antikörpertiter gegen retrovirale Strukturproteinen *gag* oder *env* erhöht (Sauter M, 1995). Auch die in testikulären Tumorzellen gefundenen virusähnlichen Partikel (*human teratocarcinoma-derived virus* (HTDV)-Partikel), die von der HERV-K-Familie codiert werden (Löwer R, 1995), sprechen dafür, dass einige dieser Retroviren noch aktiv sind. In manchen Fällen konnte ebenso gezeigt werden, dass eine virale Insertion nicht immer nachteilig sein muss. Das HERV-W *env*-Protein Syncytin im Plazentagewebe ist zum Beispiel maßgeblich an der Trophoblasten-Zellfusion und der Differenzierung zum Syncytiotrophoblasten beteiligt (Leib-Mösch C, 1992; Mi S, 2000). Auch wurde bei Hühnern und Mäusen, die Träger bestimmter endogener Alphet-

roviren sind, ein Schutz vor Infektionen durch verwandte exogene Retroviren beschrieben (Limjoco T et al, 1995).

I.6 Beschreibung von HERV-K

Die HERV-K-Familie wurde 1986 durch eine Hybridisierung mit MMTV- Proben entdeckt (Ono M, 1986). Durch diese Ähnlichkeit zu dem MMT-Virus wird die HERV-K-Familie auch als HML (*Human MMTV-like group*) bezeichnet. Charakteristisch für die HERV-K-Familie ist eine Lysin-spezifische tRNA-Primer-Bindungsstelle, die für den Start der reversen Transkription wichtig ist. Daher trägt diese Familie die Abkürzung K (Einbuchstabencode für Lysin). HERV-K weist im Menschen und allen Altweltaffen ungefähr 30-50 vollständige Proviren pro haploiden Genom und 10.000-25.000 Solo-LTRs auf (Löwer R, 1996). Bei einer genomweiten Suche nach weiteren Mitgliedern der HERV-K-Familie konnten mehrere Arbeitsgruppen verschiedene retrovirale Elemente finden, die für den Menschen spezifisch sind. Allerdings konnten diese human-spezifischen HERV-K-Elemente nicht in allen Individuen gefunden werden. Dieser Insertionspolymorphismus spricht für eine Integration in das menschliche Genom in den letzten 200.000 Jahren. Zur Bestimmung der ungefähren Integrationszeiträume dient der Vergleich der Genome von Menschen und Menschenaffen. Für manche humanen ERV-K konnte zum Beispiel an der jeweils homologen Genposition der Primaten keine Virussequenz gefunden werden. Dies zeigt, dass die Integration dieser HERV nach der phylogenetischen Trennung von Mensch und Primat erfolgt sein muss (Barbulescu M, 1999). Durch den Vergleich der beidseits flankierenden LTRs lässt sich eine weitere Bestimmung des relativen Alters vornehmen. Auf Grund des Mechanismus der reversen Transkription und Integration müssen die beidseitigen viralen LTRs zum Zeitpunkt der Integration identisch sein. Im Laufe der Evolution kommt es allerdings zu Mutationen und zu Veränderungen in den beiden LTR-Sequenzen, die unabhängig voneinander ablaufen. Die Mutationsrate wurden auf eine Veränderung pro LTR alle 200.000-450.000 Jahre geschätzt (Johnson WE, 1999).

Im Gegensatz zu anderen HERV-Familien weisen die Provirus-Sequenzen der HERV-K-Familie gelegentlich vollständige offene Leserahmen (ORF, *open reading frames*) für alle Virusgene (*pol*, *env* und *gag*) auf und sind damit zum Teil in der Lage, funktionelle spezifische retrovirale Proteine zu exprimieren.

Im menschlichen Genom existieren zwei Typen von HERV-K, die sich in ihrer genomischen Organisation unterscheiden. Bei Typ 1 fehlt im Vergleich zu Typ 2 eine 292 bp umfassende Sequenz zwischen dem *env*- und *pol*-Gen, so dass diese miteinander verschmelzen

(Löwer R, 1993). Bei Typ-2-Viren mit vollständigem Leserahmen kommt es zur Translation eines akzessorischen Proteins *rec* (*regulator of expression*) (Löwer R, 1995), das funktionelle Ähnlichkeit zu dem *rev*-Protein der komplexeren Lentiviren wie HIV oder zum *rex*-Protein bei HTLV aufweist (Magin C et al, 1999). Es erleichtert den Transport der viralen RNA aus dem Kern und deren Transkription. In den Studien von Galli an Keimzelltumoren bei Mäusen zeigte sich, dass transgene *rec*-exprimierende Tiere im Gegensatz zu *rec*-negativen Kontrollmäusen Carcinomata in situ (CIS) entwickelten. Somit kann vermutet werden, dass eine Expression von HERV-Genen im Zusammenhang mit einer onkogenen Wirkung steht (Galli UM et al, 2005).

Trotz des Verlustes der Spleißdonorstelle für das *rec*-Protein kodiert das Genom der Typ-1-Proviren ebenfalls für ein Protein, das ausschließlich in maligne entarteten Zellen zu finden ist (Armbrüster V et al, 2002). Dieses Np9-Protein kumuliert ähnlich wie *rec* im Zellkern.

Der Nachweis von Antikörpern gegen *env*-Virusproteine des HERV-K bei testikulären Tumoren scheint im engen Zusammenhang mit der Tumorphathogenese zu stehen (Kleiman A, 2004;

Löwer R, 1993). Es zeigte sich, dass der Antikörpertiter im Therapieverlauf Schwankungen aufwies und kurz nach der Entnahme des testikulären Tumors absank und bis zu fünf Jahren nach der Operation nicht mehr nachweisbar war (Boller K, 1993).

Gag- und *env*-Transkripte konnten in vielen weiteren neoplastischen Geweben wie Mammakarzinomen, Melanomen und Leukämien nachgewiesen werden. Allerdings stehen die Untersuchungen und Studien bezüglich einer Beteiligung der HER-Viren an Erkrankungen bei Menschen noch am Anfang.

I.7 HERV-K113 und HERV-K115

Die von der Arbeitsgruppe Jack Lenz entdeckten endogenen Retroviren HERV-K113 auf Chromosom 19p13.11 und HERV-K115 auf Chromosom 8p23.1 besitzen vollständige und intakte offene Leserahmen (Turner G et al, 2001). Sie sind nicht bei allen menschlichen Individuen zu

finden. In einer altersgematchten Mamma-Karzinom-Studie lagen die Prävalenzen bei der Kontrollgruppe von HERV-K113 bei 16,7 Prozent und für HERV-K115 bei 4,9 Prozent (Burmeister T et al, 2004).

Die Integration der Retroviren erfolgt weitgehend zufallsgesteuert. Als Proviren besitzen sie eine für sie spezifische Integrationsstelle. Für die Typen K113/K115 gilt, dass sie sich polymorph in der menschlichen Population verteilt haben. Somit kommt sowohl die Wildtyp-Form (Präintegrationssequenzen ohne Virus-Sequenz) als auch das integrierte Provirus in der Bevölkerung vor. Die beiden Virustypen gehören zu den wenigen HERV, die eine vollständige Provirussequenz und gleichzeitig einen Insertionspolymorphismus aufweisen (Turner G et al, 2001). Darüber hinaus gehören HERV-K113 und HERV-K115 zu den Typ-2-Retroviren und sind in der Lage, das oben erwähnte akzessorische Protein-*rec* (regulator of expression) zu bilden (Löwer R, 1995). Die Anwesenheit von *rec*-Transkripten wurde vor allem in Keimzell-Tumoren beschrieben. Interessant ist die Interaktion dieser Proteine mit dem Promyelozyten-Leukämie-Zink-Finger-Protein (PLZF). Dieses Protein spielt bei der Wachstumsregulation der Zelle eine wichtige Rolle und kann so Einfluss auf die Spermatogenese bei Mäusen und auf die Myelopoese beim Menschen nehmen (Boese A et al, 2000). PLZF ist als Translokationspartner bei der Promyelozytenleukämie (AML FAB M3) mit der seltenen Translokation t(11;17) bekannt. Hierbei kommt es durch eine Translokation zwischen dem PLZF-Gen auf Chromosom 11 und dem RAR α -Gen (Retinsäure-Rezeptor-alpha) auf Chromosom 17 zu dem Fusiongen PLZF/RAR α , welches dann zur Entartung führt.

Die zur HERV-K-Familie gehörenden phylogenetisch sehr jungen Retroviren HERV-K113 und HERV-K115 haben sich erst nach der Aufteilung der Abstammungslinien von Mensch und Schimpanse, die vor ungefähr sechs Millionen Jahren stattfand, in das menschliche Genom integriert (Medstrand P, 1998, Barbulescu 1999, Turner 2001). Vergleicht man die Mutationen in den beidseitigen LTRs, zeigen sich bei HERV-K115 geringe bzw. bei HERV-K113 keine Unterschiede. So lassen auch die vollständigen ORFs darauf schließen, dass es sich um sehr junge und aktive Viren handelt.

I.8 Klassifikation der Leukämien

Die untersuchten akuten und chronischen Leukämien sind im Folgenden kurz erläutert:

Die **akuten lymphatischen Leukämien (ALL)** werden meist immunologisch nach der *European Group for Immunophenotyping of Leukemia* (EGIL) klassifiziert. Hier werden die

B-Linien-ALL in pro-B, common, prä-B und reife-B-ALL, die T-Linien-ALL in pro-T, prä-T, kortikale und reife T-ALL unterteilt.

Die ALL ist mit einer Inzidenz bezogen auf alle Altersgruppen von etwa 1,5 Neuerkrankungen/100.000 im Jahr selten. Bei Erwachsenen macht die ALL unter den akuten Leukämien weniger als 20 Prozent aus.

Die **akute myeloische Leukämie (AML)** kann in allen Altersstufen vorkommen; ihre Inzidenz beträgt 2,5 Erkrankungen pro 100.000/Jahr. Sie macht mehr als 80 Prozent der akuten Leukämien beim Erwachsenen aus; weniger als 20 Prozent der Leukämien im Kindesalter sind akut myeloisch. Die AML zeigt sich als eine heterogene Gruppe mit unterschiedlichen Subtypen, die nach Vorschlägen der *French-American-British-Cooperative-Group* (FAB) zytomorphologisch in die Subtypen M0-M7 unterteilt werden.

Die **chronische myeloische Leukämie (CML)** gehört zu der Gruppe der myeloproliferativen Neoplasien (MPN) und betrifft die Stammzellen der myeloischen Reihe im Knochenmark. Sie macht mit einer Inzidenz von einer Neuerkrankung pro 100.000 Erwachsene im Jahr etwa 20 Prozent der Leukämien aus, mit einem Altersgipfel von 50 bis 60 Jahren. In fast allen Fällen findet man als Ursache eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 (t(9;22)) mit der Ausbildung des Fusionsgens BCR-ABL (Philadelphia-Chromosom).

