

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Charakterisierung einer humanen endogenen retroviralen
dUTPase als Suszeptibilitätsgen für Psoriasis vulgaris**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elisa Blumenthal-Barby

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med W. Sterry
2. Prof. Dr. med. M. Weichenthal
3. Prof. Dr. med. G. Wozel

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Psoriasis	1
1.2	Epidemiologie der Psoriasis	2
1.3	Pathophysiologie der Psoriasis	2
1.4	Genetik der Psoriasis	4
1.4.1	Genetische Prädisposition	4
1.4.2	Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium)	5
1.4.3	Genetische Analysen	5
1.4.4	Humaner Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC/HLA)	6
1.4.5	Psoriasis-Kandidatengene	7
1.4.6	Psoriasis-Suszeptibilitäts-Locus 1 (PSORS1)	7
1.4.6.1	<i>Die RH1/RH2-Zielregion für PSORS1 (Nair et al., 2000)</i>	8
1.4.7	Andere Psoriasis-Suszeptibilitäts-Loci	10
1.4.8	Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zur Identifizierung von Psoriasis-Risikopolymorphismen	10
1.5	Retroviren	11
1.5.1	Klassifikation der Retroviren	11
1.5.2	Aufbau und Genomstruktur der Retroviren	12
1.5.3	Endogene Retroviren	12
1.5.4	Humane endogene Retroviren (HERVs)	13
1.5.5	HERV-K/HML-2.HOM	13
1.5.5.1	<i>Expression der HERV-K in humanem Gewebe</i>	14
1.5.6	Biologische Relevanz der HERVs für den Wirtsorganismus	15
1.6	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	16
1.6.1	Reanalyse der PSORS1-Lokalisation von Nair et al., 2000	16
1.6.2	BLAST-Analyse der PSORS1-Zielregion	16
1.6.3	Proteinalignment und Identifizierung einer retroviralen dUTPase	16
1.6.4	Identifizierung Psoriasis-assoziiierter Sequenzvariationen	18
1.6.5	Die dUTPase (Desoxyuridintriphosphat-Pyrophosphatase)	19
2	Zielstellung	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Materialien und Chemikalien	22
3.1.1	Geräte	22
3.1.2	Chemikalien/Puffer/Enzyme	22
3.1.3	Zusammensetzungen häufig verwendeter Reagenzien, Puffer und Medien	24
3.1.4	Kits	25
3.1.5	Bakterienstämme	25
3.1.6	Vektoren	25
3.1.7	Oligonukleotide	25
3.2	Molekularbiologische Methoden	26
3.2.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)	26
3.2.2	RNA-Isolation aus PBMCs	27
3.2.3	RNA-Isolation aus Hautgewebeproben	27
3.2.4	Isolation von PolyA ⁺ -mRNA aus Gesamt-RNA	28
3.2.5	Densitometrische Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	28
3.2.6	RNA/DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie	28