Bei der **chronisch lymphatischen Leukämie (CLL)** handelt es sich um ein niedrig malignes-leukämisches Non-Hodgkin-Lymphom (NHL). Die CLL stellt die häufigste Form der Leukämie bei Erwachsenen in der westlichen Welt dar. Die Inzidenz beträgt ca. drei Neuerkrankungen pro Jahr pro 100.000 Einwohner mit einer Zunahme im höheren Lebensalter. Es handelt sich um eine maligne Proliferation von reifen B-Lymphozyten.

I.9 Zielsetzung der Arbeit

HERV-Sequenzen haben sich über die Evolution hinweg im menschlichen Genom gehalten. Die meisten von ihnen sind durch Mutationen inaktiv und replikationsunfähig geworden. Welchen

potentiellen Einfluss diese Sequenzen auf das menschliche Immunsystem oder auf die Entwicklung von Krebs haben, wird kontrovers diskutiert und ist noch ungeklärt. Analogieschlüsse können aus den Ergebnissen von Studien der Tierwelt gezogen werden. Die schon bekannten Zusammenhänge zwischen Retroviren und malignen hämatologischen Krankheiten in der Tierwelt und das Wissen über die pathogenen Eigenschaften von HTLV-1 beim Menschen lassen es möglich erscheinen, dass auch menschliche Krankheiten in Verbindung mit humanen endogenen Retroviren stehen.

Hauptziel dieser Arbeit ist es, die Prävalenz von HERV-K113 und HERV-K115 bei Patienten mit akuten/chronischen Leukämien zu ermitteln. Ein wesentlicher Bestandteil der Therapie vieler leukämieerkrankter Patienten ist die allogene Stammzell- oder Knochenmarktransplantation. Dabei sollen transplantierte gesunde Spenderzellen die erkrankte Hämatopoese dauerhaft ersetzen. Nach erfolgter Transplantation werden Chimärismusuntersuchungen durchgeführt. Mit diesen Untersuchungen soll der Anteil an neuer (Spender-)Hämatopoese zur verbliebener (Empfänger-)Hämatopoese quantifiziert werden. Stammen alle Zellen vom Spender ab, spricht man von einem kompletten Chimärismus. Ein gemischter Chimärismus liegt vor, wenn zusätzlich noch Zellen vom Empfänger nachweisbar sind. Im Fall eines HERV-K113/K115-negativen Spenders und HERV-K113/K115-positiven Empfängers sollte untersucht werden, ob sich HERV-K113/K115 als molekulare Marker für die Analyse des Knochenmark-Chimärismus nutzen lassen. Hierfür wurde eine quantitative real-time-PCR (qRT-PCR) konstruiert, die eine schnelle und quantitative Detektion von HERV-K113 bzw. HERV-K115 ermöglicht und so ggf. eine Kontrolle des Therapieverlaufs nach Transplantation zulässt.

II Material und Methoden

II.1 Patienten-Proben

Untersucht wurden Patienten mit akuter und chronischer lymphatischer Leukämie sowie mit akuter und chronischer myeloischer Leukämie. Bei der Wahl der Proben konnte auf ein aus anderen Studien vorhandenes Patientenkollektiv zugegriffen werden. Alle 193 untersuchten Proben wurden aus onkologischen Kliniken oder Praxen eingesandt. Die Probenentnahme erfolgte primär zu diagnostischen Zwecken. Nur das übriggebliebene Restmaterial wurde für wissenschaftliche Zwecke verwendet.

Die Auswahl erfolgte zufällig, wobei die Diagnose jeder einzelnen Leukämie an Hand von zytologischen, immunzytologischen und/oder molekulargenetischen Befunden gesichert war.

II.2 DNA-Isolierung

Puregene-DNA-Isolationskit: Biozym Scientific, Hessisch Oldenburg, (Genta System)

Zentrifuge: Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Die Isolierung der DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, die Zellen aufbricht und gleichzeitig die DNA isoliert. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe des DNA-Isolationskits „Puregene“.

$3 - 5 \times 10^6$ Zellen wurden in der Zentrifuge bei einer Geschwindigkeit von 3000 rpm für fünf Minuten pelletiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Nach 15-minütigem Inkubieren in 600 µl Puregene Cell-Lysis-Solution (Zellaufschluss) bei Raumtemperatur wurden die Proteine mit 200 µl Puregene Cell-Precipitation-Puffer präzipitiert, mittels Vortex intensiv durchmischt und anschließend fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (13,2 rpm) wurde der Überstand mit 600 µl 100 % Isopropanol vorsichtig vermischt und die DNA ausgefällt.

Durch weiteres kurzes Zentrifugieren und sauberes Abpipettieren des Überstandes und durch Zugabe von 600 µl 70 % Ethanol wurde die DNA gewaschen sowie anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Das Pellet wurde in 110 µl Puregene Hydration-Puffer vollständig gelöst und für 24 Stunden hydriert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

II.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Spektralphotometer: RNA/DNA GeneQuant Photometer, Pharmacia, England

Die Konzentration der Nukleinsäure (Ziel: ~100 µg/ml) wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einer Mikroküvette bestimmt. Ein Absorptionswert von OD_{260nm} (OD = optische Dichte) von 1 entspricht ca. 50 µg Doppelstrang- DNA pro ml. Die Reinheit der DNA wurde durch den Vergleich der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm kontrolliert. Hierbei sollte der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Bei Nichterreichen des Zielwertes wurde die DNA erneut in 600 µl Ethanol gewaschen.

II.4 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

HotStarTaq Mastermix Qiagen, Hilden

Polymerase: 5 units/µl, HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen, Hilden

Puffer: mit 1,5 mM MgCl₂, vom Hersteller mitgeliefert

Nukleotide: 200 µM dNTP, Qiagen Hilden

Positiv-Kontrolle: Human Genomic DNA, (Roche Diagnostics, Mannheim)

Oligonukleotide: metabion GmbH (Martinsried)

Cycler: PCR-System 2400 (GeneAmp) Applied Biosystem, USA

II.4.1 Oligonukleotid-Sequenzen (Primer)

Die verwendeten Primersequenzen wurden bereits im Rahmen anderer Arbeiten entwickelt (Tuner G et al, 2001 und Burmeister T et al, 2004).

Primer-Sequenzen für konventionelle PCR:

K115-3-reverse: 5` TCA GTT CCC GAT TTT CTG CC-3`

K113-3-reverse: 5` CAT GTT TCC TAG TCA ACT TAG C-3`

K115-5-forward: 5` CCG CAC CTA GTC AAC TTA GC-3`

K113-5-forward: 5` GCA TGG GGA GAT TCA GAA CC-3`

3`LTR-forward: 5` ATG CTG AAC GCT GGT TCC-3`

5`LTR-reverse: 5` TCT CAA GGC AGA AGA ATT TTT CTT AG-3`

K113-5-reverse: 5` CTT CAC CCT AGA GAA AAG CCT CC-3`

T: Thymin, A: Adenin, G: Guanin, C: Cytosin

II.4.2 Primer-Paare für die konventionelle PCR

Tabelle II-1: Primer-Paare für die konventionelle PCR 1

PCR-Nummer	Primer 1	Primer 2
I	K115-3-reverse	K115-5-forward
II	5`LTR-reverse	K115-5-forward
III	3`LTR-forward	K115-3-reverse

Tabelle II-2: Primer-Paare für die konventionelle PCR 2

PCR-Nummer	Primer 1	Primer 2
IV	K113-3-reverse	K113-5-forward
V	5`LTR-reverse	K113-5-forward
VI	3`LTR-forward	K113-3-reverse

Tabelle II-3: Ausschluss Solo-LTR-PCR

Wenn die K113-PCRs (Tabelle II-2, V und VI) ein Produkt ergeben, werden in einer darauffolgenden PCR die folgenden Primer eingesetzt:

Primer 1	Primer 2
K113-5-reverse	K113-5-forward

Wenn die K115-PCRs (Tabelle II-2, II und III) ein Produkt ergeben, werden in einer darauffolgenden PCR die folgenden Primer eingesetzt:

Primer 1	Primer 2
K113-5-reverse	K115-5-forward

II.4.3 PCR-Reaktionsansatz

Ein Reaktionsansatz für 50 µl Gesamtvolumen setzt sich wie folgt zusammen:

HotStarTaq Mastermix	25 µl
H ₂ O	20 µl
Primer 1 (10 µM)	1 µl
Primer 2 (10 µM)	1 µl
<u>Template-DNA (ca 100 ng/µl)</u>	<u>3 µl</u>
Gesamtmenge	50 µl

II.4.4 Cycler-Programme

Initiale Denaturierung: 94 °C für 15 Minuten

35 Zyklen:

Denaturierung: 94 °C für 30 Sekunden

Annealing: 56 °C für 30 Sekunden

Elongation: 72 °C für 30 Sekunden/zum Ausschluss von Solo-LTR: 72 °C für 60 Sekunden

Um eine unspezifische Amplifikation zu verringern, wurde eine Hotstart-Polymerase mit einem enzymatischen Aktivitätsoptimum bei etwa 80 °C verwendet. Die Synthese der DNA erfolgte dann in drei Reaktionsschritten, die 35 Zyklen durchlaufen.

Im ersten Schritt (Denaturierung; 30 Sekunden bei 94 °C) wurde die Ursprungs-DNA (Template), in späteren Zyklen die PCR-Produkte, in zwei Stränge aufgetrennt. Durch Absenken der Temperatur kam es im zweiten Schritt (Annealing; 30 Sekunden bei 56 °C) zur Hybridisierung der im Überschuss vorliegenden Oligonukleotide an die einzelsträngige Matrizen-DNA. Im dritten und letzten Schritt (Elongation; 30 Sekunden bei 72 °C) wurde die Doppelstrang DNA, ausgehend von den Primern, mittels der DNA-Polymerase amplifiziert.

Fiel eine Probe für das Virus K115 bzw. K113 positiv aus, so wurde eine weitere PCR zum Ausschluss einer Solo-LTR durchgeführt. Hierfür wurde ein PCR-Programm verwendet (Primer-sequenzen in Tabelle II-3), bei dem der dritte Schritt der Synthese auf 60 Sekunden verlängert war.