3.2.7	DNase-Verdau	29
3.2.8	cDNA-Erststrangsynthese	29
3.2.9	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
3.2.10	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	31
3.2.11	Vollblut-Assay	33
3.2.12	Agarosegel-Elektrophorese	34
3.2.13	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	34
3.2.14	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
3.2.15	Sequenzierung von DNA	34
3.2.16	Klonierung von PCR-Produkten.....	35
3.2.16.1	<i>Design der Primer</i>	36
3.2.16.2	<i>Sac1-5785-Xho1-6241-PCR</i>	36
3.2.16.3	<i>Restriktions-Verdau</i>	37
3.2.16.4	<i>Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA</i>	37
3.2.16.5	<i>Ligation</i>	38
3.2.16.6	<i>Transformation rekombinanter DNA</i>	38
3.2.16.7	<i>Selektion positiver Klone durch den Blau-Weiß-Test</i>	39
3.2.16.8	<i>Isolierung von Plasmid-DNA</i>	39
3.2.17	RACE (rapid amplification of cDNA-ends)-PCR.....	40
3.2.17.1	<i>3'-Race-cDNA-Synthese und 3'-Race-PCR</i>	40
3.2.17.2	<i>5'-RACE-cDNA-Synthese und 5'-RACE-PCR</i>	40
3.2.17.3	<i>Nested RACE-PCR</i>	41
3.2.17.4	<i>RACE-PCR-Schema</i>	41
3.2.18	Klonierung der RACE-PCR-Produkte in E. coli-Zellen.....	42
3.2.19	Kultivierung von E. coli	42
3.3	BLAST-Analyse	42
4	Resultate	43
4.1	Expressionsanalyse der HERV-K-dUTPase	43
4.2	Strategie zum Nachweis der Expression des HERV-K-dUTPase-ORF 23048 ..	43
4.2.1	Expression des dUTPase-ORF in den PBMCs einer Probandin	44
4.2.2	Expression des dUTPase-ORF in läsionaler und nicht-läsionaler psoriatischer Haut	45
4.2.3	Expression des dUTPase-ORF unter Verwendung von PolyA ⁺ -mRNA	47
4.2.4	Etablierung eines RT-PCR-Assays aus Vollblut zum Nachweis PSORS1 assoziierter dUTPase-Fragmente in Einzelschritt-PCR.....	48
4.2.5	Expression des dUTPase-ORF mittels der Einzelschritt-60-64-RT-PCR.....	49
4.2.6	Expression des dUTPase-ORF mittels der Einzelschritt-56-60-RT-PCR.....	54
4.2.7	Expression des 3'-Endes des HERV-K-dUTPase-ORF	57
4.2.8	Expression der dUTPase-ORF-Einzelschritt-RT-PCR-Fragmente unter Verwendung von PolyA ⁺ -mRNA	58
4.2.9	Häufigkeitsverteilung der Einzelschritt-RT-PCR-Expressionen	59
4.2.10	Expression des PSORS1-assoziierten 1400-bp-dUTPase-Fragmentes	60
4.2.10.1	<i>Design der spezifischen Primerpaare für das 1400-bp-Fragment</i>	60
4.2.10.2	<i>56-69-PCR</i>	61
4.3	Klonierung des 1400-bp-PCR-Fragmentes in E. coli	62
4.3.1	Design der Restriktionsendonuklease-Primer.....	62
4.3.2	<i>Sac1-5785-Xho1-6241-PCR</i>	63
4.3.3	Restriktionsverdau – Ligation – Transformation	64
4.4	Analyse putativer regulatorischer Elemente der Expression des ORF 23048 ...	64

4.5	RACE (rapid amplification of cDNA ends)-PCR.....	65
4.5.1	Primerdesign der genspezifischen Primer für die RACE-PCR.....	66
4.5.2	Ergebnisse der RACE-PCR.....	66
5	Diskussion	67
5.1	Welche Sequenzvariabilität entspricht PSORS1?	67
5.2	Die PSORS1-Suszeptibilitätsgene in der näheren Betrachtung	67
5.2.1	Corneodesmosin (CDSN)	68
5.2.2	HLA-Cw6	69
5.3	Die HERVK-dUTPase als putativer Locus von PSORS1	69
5.4	HERVs und Autoimmunerkrankungen	71
5.4.1	Die Rolle der HERVs bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen.....	71
5.4.2	Antikörperantwort auf HERVs bei Psoriasis-Patienten.....	72
5.4.3	Nachweis der Expression von HERVs in psoriatischer Haut	72
5.4.4	Beeinflussende Faktoren der HERV-Expression bei der Psoriasis.....	73
5.4.5	Könnte die HERV-K-dUTPase aktiv sein?	74
5.5	Das Enzym dUTPase	75
5.5.1	Vorkommen und Funktion der dUTPase.....	75
5.5.2	Die Expression der humanen dUTPase.....	77
5.5.3	Expression der dUTPase in HERV-K.....	78
5.5.4	Struktur der dUTPasen und mögliche Funktion der PSORS1-dUTPase	79
5.5.5	Bedeutung der PSORS1-dUTPase bei inflammatorischen Prozessen	80
6	Zusammenfassung.....	81
7	Abkürzungsverzeichnis.....	82
8	Glossar	84
9	Literaturverzeichnis.....	87
	Danksagung.....	103
	Lebenslauf	104
	Publikationen.....	105
	Erklärung	106

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1.1: Sequenzmerkmale der putativen PSORS1-Zielregion	17
Abbildung 1.2: Retrovirale Elemente telomerisch von HLA-C als Residuen eines HERV-K-Retrovirus	18
Abbildung 1.3: Sequenz-Alignment der vorhergesagten Aminosäure-Sequenz des ORF23048 in der PSORS1-Region sowohl für den HR-Pool als auch für den LR-Pool mit bekannten dUTPasen	20
Abbildung 4.1: Spezifische Polymerasekettenreaktionen in Relation zu den offenen Leserastern (open reading frames, ORF) 22576 und 23048 und zu den Psoriasis- assoziierten Sequenzvariationen zwischen dem HR- und LR-Pool im 4,3-kb-Zielintervall	44
Abbildung 4.2: Expression des dUTPase-ORF (oben) und von β -Actin (unten) in psoriatischer und gesunder Haut sowie in PBMCs	46
Abbildung 4.3: Expression der HERV-K-dUTPase (links) und von β -Actin (rechts) in den PBMCs einer gesunden Probandin	47
Abbildung 4.4: Expression des dUTPase-ORF mit der 60-64-Einzelschritt-RT-PCR (oben) und von β -Actin (unten) in Vollblut von Psoriasis-Patienten	49
Abbildung 4.5: Expression des dUTPase-ORF mit der 60-64-Einzelschritt-RT-PCR (oben) und von β -Actin (unten) in Vollblut von gesunden Probanden	50
Abbildung 4.6: BLAST-Sequenzalignment des 60-64-RT-PCR-Produktes der Probandin 2	51-53
Abbildung 4.7: Expression des dUTPase-ORF mit der 60-64-Einzelschritt-RT-PCR (oben) und von β -Actin (unten) in Vollblut von Psoriasis-Patienten	54
Abbildung 4.8: Lage der spezifischen Primerpaare im Verhältnis zum ORF 23048 ...	55
Abbildung 4.9: Expression des dUTPase-ORF 23048 mit der 56-60-Einzelschritt-RT- PCR (oben und mittig) und von β -Actin (unten) in Vollblut von Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden	56
Abbildung 4.10: Expression des 3'-Endes des dUTPase-ORF 23048 in Vollblut von Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden	57
Abbildung 4.11: Expression PSORS1-assoziiertes dUTPase-Fragmente mit der 56-60- RT-PCR (erwartete Länge 462 bp), 60-64-RT-PCR (erwartete Länge 430 bp) und der 63-69-RT-PCR (erwartete Länge 624 bp) in Vollblut der gesunden Probandin 1	58
Abbildung 4.12: Expression des rund 1400-bp-umfassenden PSORS1-assoziierten dUTPase-Fragmentes in Vollblut der Typ 1-Psoriasis-Patienten 5 und 7 sowie der gesunden Probandin 2	62
Abbildung 4.13: Putative regulative Elemente der exprimierten HERV-K-PSORS1- dUTPase	65

Tabellen

Tabelle 3.1: Spezifische Primerpaare	26
Tabelle 3.2: β -Actin Primer	26
Tabelle 3.3: DNase-Verdau	29
Tabelle 3.4: RT-PCR mit spezifischen Primern in einem Gesamtvolumen von 25 μ l	32

Tabelle 3.5: PCR mit β -Actin-Primern in einem Gesamtvolumen von 25 μ l ...	32
Tabelle 3.6: PCR-Programm für die RT-PCR abgestimmt auf die Taq-DNA-Polymerase	32
Tabelle 4.1: Dargestellt sind die Expressionsergebnisse der 56-60-PCR, 60-64-PCR und 63-69-PCR bei allen analysierten Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden	59
Tabelle 4.2: Spezifische Primerpaare für das 1400-bp-Fragment	61

1 Einleitung

1.1 Die Psoriasis

Die Schuppenflechte (Psoriasis vulgaris) ist eine häufige, chronisch-entzündliche Erkrankung, die durch charakteristische silbrig schuppene, erythemosquamöse Plaques an der Haut gekennzeichnet ist. Ihre Manifestation wird durch das Zusammenspiel genetischer, immunologischer sowie endogener und exogener Faktoren beeinflusst (Elder et al., 2001). Sie betrifft etwa 2 % der Bevölkerung weltweit (Griffiths et al., 2007) und mindert die Lebensqualität Betroffener erheblich (Gupta et al., 1993). Im klinischen Bild heterogen kann die Psoriasis Prädilektionsstellen wie die Extremitätenstreckseiten und das Capillitium bis hin zum gesamten Integument befallen sowie Nägel onycholytisch und dystrophisch verändern. Bei bis zu 30 % der Patienten geht die Psoriasis mit einer Psoriasisarthritis einher (Reich et al., 2009; Gladman et al., 2005). Der Verlauf der Schuppenflechte gestaltet sich chronisch oder schubartig, wobei die Schuppenflechte in jedem Stadium spontan remittieren oder ganz ausheilen kann. Die Psoriasis vulgaris stellt mit einem Anteil von 80 bis 90 % die häufigste Manifestationsform dar. Daneben existieren klinisch und genetisch abweichende Sonderformen wie die Psoriasis pustulosa, die durch eine intraepidermale sterile Pustelbildung gekennzeichnet ist (Asumalahti et al., 2003). Auslösende Triggerfaktoren der Psoriasis können mechanischer, infektiöser (z. B. Tonsillitis durch β -hämolyisierende Streptokokken) (Skov et Baadsgaard, 2000), psychosomatischer oder medikamentöser Art (β -Blocker, Chloroquin, Lithium, $IFN\alpha$ bzw. $IFN\gamma$) sein (Ockenfels H.M. et al., 2003). Auch klimatische Bedingungen scheinen Einfluss auf die Aktivität zu nehmen und verbessern im Falle der UV-Strahlung zumeist den Krankheitszustand. Auf zellulärer Ebene ist die Psoriasis durch eine epidermale Hyperproliferation mit einer 10-fach erhöhten mitotischen Aktivität des Stratum basale sowie durch eine inkomplette Differenzierung der Keratinozyten charakterisiert. Dies manifestiert sich histologisch in Form einer Hyperkeratose, Hyperparakeratose und Akanthopapillomatose. Darüber hinaus findet man Ansammlungen neutrophiler Granulozyten innerhalb der Epidermis, eine Proliferation und Dilatation des superfiziellen dermalen Kapillarplexus sowie ein perivaskuläres inflammatorisches Infiltrat in der oberen Dermis (Kerl et al., Histopathologie der Haut, Kapitel 9, 2003).