II.5 Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel

Agarose:	Agarose zur Elektrophorese von Nukleinsäuren, Biozym (Hessisch Oldenburg)
TBE-Puffer:	1,0 M Tris; 0,9 M Borat; 0,01 M EDTA, pH 8,3 (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg Ethidiumbromid/ml H ₂ O
DNA-Probenpuffer:	Bromphenolblau 0,25 %; Xylene Cyanol 0,25 %; 25 % Ficoll 400; 1M Tris pH 7,5
dsDNA-Längenstandard:	φX174 RF DNA/ HaeIII Fragments; 72 – 1353 bp ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
Spannungsquelle:	Electrophoresis Power Supply (Renner GmbH, Dannstadt)
Kameras:	Beleuchtungssystem Reprostar II; CAMAG (MuttENZ, Schweiz) mit Polaroidfilm AlphaDigi.Doc: Kamera C-5060 (Olympus, Hamburg), Alpha Innotech (USA)
Waage:	TE 1502 S, Sartorius AG, Göttingen

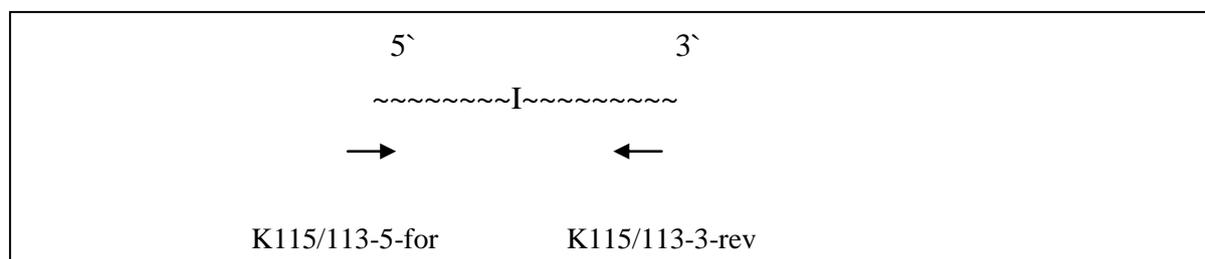
Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese lassen sich die DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße auftrennen. Die Laufstrecke doppelsträngiger DNA verhält sich bei konstanter Feldstärke umgekehrt proportional zur Molekülgröße. Diese physikalische Eigenschaft kann zur Auftrennung unterschiedlich großer Fragmenten herangezogen werden. Anhand der bekannten Größe können die positiven PCR-Produkte durch einen parallel laufenden Längenstandard, der DNA-Moleküle definierter Größe enthält und als Referenz dient, den einzelnen Viren zugeordnet werden (HERV-K115 1269 bp, HERV-K113 1146 bp). Für die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde 1,5%ige Gele verwendet, die mit jeweils 0,1 µl/ml Ethidiumbromid-Puffer versetzt war. Ethidiumbromid bindet an die DNA und kann unter UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Vor dem Auftragen der DNA und des Längenstandards in die Geltaschen wurden die Proben mit 3 µl Probenpuffer versetzt, der die Dichte der DNA erhöht und ein Absinken in die Geltaschen gewährleistet. Das Bromphenolblau diente hierbei als Marker für die Laufstrecke. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 150 V und ~40 mA in TBE-Puffer für etwa 40 Minuten. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht auf einem Transilluminator fotografiert.

II.6 Wahl der Primer

Die Primer wurden so gewählt, dass sie die Insertionsstelle von HERV-K113 und HERV-K115 im menschlichen Genom charakterisieren. Dafür waren je Virus drei oder vier PCRs nötig.

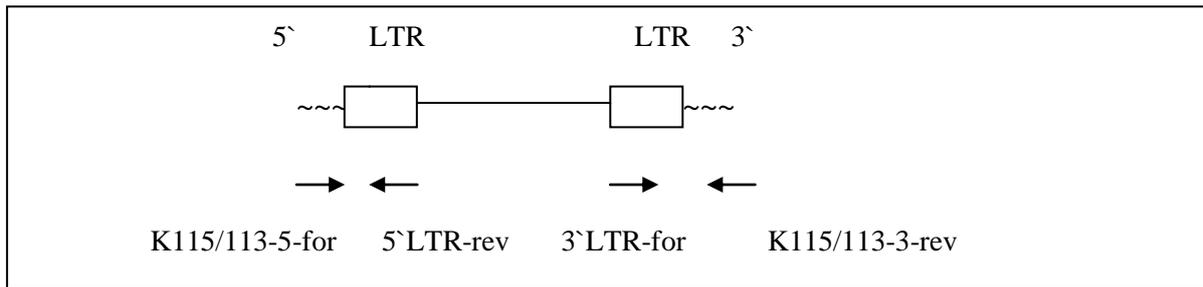
Zwei Primer-Paare (PCR IV und I, siehe Tab. II-1, II-2) dienten zur Untersuchung der Integrations-Sequenz von HERV-K113/115. Hierfür war der erste Primer 3`-wärts oder 5`-wärts der Insertionsstelle lokalisiert (siehe hierzu Abb. II-1).

Abbildung II-1: Nachweis des Wildtyps



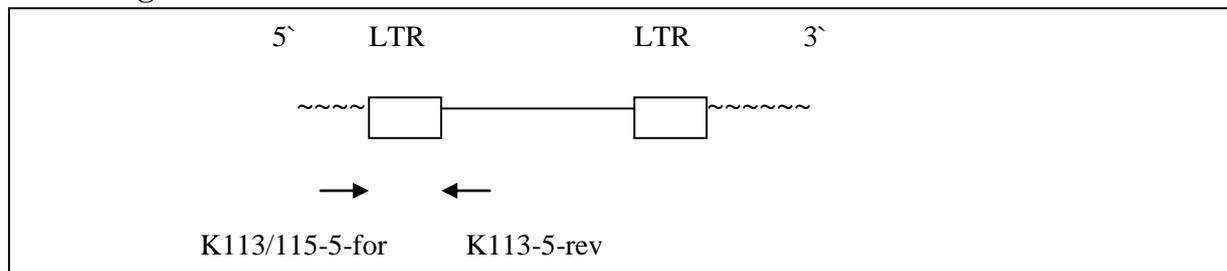
Wellenlinie: Wirtsgenom

Die weiteren PCRs (II, III, V und VI; Tab. II-1, II-2) dienen zum Nachweis einer Insertion von HERV-K113 bzw. HERV-K115. Hierfür war ein Primer 5`-wärts oder 3`-wärts auf der Insertions-Sequenz und der Gegenprimer in der 3`-oder 5`-LTR lokalisiert (Abb. II-2).

Abbildung II-2: Nachweis der HERV-Insertion

Wellenlinie: Wirtsgenom

Zwischen den beiden LTRs eines Provirus kann es zu homologen Rekombinationen mit Bildung einer solitären LTR kommen (siehe Abb. I-3 (a)). Um das Vorliegen einer solitären LTR auszuschließen, erfolgte bei Nachweis einer Insertion (Abb. II-2) eine weitere PCR. Ein Primer lag dabei 5`wärts der Insertions-Stelle und der andere in der Virus-Sequenz außerhalb der LTR (Abb. II-3). Diese PCR ergab nur dann ein Produkt, wenn keine Solo-LTR vorlag.

Abbildung II-3: Ausschluss Solo-LTR

Wellenlinie: Wirtsgenom

II.7 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Real Time PCR Cycler	Rotor-Gene 3000, Corbett Research, Australien
Software Version	Rotor-Gene 6.1.71
QPCR-Mix	ABsolute, Thermo Scientific, ABgene, Epsom (England) Oligonukleotidsequenzen metabion international AG, Martinsried (Deutschland)
N-DNA	DNA-Pool von gesunden Kontrollpersonen ohne HERV-K113 und HERV-K115
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)

II.7.1 Oligonukleotidsequenzen (Primer/Sonden)

LTR-forward 3	5`-GTA GGG GCA ACC CAC CCC TAC AC-3`
K113-reverse 2	5`-TTC TGA TAT TTA TTT TTT GAA CAT GTT TCC T-3`
K115-reverse 3	5`AAC TCA TCT CAG ATG TAT TTG AAT TAC A-3`
K113-FAM 1	5`-Fam-TGC CCA CAA ACA CAT GCA GAC GTT TAG TTT TGA-BHQ-1-3`
K115-HEX 2	5`-Hex-AGC ATA GTT TGG GCA CAA ATT AGA ACC ACC ACC A-BHQ-1-3`

II.7.2 Primer und Sonden-Paare

Tabelle II-4: Primer und Sonden

	Sonde	Primer 1	Primer 2
Für HERV-K115	K115-HEX 2	LTR-F3	K115-reverse 3
Für HERV-K113	K113-FAM 1	LTR-F3	K113-reverse 2

Beide quantitativen PCRs wurden als separate Reaktionen durchgeführt. Nach längeren Versuchen konnten die Primerpaare und Sonden so konstruiert werden, dass eine spezifische Amplifikation möglich war. In der Abbildung II-4 und II-5 sind die 3`-LTR-Sequenzen von HERV-K113 auf Chromosom 19 und von HERV-K115 auf Chromosom 8 aufgeführt. Hier zeigen sich ähnliche Basenpaarabfolgen beider Viren, wodurch eine spezifische Amplifikation beider Viren in einem Ansatz nicht möglich war. Auch lässt sich nachvollziehen, dass die Konstruktion der Sonden durch den hohen AT-Gehalt und die repetitiven Sequenzen an der Insertionsstelle erschwert war.

Abbildung II-4: Oligonukleotidsequenzen von HERV-K113
im Übergang zur genomischen DNA

K113 3' LTR – genomische DNA (Chromosom 19)
ccaccttacgagaaacaccacaggtgtgtaggggcaaccaccctacacttataaattt-
 cttacacctaaggtttatctttagactaacatatattgaactctatgtaaat**ca-**
aaactaaacgtctgcatgtgtttgtgggcagacaggaacatgttcaaaaaataaatca-
gaaaactttaaaatatttattcaggactcagaaatgtatggattttattcatatt-
 ctacataactttttttgaccataaaaattacactgtaatcaataacaatttaaatgtacatctt

Abbildung II-5: Oligonukleotidsequenzen von HERV-K115
im Übergang zur genomischen DNA

K115 3' LTR – genomische DNA (Chromosom 8)
ccaccttacgagaaacaccacaggtgggtaggggcaaccaccctacaccttttatatt-
 gatcattaaattcacttctaactctgagattctatgtgattatggtgat**ggtggtggtt-**
ctaatttgcccaactatgcttattattgaattcaatacatctgagatgagttttgtg-
 gagaggagctattagcatccacatctatagactgatctgaataaattggagtact-
 gattaaagtggatggagaagacaattttaaatgagtttatctattctggagcattgtctga
unterstrichene Sequenzen: Primer; **fettgedruckte Sequenzen:** Sonden.

II.7.3 Reaktionsansatz für qPCR

Ein Reaktionsansatz für 25 µl Gesamtvolumen setzt sich wie folgt zusammen:

QPCR-Mix	12,50 µl
Primer forward (10 µM)	0,75 µl
Primer reverse(10 µM)	0,75 µl
Taqman Sonde (10 µM)	0,25 µl
H ₂ O	7,75 µl
<u>Template- DNA (ca 100 ng/µl)</u>	<u>3,00 µl</u>
Gesamtmenge	25,00 µl

II.7.4 qPCR Programm

Hold :	95 °C	für 15 Minuten	Enzymaktivierung
60 Zyklen:	95 °C	für 15 Sekunden	Denaturierung
	60 °C	für 60 Sekunden	Elongation
Hold II:	25 °C	für 3 Minuten	

II.8 Reaktionsablauf

Die qPCR ist eine Vervielfältigungsmethode, die auf der einfachen PCR basiert und eine zusätzliche Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Diese Echtzeitanalyse erfolgt durch Messungen der Fluoreszenz, die proportional zum PCR-Produkt ansteigt. In dieser Arbeit enthält der PCR-Mastermix neben den spezifischen Primern eine Hydrolysesonde. Dies ist eine kurze DNA-Sequenz, die mit einem Abschnitt des zu amplifizierenden DNA-Bereichs hybridisiert. Am 3'-Ende ist sie mit einem Quencher-Farbstoff *Q* (to quench = engl. löschen) und am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff *R* markiert (Abbildung II-6). In dieser Arbeit wurde sowohl ein FAM (6-Carboxy-Fluorescein)-Farbstoff (Anregung bei 488 nm, Emission bei 518 nm) als auch ein HEX (Hexachloro-6-carboxy-fluorescein)-Farbstoff (Anregung bei 488 nm, Emission bei 556 nm) als Reporter verwendet. Am 3'-Ende war die Sonde durch einen BHQ-1-Quencher (Black Hole Quencher 1) markiert.

Bei intakter Sonde findet durch die räumliche Nähe zwischen Quencher und Reporter ein Fluoreszenz-Energietransfer (FET) statt, bei dem die Fluoreszenz des Reporters durch den Quencher unterdrückt wird und somit keine Messsignale detektiert werden. Erst wenn die Taq-Polymerase in der Extensionsphase der PCR durch ihre 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die zuvor hybridisierte TaqMan-Sonde abbaut, sind die beiden Fluorochrome räumlich getrennt, ein FET kann nicht mehr stattfinden und ein messbares Fluoreszenzsignal wird emittiert (Abbildung II-7). Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragments steigt die Stärke der Fluoreszenz proportional an.

In der ersten Phase der Amplifikation einer PCR ist die Templatemenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit gering, dass Template, Primer und Polymerase aufeinandertreffen. In der dritten Phase ist die Produktmenge soweit angestiegen, dass es zur Hybridisierung von Produktfragmenten kommt. Die Substrate gehen langsam zur Neige und eine optimale Ausschöpfung kann nicht

mehr erreicht werden. Ein exponentieller und damit quantifizierbarer Anstieg findet sich nur in der Phase dazwischen. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird der Threshold-Cycle (CT-Wert = Schwellenwert) verwendet, der die Zyklenzahl beschreibt, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz (Grundrauschen) ansteigt (Abbildung II-8).

Am Ende eines Laufs, der aus mehreren Zyklen besteht, kann so anhand des erhaltenen Fluoreszenzsignals die Quantifizierung erfolgen.

Abbildung II-6: Hydrolysesonde/TaqMan-Sonde

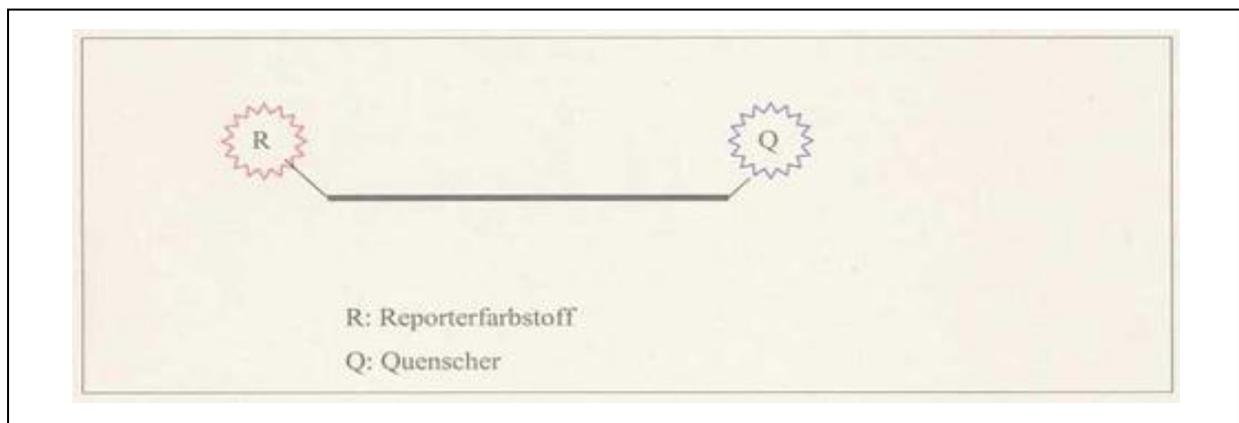


Abbildung II-7: Hydrolyse der Sonde und Emission von Fluoreszenzlicht

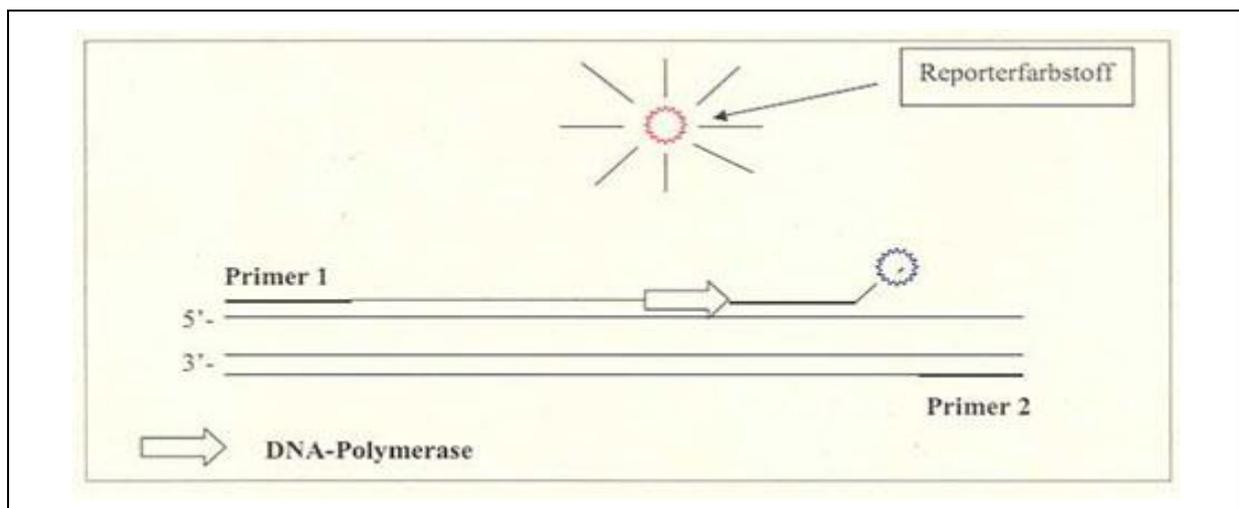


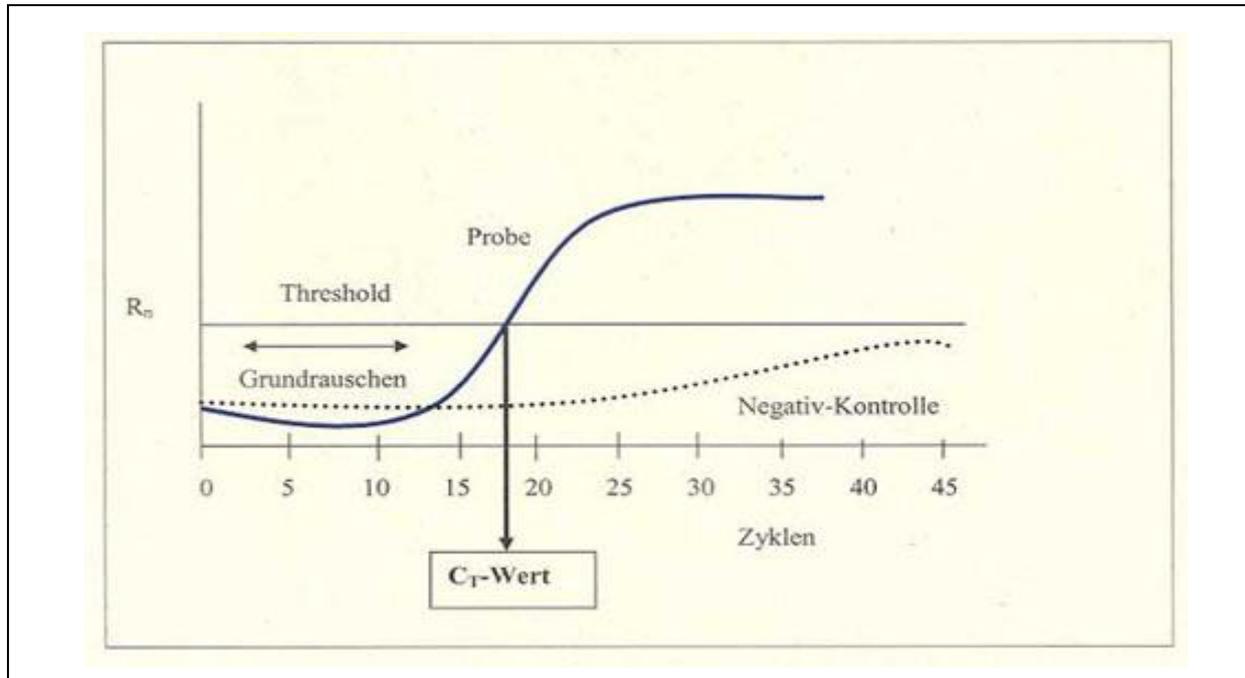
Abbildung II-8: Threshold

Abb.II-8: aus „Arbeitsschritte für die Durchführung einer Realtime-PCR Analyse“ (Fachinformation), Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2007.

II.9 Verdünnungsreihe

Hydratation-Lösung aus Biozym Scientific, Hessisch Oldenburg, (Genta System)

Puregene-DNA-Isolationskit

N-DNA ~68 ng/dl, Patientenpool

Nanodrop Spectrophotometer, Kisker-Biotech, Steinfurt (Deutschland)

ND-1000

Um quantitative Aussagen über die K113-/K115-Viruskonzentration machen zu können, werden von jedem Virus eine Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsgrad von 10^1 bis 10^5 angelegt.

Das Medium für die Verdünnung ist eine virusnegative humane DNA. Die DNA-Konzentration von Virus-positiver und Virus-negativer DNA wird auf etwa 70 ng/dl eingestellt. Um die

viruspositiven Patientenproben an diese Konzentration anzugleichen, erfolgt das Lösen in einer Hydratation-Lösung. Dieser Vorgang erfolgt über mehrere Tage, um eine vollständige und homogene Hydratation der hochmolekularen DNA zu erreichen. Für das Anlegen einer Verdünnungsreihe werden 25 μ l der Patienten-DNA zu 225 μ l der virusnegativen Pool-DNA zugefügt und

vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach einigen Stunden der Hydratation werden 25 μl der 10^{-1} -Lösung zu neuen 225 μl gemischt. Dies wird bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} wiederholt. Diese Form der Verdünnungsreihe zieht sich über mehrere Tage, um eine suffiziente Äquilibration zu erreichen. In der anschließenden quantitativen Real-Time-PCR können die einzelnen Verdünnungskurven gezeigt werden.