1.2 Epidemiologie der Psoriasis

Die Psoriasis zeigt eine weltweite Verbreitung mit einer Abhängigkeit ihrer Prävalenz von Rasse und Geographie. Die größte Prävalenz weist sie in Nordeuropa und Skandinavien mit 3 % auf. In Japan ist die Schuppenflechte bei 0,2 % der Gesamtbevölkerung zu finden. Bei den indianischen Ureinwohnern Amerikas existiert sie nahezu nicht (Barker, 2001; Yip, 1984). Sie betrifft Männer und Frauen gleichermaßen. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Psoriasis-Patienten überzufällig häufig von bestimmten Komorbiditäten wie Diabetes mellitus, Adipositas, Hypertonie, koronare Herzerkrankung und Hyperlipoproteinämie betroffen sind (Boehncke et Sterry, 2009). Ein weiteres epidemiologisches Merkmal der Psoriasis stellt die Altersverteilung dar. Es finden sich zwei Peaks bezüglich des Zeitpunktes des Krankheitsausbruches: ein Erster zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr und ein kleinerer Zweiter zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Dies führte zu der Erkenntnis, dass zwei verschiedene Formen der Psoriasis existieren müssen (Henseler et Christophers, 1985). Die Typ 1-Psoriasis ist durch eine Erstmanifestation vor dem 40. Lebensjahr, eine positive Familienanamnese sowie durch eine Assoziation mit HLA-Cw6, -B13, -B17, -B57 und -DR7 gekennzeichnet (Russel et al., 1972; Brenner et al., 1978; Tsuji et al., 1979; Tilikainen et al., 1980; Gottlieb et Krueger, 1990; Henseler et Christophers, 1985). Demgegenüber treten bei der Psoriasis Typ 2 erste Krankheitserscheinungen nach dem 40. Lebensjahr auf, und eine familiäre Häufung fehlt. Anders als bei der Typ 1-Psoriasis zeigt sich eine Überrepräsentation von HLA-Cw2 und HLA-B27 (Schmitt-Egenolf et al., 1993; 1996).

1.3 Pathophysiologie der Psoriasis

Die Psoriasis wird heutzutage als eine T-Zell-vermittelte Erkrankung angesehen, die zumindest partiell auf einer Interaktion zwischen aktivierten T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen basiert und massgeblich durch $\text{IFN}\gamma$, IL-1 und $\text{TNF}\alpha$ getriggert wird (Elder et al., 2010). Die tragende Rolle der T-Zellen wurde in einem chimären Tiermodell dargestellt, bei dem humane, nicht-läsionale psoriatische Haut auf immundefiziente SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäuse transplantiert wurde. Erst die Injektion aktivierter CD4^+ -T-Lymphozyten von Psoriasis-Erkrankten in die transplantierte Haut induzierte im Bereich der Hauttransplantate die Manifestation einer Psoriasis (Wrone Smith et Nickoloff, 1996; Nickoloff et Wrone Smith, 1999). Unterstützung fand diese These durch die therapeutische Wirksamkeit des T-Zell-

selektiven Immunsuppressivums Cyclosporin A (Ellis et al., 1986; Griffiths et al., 1986) und von monoklonalen Anti-CD3- sowie Anti-CD4-Antikörpern (Weinshenker et al., 1989; Gottlieb et al., 2000), womit darüber hinaus den CD4⁺-T-Lymphozyten eine Schlüsselrolle zugeschrieben wurde. Ein pathogenetisches Zusammenspiel von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten wird jedoch vermutet. Während die CD4⁺-T-Lymphozyten in der oberen Dermis überwiegen (Szabo et al., 1998), exprimieren viele der klonal expandierten epidermalen T-Zellen in den psoriatischen Plaques CD8 (Chang et al., 1994).