III Ergebnisse

III.1 Proben der Leukämiepatienten

Es wurden insgesamt 193 Proben untersucht. Bei der Wahl der Proben konnte auf ein aus anderen Studien vorhandenes Patientenkollektiv zurückgegriffen werden.

Die Auswahl erfolgte zufällig, wobei die Diagnose jeder einzelnen Leukämie an Hand von immunzytologischen, zytologischen und/oder molekulargenetischen Befunden gesichert war. Die Proben setzten sich wie folgt zusammen, wobei die Altersangaben dem Alter bei Diagnosestellung entsprechen:

- **40 T-Linien-ALL:** Patienten zwischen 18 und 61 Jahren,
- **50 B-Linien-ALL:** Patienten zwischen 17 und 73 Jahren,
- **40 CLL-Patienten** zwischen 22 und 45 Jahren,
- **30 CML-Patienten** zwischen 22 und 86 Jahren
- **33 AML-Patienten** zwischen 20 und 84 Jahren.

Die Geschlechterverteilung und die Ergebnisse der Untersuchungen sind aus den Tabellen III–1 bis Tabelle III–5 zu entnehmen.

III.2 Ergebnisse der PCR-Untersuchungen

Die Primer wurden so gewählt, dass sie die Insertionsstelle von HERV-K113 und HERV-K115 erkennen konnten. Zur vollständigen Charakterisierung des jeweiligen Insertionslocus wurden jeweils drei bis vier PCRs durchgeführt. Die aufgeführten Ergebnisse in Tabelle III–1 bis III–5 beschreiben die viruspositiven Proben ohne Vorliegen einer solitären LTR.

Tabelle III-1: Ergebnisse viruspositiver Proben von T-Linien-ALL-Patienten

T-Linien-ALL: Anzahl der untersuchten Proben				PCR-Ergebnis* der positiven Proben	
Subtyp	weiblich	männlich	Gesamt	K115	K113
thymisch/ kortikal	9	15	24	2	4
Prä-T-ALL	1	4	5	-	1
reife T-ALL	3	8	11	-	1
Gesamt-Proben	13	27	40	2 (5 %)	6 (15 %)

*Ergebnis nach Ausschluss von Solo-LTR

Tabelle III-2: Ergebnisse viruspositiver Proben von CLL-Patienten

CLL: Anzahl der untersuchten Proben				PCR-Ergebnis* der positiven Proben	
	weiblich	männlich	Gesamt	K115	K113
Gesamt-Proben	18	22	40	3 (7,5 %)	6 (15 %)

*Ergebnis nach Ausschluss Solo-LTR

Tabelle III-3: Ergebnisse viruspositiver Proben von B-Linien-ALL Patienten

B-Linien-ALL: Anzahl der untersuchten Proben		PCR-Ergebnis* der positiven Proben				
		weiblich	männlich	Gesamt	K115	K113
c-ALL	bcr/abl Fusion-pos.	3	7	10	-	1
	bcr/abl Fusion-neg.	10	23	33	3	4
prä-B-All	bcr/abl Fusion-neg.	5	0	5	-	1
pro-B-All	t(4;11)(q21;q23)	0	1	1	-	-
Gesamt-Proben		18	32	50	3 (6 %)	6 (12 %)

*Ergebnis nach Ausschluss Solo-LTR

Tabelle III-4: Ergebnisse viruspositiver Proben von CML-Patienten

CML: Anzahl der untersuchten Proben	PCR-Ergebnis* der positiven Proben					
	weiblich	männlich	Gesamt	Solo-LTR	K115	K113
bcr/abl-Fusionsgen						
bcr/abl-positiv	13	15	28	1	2	3
bcr/abl-negativ	1	1	2	-	-	-
Gesamt-Proben	14	16	30	1 (3,3 %)	2 (6,6 %)	3 (9,9 %)

*Ergebnis nach Ausschluss Solo-LTR

Tabelle III-5: Ergebnisse viruspositiver Proben von AML-Patienten

AML: Anzahl der untersuchten Proben	PCR-Ergebnis* der positiven Proben				
	weiblich	männlich	Gesamt	K115	K113
M3	3	3	6	-	1
M4	3	0	3	-	-
M2	2	3	5	1	-
M6	0	1	1	1	-
M7	0	1	1	-	-
AML ohne FAB-Klassifikation	10	7	17	3	4
Gesamt-Proben	18	15	33	5 (15,15 %)	5 (15,15 %)

*Ergebnis nach Ausschluss Solo-LTR

III.3 Auftrennung im Agarosegel

Der Wildtyp bzw. die Präintegrationsstelle (Insertionssequenz) ließ sich bei allen 193 Proben nachweisen, d.h. HERV-K113 und HERV-K115 waren in keinem Fall homozygot vorhanden. Bei Homozygotie wäre die Präintegrationssequenz nicht nachweisbar und somit kein PCR-Produkt amplifizierbar. Für den Nachweis der Präintegrationsstelle waren bei allen Proben sowohl für HERV-K115 in der PCR I als auch für HERV-K113 in der PCR IV auf dem Agarosegel Banden detektierbar. Integrierte Virussequenzen, wie beispielhaft in Abbildung III-1 in PCR V und PCR VI für HERV-K113, ließen sich mit deutlichen Banden nachweisen. Verglichen mit dem verwendeten Längenstandard (Doppelstrang DNA von 72 bp bis 1353 bp) konnte HERV-K113 mit einer Größe von 1146 bp und für HERV-K115 mit 1268 bp zugeordnet werden. Bei 15

der 193 Patientenproben konnte HERV-K115 (7,8 %) und bei 26 HERV-K113 (13,5 %) nachgewiesen werden.

Die viruspositiven Proben wurden zum Ausschluss einer Solo-LTR mit einer weiteren PCR kontrolliert. Zeigte sich hierbei keine Bande, galt dies als Nachweis einer Solo-LTR (Abb. III-2, Ausschluss Solo-LTR-PCR, Patientenprobe 100). Nur eine Solo-LTR konnte bei einer der CML-Patientenprobe detektiert werden.

III.4 Vergleichsgruppe

Als Kontrollgruppe wurde das Patientenkollektiv aus einer Mamma-Karzinom-Studie von 2004 gewählt. Hierbei sind die Prävalenzen von HERV-K113 und HERV-K115 bei 102 Patientinnen ohne Karzinomanamnese und einem Alter zwischen 25 – 92 Jahren bestimmt worden. Für HERV-K113 lag sie bei 12,7 % und für HERV-K115 bei 9,8 % (Burmeister T. et al, 2004). Es wurde die Häufigkeit der HERV-K-positiven Proben mit der Prävalenz der Kontrollgruppe verglichen.

Abbildung III-1: DNA-Auftrennung im Agarosegel

Beispielhafte Darstellung von HERV-K-PCR-Ergebnissen,
 Längenstandard PCR Produkte: 72 bp bis 1353 bp,
 PCR Produkt HERV-K113: 1146 bp, HERV-K115 1268 bp

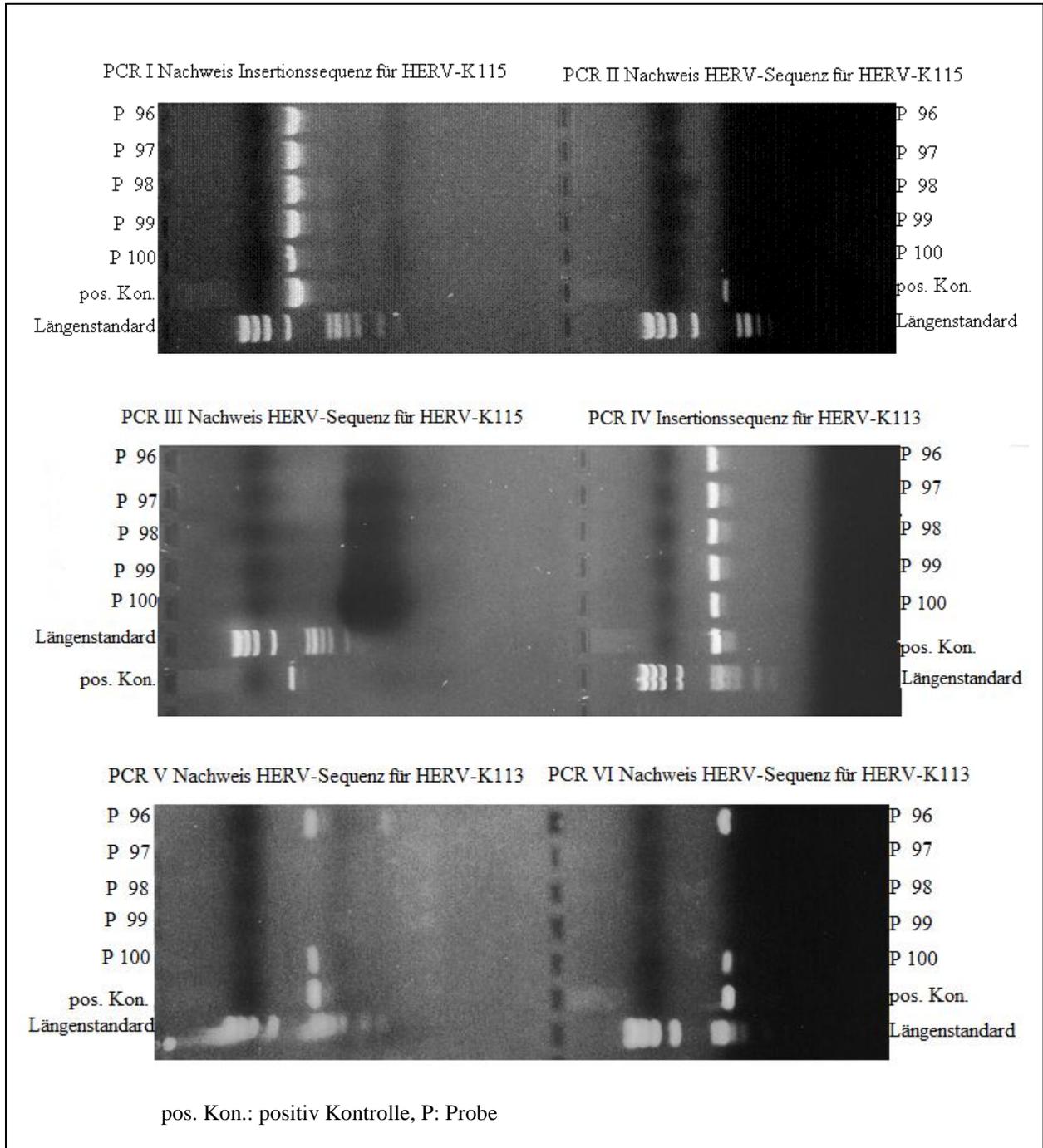
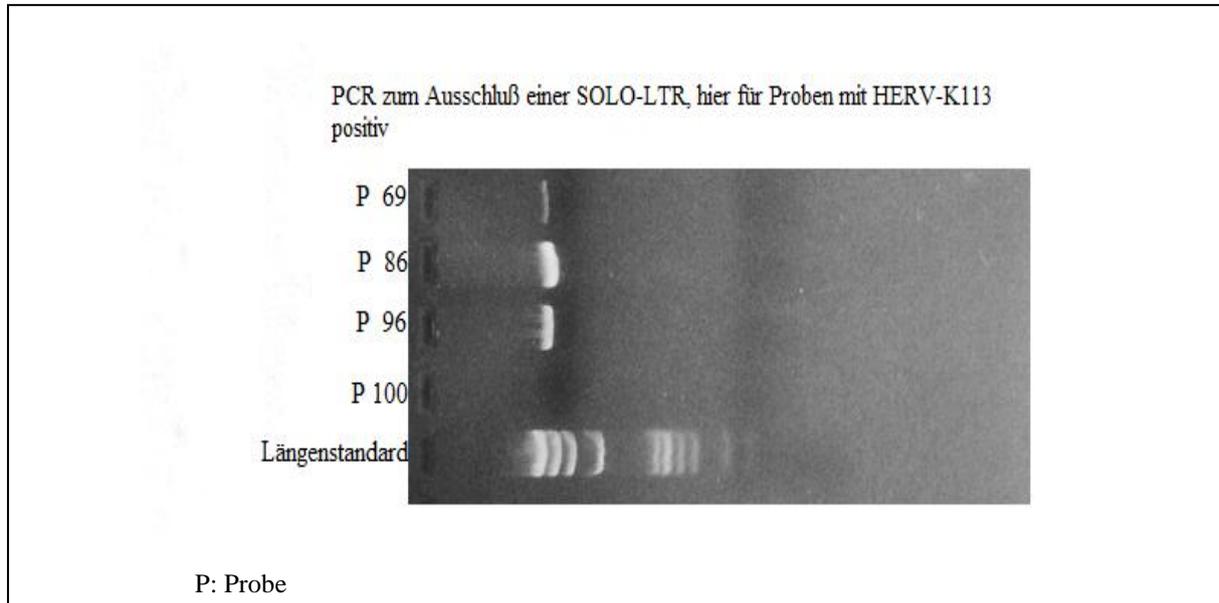


Abbildung III-2: DNA-Auftrennung im Agarosegel

Längenstandard PCR-Produkte: 72 bp bis 1353 bp,

PCR-Produkt HERV-K113: 1146 bp, HERV-K115 1268 bp.

**III.5 Auswertung**

Um am Ende einen signifikanten Zusammenhang (Signifikanz p) zwischen Virusnachweis und Leukämieerkrankung erkennen zu können, wurde der exakte Fischer-Test nach Ronald Aylmer Fisher mit einem Freiheitsgrad (df , degree of freedom) von 1 angewandt. Mit diesem Test erhält man auch bei kleinen Beobachtungswerten (Erwartungswert kleiner 5) zuverlässige Resultate. Im Anwendungsbereich entspricht dieser Test dem Chi-Quadrat-Test. Ein p -Wert von kleiner als 0,05 wird als signifikant bezeichnet. Die aus dieser Studie erhaltenen Ergebnisse hatten einen p -Wert zwischen 0,52 und 0,93 und waren somit nicht signifikant unterschiedlich.

Eine AML-Probe zeigte sich sowohl für HERV-K113 also auch für HERV-K115 heterozygot.

Insgesamt ließen sich bei 26 der Patienten (13,5 %) HERV-K113 und bei 15 der Patienten (7,8 %) HERV-K115 nachweisen. Im Einzelnen ergab sich bei den verschiedenen Leukämien folgendes Ergebnis:

HERV-K113 war in sechs der 50 (12 %; $p = 1$) B-Linien-ALL Proben nachweisbar, bei der T-Linien-ALL war das Virus in sechs der 40 (15 %; $p = 0,78$) Proben nachweisbar. Bei der

B-CLL waren es sechs von 40 (15 %; $p = 0,78$), bei der CML drei von 30 (10 %; $p = 1$) und bei der AML fünf von 33 (15 %; $p = 0,77$) Proben, in denen das Virus nachgewiesen werden konnte.

HERV-K115 war bei drei von 50 (6 %; $p = 0,54$) der B-Linien-ALLs, sowie bei zwei von 40 der T-Linien-ALLs (5 %; $p = 0,50$), als auch bei drei von 40 (7,5 %; $p = 1$) der B-CLLs nachweisbar.

Bei 30 CML-Proben war das Virus zweimal (2 %; $p = 0,73$) und bei 33 AML-Proben fünfmal (15 %; $p = 0,52$) nachweisbar.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Prävalenzen aus der oben genannten Mamma-Karzinom-Studie und unter Anwendung des exakten Fischer-Tests, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

Für die endogenen Retroviren HERV-K113 und HERV-K115 ergab sich kein Hinweis auf einem ätiopathogenetischen Zusammenhang zwischen diesen ERV und den untersuchten Leukämieformen.

III.6 Quantitative Real-Time-PCR

Es wurden unterschiedliche Sonden und Primer konstruiert, die in mehreren Versuchen auf ihre Spezifität getestet wurden. Die Konstruktion gestaltete sich schwierig. Dies lag vermutlich zum einen am hohen AT-Gehalt und am Vorliegen vieler repetitiver Sequenzen an den Insertionsstellen von HERV-K113 und HERV-K115 und zum anderen wohl daran, dass im menschlichen Genom viele 1000 HERV-K solo-LTRs vorliegen, die das Entstehen unspezifischer Amplifikationen begünstigen können. Nach längeren Versuchen mit verschiedenen Primern und Sonden konnten schließlich zwei qRT-PCR entwickelt werden, die HERV-K113 bzw. HERV-K115 spezifisch und sensitiv quantitativ nachweisen konnten. Der Versuch, eine quantitative PCR für HERV-K113 und -K115 mit allen Primern und Sonden in einem einzigen Ansatz zu konstruieren, misslang, vermutlich wegen der oben genannten Gründe.

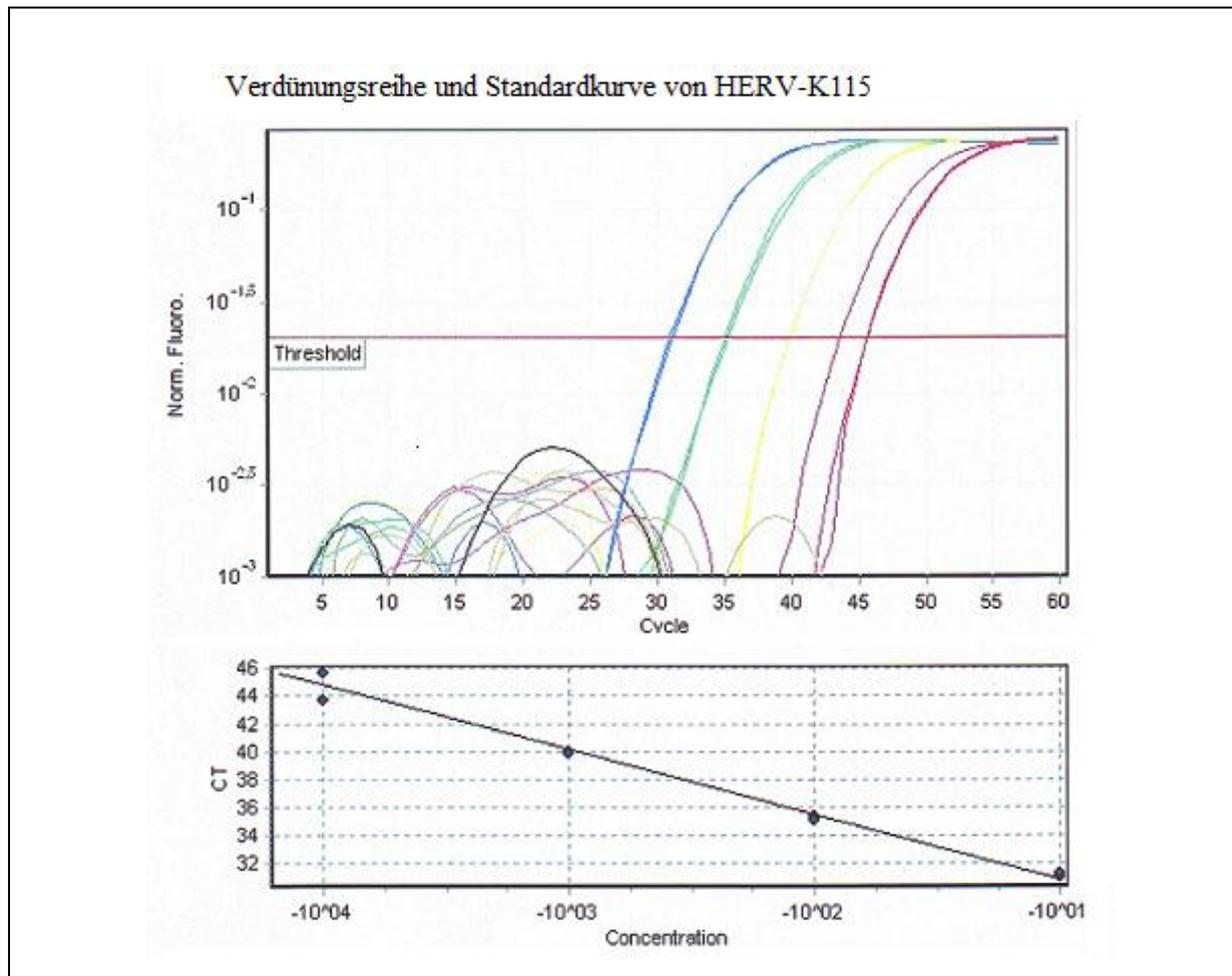
Aufgrund der ähnlichen Nukleotidsequenzen in der LTR-Region der Provirussequenz konnte hier ein forward-Primer für beide Virustypen verwendet werden. Eine virusspezifische Amplifikation ist durch die unterschiedlichen reverse-Primer möglich.

III.7 Verdünnungsreihe

Die einzelnen Verdünnungen von 1:10 bis 1:10.000 lassen sich in der Real-Time-PCR aufzeigen (siehe Abb. III-3 und Abb. III-4). Die Qualität einer Verdünnungsreihe kommt im Korrelationskoeffizienten zum Ausdruck. Dieser soll idealerweise in der Nähe von 1 liegen.

Die linearen Standardkurven beider Viren weisen einen Koeffizienten von 0,99 auf, was einer sehr guten Linearität entspricht. Hiermit war sowohl die Verdünnungsreihe aussagekräftig und verwendbar als auch die Linearität der Amplifikation bewiesen.

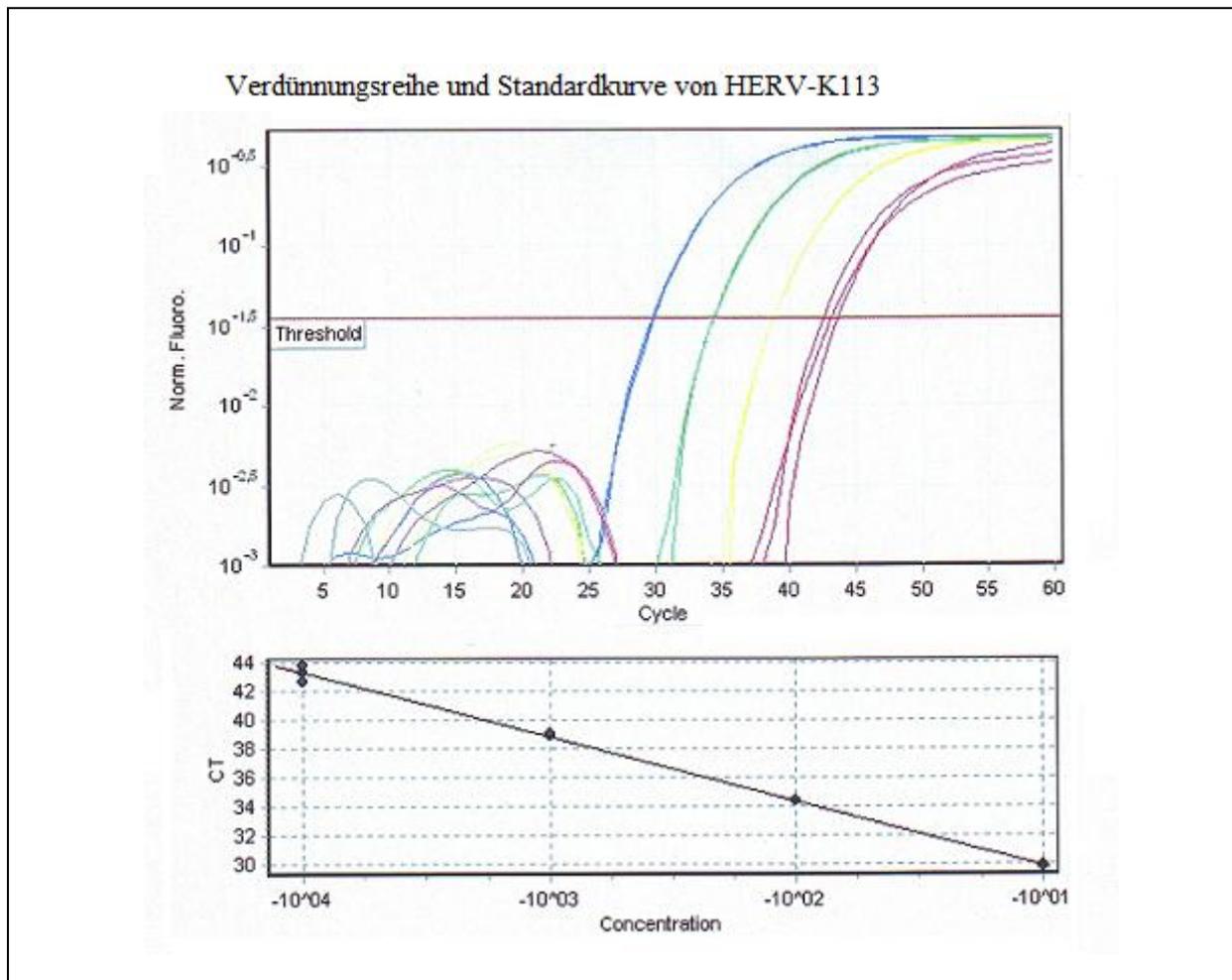
Abbildung III-3: Verdünnungsreihe und Standardkurve



Verdünnungen: blaue Kurve: 1:10, grüne Kurve 1:100, gelbe Kurve: 1:1000, violette Kurve:1:10.000

Ein weiteres Gütekriterium ist die Steigung der Standardkurve, die bei optimaler Amplifikation bei $M \approx -3,25$ ($= \log_2(10)$) liegen sollte. Bei HERV-K113 und HERV-K115 liegt diese bei etwa $M \approx -4$. Diese Abweichung lässt sich durch die letzten Verdünnungen ab 1:10.000 erklären. Hier wird eine genaue Amplifikation auf Grund der geringen Konzentration der vorhandenen DNA schwierig und damit die Kurven ungenau. Jedoch scheint eine Sensitivität bis 1:10.000 für eine quantitative Aussage bei Chimärismusuntersuchungen ausreichend.

Abbildung III-4: Verdünnungsreihe und Standardkurve



Verdünnungen: blaue Kurve: 1:10, grüne Kurve 1:100, gelbe Kurve: 1:1000, violette Kurve:1:10.000

IV Diskussion

Die genauen Ursachen für die Entstehung der Leukämien sind in der Mehrzahl der Fälle unbekannt. Zu den bekannten möglichen Auslösern gehören ionisierende Strahlung, verschiedene Chemikalien wie zum Beispiel Benzol und Zytostatika oder im speziellen Fall der adulten

T-Zell-Leukämie das Retrovirus HTLV-1. Leukämien entstehen durch maligne Entartung hämatopoetischer Zellen. Regelmäßig sind in Leukämiezellen genetische Veränderungen, wie Deletionen, Translokationen oder andere Mutationen zu finden. Diese Veränderungen, die zu einem gestörten Proliferations- und Differenzierungsverhalten oder zu einem gestörten Ablauf der Apoptose führen, können für diese Transformationen verantwortlich sein. Aus dem Ungleichgewicht zugunsten eines vermehrten Zellwachstums resultiert eine klonale Expansion der leukämischen Zellen und eine Verdrängung der normalen und gesunden hämatopoetischen Zellen. Einzelne Fallberichte und Laborstudien haben gezeigt, dass HERV bei chromosomalen Aberrationen involviert sein können (Wahbi K et al, 1997), als Insertionsmutagene wirken und möglicherweise über Beeinflussung zellulärer Onkogene oder Promotoren Regulationsprozesse und damit den Zellzyklus stören (Budzin A et al, 2006). Die unterschiedlichen Leukämieformen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, weisen charakteristische genetische Unterschiede auf. Die Bildung von Translokationen wie zum Beispiel t(11;17) bei der Promyelozytenleukämie und der möglicherweise bestehende Zusammenhang mit dem *rec*-Protein führt zu einer Veränderung der Funktion und der Expressionsstärke einzelner Gene. Abhängig vom Integrationsort der viralen Sequenzen kann es zur Beeinflussung des Expressionsverhaltens einzelner zellulärer Gene durch virale Promotor oder Enhancer-Elemente kommen (Larsson E et al, 1998).

Die meisten HERVs sind nach bisherigen Daten überwiegend in Keimbahnzellen, embryonalem Gewebe und der Plazenta exprimiert. Dabei kommt der Expression des HERV-W *env* Proteins in plazentalem Gewebe eine besondere Bedeutung zu. Es konnte gezeigt werden, dass das *env*-W-Protein in humanen Trophoblasten stark exprimiert wird und maßgeblich an der Trophoblasten-Zellfusion und Differenzierung zum Syncytiotrophoblasten beteiligt ist (Blond JL, 1999; Frenzo JL, 2003).

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob HERV-K113 oder HERV-K115 eine erhöhte Prävalenz bei den unterschiedlichen Leukämieformen aufweisen und damit möglicherweise in einem pathogenetischen Zusammenhang mit diesen Erkrankungen stehen. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur nicht leukämieerkrankten Kontrollgruppe aus den vorangegangenen

Mamma-Karzinom-Studien konnte nicht festgestellt werden. Dies lässt es statistisch unwahrscheinlich erscheinen, dass HERV-K113 und HERV-K115 an der Pathogenese der Leukämie beteiligt sind. Da aber in dieser Arbeit nur zwei Vertreter der HERV-K-Familie untersucht wurden, ist eine Beteiligung anderer HERV nicht ausgeschlossen. Zum Beispiel ist das ebenso phylogenetisch junge HERV-K (HLM-2.HOM) auf Chromosom 7 im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht worden. Es weist, wie auch HERV-K113 und HERV-K115, nur geringe Unterschiede zwischen den flankierenden LTR auf, und die intakten HERV-K *env*- und *gag*-Gene lassen auf noch vorhandene Aktivität schließen (Mayer, J., Sauter, M., 1999). Da dieses Retrovirus keinen Insertions-Polymorphismus aufweist, ist es als Marker für Chimärismus-Untersuchungen allerdings ungeeignet.

Eine Therapieoption bei Leukämien ist die allogene Stammzelltransplantation, bei der die erkrankte Blutbildung durch die eines HLA-identischen Spenders ersetzt wird. Vor der Übertragung des Spendermaterials erfolgt eine sogenannte Konditionierungstherapie, bei der die erkrankte Blutbildung des Empfängers mittels Bestrahlung und/oder Chemotherapie zerstört wird. Immunsuppressiva sollen nach Transplantation eine Inkompatibilität im Sinne einer Graft-versus-Host-Immunreaktion verhindern. Allerdings ist die Graft-versus-Leukämie-Reaktion, bei der sich T-Zellen des Transplantats gegen noch verbliebene Tumorzellen richten, erwünscht. Um eine Aussage über das Anwachsen der Spenderhämatopoese machen zu können, werden Chimärismus-Untersuchungen durchgeführt. Hierfür ist es essentiell, dass sich Spender- Empfängerhämatopoese in einem mittels PCR quantifizierbaren Merkmal unterscheiden. Durch das polymorphe Auftreten von HERV-K113 und HERV-K115 eignen sich diese Viren für solche Untersuchungen. Im Falle eines viruspositiven Empfängers und virusnegativen Spenders kann anhand von Verdünnungsreihen eine quantitative Aussage über das Verhältnis von Spender- zu Empfängerhämatopoese gemacht werden. Auf diese Weise können Aussagen über das Anwachsen der Zellen, über die neue Blutbildung oder aber über Rezidive und Immunreaktionen gemacht werden. Daran orientiert könnte die Immunsuppression angepasst und gesteuert werden.

Als Methode für Chimärismusuntersuchungen eignet sich die Real-Time-PCR aufgrund ihrer Schnelligkeit und der Möglichkeit, quantitative Aussagen in einem großen Bereich (mehrere log-Stufen) machen zu können.

Dass die Vergleichsdaten dieser Studie aus einer rein weiblichen Kontrollgruppe hervorgehen, ist in diesem Fall unerheblich, da sich HERV-K115 und HERV-K113 nicht auf den Geschlechtschromosomen befinden. Allerdings kann auf Grund der kleinen Patientenzahl nur von einem statistisch nicht signifikanten Zusammenhang gesprochen werden. Ob sich einzelne Subgruppen

in der Prävalenz der Viren unterscheiden, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

V Zusammenfassung

Durch Integration von Retroviren in Keimbahnzellen und die darauf folgende vertikale Weitergabe dieser viralen Sequenzen vor Millionen von Jahren kam es dazu, dass heute bis zu acht Prozent des menschlichen Genoms aus endogenen retroviralen Sequenzen besteht. Durch die Sequenzierung und Analyse des menschlichen Genoms konnten viele dieser viralen Elemente verschiedenen Klassen zugeordnet werden. Unter ihnen nimmt die HERV-K-Familie eine besondere Rolle ein. Zum einen werden einige ihrer Mitglieder in RNA transkribiert und Proteine translatiert oder sind sogar zur Bildung von Virus-Proteinen in der Lage. Zum anderen zeigte sich, dass sie an der Entstehung von Keimbahntumoren beteiligt sind. Von besonderem Interesse sind die phylogenetisch jungen HERV-K113 und HERV-K115. Ihre Integration in die menschliche Keimbahn fand vermutlich in einem Zeitraum vor 100.000 bis 500.000 Jahren statt. Ebenso sprechen vollständige offene Leserahmen für alle viralen Gene und eine erhaltene Präintegrationsstelle für ein phylogenetisch junges Alter und für die Möglichkeit funktionelle Proteine bilden zu können. Mittels Polymerasekettenreaktion wurde in dieser Arbeit die Häufigkeit von HERV-K113 und HERV-K115 bei 193 leukämieerkrankten Patienten untersucht. Für HERV-K113 zeigte sich eine Prävalenz von 7,8 Prozent und für HERV-K115 eine Prävalenz von 13,5 Prozent. Verglichen mit der Kontrollgruppe aus einer vorangegangenen Mamma-Karzinom-Studie ließ sich hier statistisch kein signifikanter Unterschied nachweisen. Somit erscheint auch eine mögliche Pathogenität dieser beiden Viren hinsichtlich der untersuchten Leukämien unwahrscheinlich.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine quantitative Real-Time-PCR für HERV-K113 und HERV-K115 zu entwickeln. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten qPCRs lassen sich für Chimärismusuntersuchungen nach allogener Stammzell- oder Knochenmarkstransplantation nutzen, falls der Empfänger Träger eines der beiden HERV-K und der Spender dafür negativ ist.

VI Literaturverzeichnis

Akopov SB, Nikolaev LG, Khil PP, et al. Long terminal repeats of human endogenous retrovirus K family (HERV-K) specifically bind host cell nuclear proteins. *FEBS Lett* 1998;421:229-322.

Armbrüster V, Sauter, M, Krautkrämer E et al. A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transfected cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:1800-1807.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868-871.

Barbulescu M, Turner G, Seaman S, et al. Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr Biol* 1999;9:861-868.

Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit: Arbeitsschritte für die Durchführung einer Realtime-PCR Analyse. (2007).

Belshaw R, Pereira V, Katzourakis A, et al. Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4894-4899.

Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 1936;84:162.

Blond JL, Besème F, Duret L, et al. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol* 1999;73:1175-1185.

Boese A, Sauter M, Galli U, et al. Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Oncogene* 2000;19:4328-4336.

Boller K, König H, Sauter M, et al. Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HDTV. *Virology* 1993;196:349-353.

Burmeister T, Ebert AD, Pritze W, et al. Insertional polymorphism of endogenous HERV-K113 and HERV-K115 retrovirus in breast cancer patients and age-matched controls. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20:1223-1229.

Buzdin A, Kovalskaya-Alexandrova E, Gogvadze E et al. At least 50 % of human-specific HERV-K (HML-2) long terminal repeats serve in vivo as active promoters for host nonrepetitive DNA transcription. *J. Virol* 2006;80:10752-10762.

- Coffin JM.** Structure and classification of retroviruses. In: Levy JA, ed. The Retroviridae, vol 1. Plenum Press, New York, 1992:19-50.
- Frendo JL, Olivier D, Cheynet V, et al.** Direct involvement of HERV-W EnV glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 2003;23:3566-3574.
- Galli UM, Sauter M, Lecher B, et al.** 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* 2005;28:3223-3228.
- Gifford R, Tristem M.** The evolution: distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* 2003;26:291-315.
- Goodchild NL, Wilkinson DA, Mager DL:** A human endogenous long terminal repeat provides a polyadenylation signal to a novel, alternatively spliced transcript in normal placenta. *Gene* 1992;121:287-194.
- Griffith DJ.** Endogenous retroviruses and human genom sequence. *Genome Biol* 2001;2:1017.1-1017.5.
- Hehlmann R, Brack-Werner R, Leib-Mösch C.** Human endogenous retroviruses. *Leukemia* 1988;2(12 Suppl):167S-177S.
- Johnson WE, Coffin JM.** Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10254-10260.
- Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Gruoff M, et al.** A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 1982;218:571-573.
- Kleiman A, Senyta N. Et al.** HERV-K(HML-2) GAG/ENV Antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumours. *Int.J. Cancer* 2004: 110, 459-461
- Knössl M, Lower R, et al.** Expression of human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K is enhanced by cellular transcription factor YY1. *J Virol* 1999;73:1254-1261.
- Larsson E, Katon N.** Human endogenous retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;148: 115-132.
- Larsson E, Andersson G.** Beneficial role of human endogenous retroviruses: Facts and hypotheses. *Scand J Immunol* 1998;48:329-338.

- Leib-Mösch C**, Bachmann M, Brack-Werner R, et al. Expression and biological significance of human endogenous retroviral sequences. *Leukemia* 1992;6:72-75.
- Limjoco T**, Nihne A, Silver J. Resistance to retroviral infection in transgenic and bone marrow chimeric mice containing Fv4-env-expressing hematopoietic cells. *J Virol* 1995;208: 75-83.
- Löwer R**, Boller K, Hasenmaier B, et al. Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4480-4484.
- Löwer R**, Tönjes R, Korbmacher C. Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J Virol* 1995;69:141-149.
- Löwer R**, Löwer J, Kurth R. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5177-5184.
- Magin C**, Löwer R: cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/rxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. *J Virol* 1999;73:9496-9507.
- Mayer J**, Sauter M, Racz A, et al. An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nature Genetics* 1999;21:257-258.
- Medstrand P**, Mager DL: Human- specific integrations of the HERV-K endogenous retroviral family. *J Virol* 1998;72:9782-9787.
- Mi S**, Lee X, Li X et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 2000;403:785-789.
- Ono M**. Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes. *J Virol* 1986;58:937- 944.
- Poiesz BJ**, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7415-7419.
- Rous P**. A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl). *J Exp Med* 1910;12:696.
- Ruda VM**, Akopov SB, Trubetskoy NL, et al. Tissue specificity of enhancer and promoter activities of a HERV-K (HML-2) LTR. *Virus Res* 2004;104:11-16.
- Sauter M**, Schommer S, Kremmer E, et al. Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J Virol* 1995;69:414-421.

Stoye JP. Endogenous retroviruses: Still active after all these years? *Curr Biol* 2001;11:914-916.

Turner G, Barbulescu M, Su M, Jack Lenz et al.: Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* 2001;11:1531-1535.

Urnovitz H, Murphy W. Human endogenous retroviruses: Nature, occurrence, and clinical implications in human disease. *Clinical Microbiol Rev* 1996; 9:72-99.

Wahbi, K, Hayette, S, Callanan, M, et al. Involvement of a human endogenous retroviral sequence (THE-7) in a t(7;14)(q21;q32) chromosomal translocation associated with a B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1997;11:1214-1219.

VII Anhang

VII.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle I-1:	Klassifizierung der Retroviren.....	2
Tabelle II-1:	Primer – Paare für die konventionelle PCR 1.....	16
Tabelle II-2:	Primer – Paare für die konventionelle PCR 2.....	16
Tabelle II-3:	Ausschluss Solo-LTR-PCR.....	16
Tabelle II-4:	Primer und Sonden	21
Tabelle III-1:	Ergebnisse viruspositiver Proben von T-Linien-ALL-Patienten.....	28
Tabelle III-2:	Ergebnisse viruspositiver Proben von CLL-Patienten.....	28
Tabelle III-3:	Ergebnisse viruspositiver Proben von B-Linien-ALL Patienten.....	29
Tabelle III-4:	Ergebnisse viruspositiver Proben von CML-Patienten	29
Tabelle III-5:	Ergebnisse viruspositiver Proben von AML-Patienten	30

VII.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung I-1:	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Virus.....	3
Abbildung I-2:	Genomorganisation eines Retrovirus als a) RNA-Genom und b) als Provirus	5
Abbildung I-3:	DNA-Rekombination bei endogenen Retroviren.....	8
Abbildung II-1:	Nachweis des Wildtyps.....	19
Abbildung II-2:	Nachweis der HERV-Insertion	20
Abbildung II-3:	Ausschluss Solo-LTR	20
Abbildung II-4:	Oligonukleotidsequenzen von HERV-K113.....	22
Abbildung II-5:	Oligonukleotidsequenzen von HERV-K115.....	22
Abbildung II-6:	Hydrolysesonde/TaqMan-Sonde.....	24
Abbildung II-7:	Hydrolyse der Sonde und Emission von Fluoreszenzlicht	24
Abbildung II-8:	Treshold	25
Abbildung III-1:	DNA-Auftrennung im Agarosegel.....	32
Abbildung III-2:	DNA-Auftrennung im Agarosegel.....	33
Abbildung III-3:	Verdünnungsreihe und Standardkurve.....	35
Abbildung III-4:	Verdünnungsreihe und Standardkurve.....	36

VII.3 Abkürzungen

A	Adenosin
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ATL	adulte T-Zell-Leukämie
bp	Basenpaar
C	Cytosin
c-onco	zelluläres Onkogen
CIS	Carcinoma in situ
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CT	Threshold-Cycle, Schwellenwert
df	degree of freedom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGIL	European Group for Immunophenotyping of Leukemia
env	envelope
ERV	endogene Retroviren
FAB	French-American-British-Cooperative-Group
G	Guanin
gag	gruppenspezifisches Antigen
HAM	HTLV-1-assoziierte Myelopathie
HERV	human endogene Retroviren
HIV-1 und -2	humanes Immundefizienzvirus 1 und 2
HML-2	human MMTV-like-group-2
HTDV	human teratocarcinoma-derived virus
HTLV-1/-2	T-lymphotropes Virus 1 und 2

ICTV	International Committee on the Taxonomy of Viruses
kb	Kilobasen
LTR	Long Terminal Repeats
MMTV	Maus-Mamma-Tumorvirus
MLV	murines Leukämie-Virus
MPN	myeloproliferative Neoplasie
neg.	negativ
NHL	Non Hodgkin Lymphom
ORF	open reading frame
PBS	Primer-Bindungsstelle
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLFZ-Protein	Promyelozyten-Leukämie-Zink-Finger-Protein
pol	Polymerase
pos.	positiv
q-PCR	qualitative Real-Time-PCR
R	redundant
RAR α -Gen	Retinolsäure-Rezeptor-alpha-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
tRNA	transfer-RNA
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT	Reverse Transkriptase
RV	Retroviren
T	Thymin
TSP	tropische spastische Paraparese
U	unique

Erklärung

Ich, Annette Sternberg, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Prävalenzen der humanen endogenen Retroviren, K113 und K115, bei Patienten mit akuter/chronischer Leukämie“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“