Im Folgenden sollen die pathophänomenologischen Grundzüge der Psoriasis dargestellt werden: Dermale Infiltrate von CD4⁺-T-Lymphozyten erscheinen in der frühen Psoriasis-Läsion bereits vor epidermalen Veränderungen (Bjerke et al., 1978; Prinz, 2003). Die Entzündung in einer psoriatischen Plaque wird durch Gedächtnis-T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) getragen (Bos et al., 1989). Die Ansammlung aktivierter Gedächtnis-T-Zellen in der psoriatischen Läsion wird durch die Interaktion verschiedener Glykoprotein-Liganden und Chemokin-Rezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche mit diversen Adhäsionsmolekülen des Gefäßendothels der papillären Gefäße vermittelt (Prinz, 2003). Man vermutet, dass die Gedächtnis-T-Zellen dabei durch ständige Präsentation eines bis dato unbekanntes Psoriasis-Autoantigens proliferieren. Eine experimentelle Unterbrechung der Antigenpräsentation, z. B. durch Blockierung kostimulatorischer Moleküle hat die Rückbildung der Läsion zur Folge. Die psoriatischen T-Zellen exprimieren hochaffine IL-2-Rezeptoren und vermitteln die psoriatischen Hautveränderungen durch Sekretion eines besonderen Zytokinmusters, das auch in vitro die Proliferation von Keratinozyten steigern kann (Prinz et al., 1994). Das Zytokinmuster bei der Psoriasis beinhaltet IFN γ , TNF α und β im Zusammenspiel mit den Interleukinen IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8 und IL-19 sowie dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor (GM-CSF) (Vollmer et al., 1994; Lowes et al., 2007). In den letzten Jahren sind die Zytokine IL-17, IL-22 und IL-23 in den Fokus bei der Pathogenese der Psoriasis gerückt (Piskin et al., 2006; Nogralles et al., 2008). IL-23 gehört zu der IL-12-Zytokinfamilie und stimuliert eine neue Linie von Effektor-CD4⁺-T-Zellen (Th17-Zellen). Diese unterscheiden sich von den Th1- und Th2-Zellen durch die Produktion von IL-17 und bieten adaptive Immunität gegen spezifische Pathogene (Steinman, 2007). Für die Psoriasis wurde dargelegt, dass IFN γ myeloide antigenpräsentierende Zellen dazu anregt, IL-1 und IL-23 zu produzieren und damit die Expansion von Th17-Zellen stimuliert. Eine besondere Rolle kommt dem

proinflammatorischen $\text{TNF}\alpha$ zu, das bei der Antigenpräsentation, Makrophagenaktivierung und Leukozytenansammlung mitwirkt (Gudjonsson et Elder, 2007). So werden $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper therapeutisch erfolgreich eingesetzt. Anhand des Zytokinmusters (Produktion von $\text{IFN}\gamma$ und Abwesenheit von IL-4) lässt sich die Wirkungsweise einer Th1-Reaktion erkennen (Liu et al., 2007). Im Einklang mit einer Th1-artigen Differenzierung der psoriatischen T-Zell-Antwort können die therapeutisch verabreichten Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 die Psoriasis zur Abheilung bringen (Asadullah et al., 1998, Ghoreschi et al., 2003). Die stimulierte Epidermis produziert neben den genannten Zytokinen noch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-20 sowie $\text{TGF}\alpha$ und VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Eine Folge dessen ist die Aktivierung der dermalen Endothelzellen mit Induktion der Selektine und die durch ICAM-1 und VCAM bedingte Weitstellung der Gefäße und Neovaskularisation (Barker, 1991).

1.4 Genetik der Psoriasis

1.4.1 Genetische Prädisposition

Bereits 1963 stellte G. Lomholt unter den Einwohnern der Färöer-Inseln eine deutlich höhere Krankheitsinzidenz der Psoriasis bei erst- und zweitgradigen Verwandten betroffener Patienten gegenüber nicht verwandten Individuen fest (Lomholt, 1963). Einen weiteren deutlichen Hinweis für einen genetischen Hintergrund der Psoriasis erbrachten Zwillingsstudien. Hier zeigte sich eine bis zu 72%ige Konkordanz für die Psoriasis bei monozygoten Zwillingen im Gegensatz zu einer 15 bis 23%igen Konkordanz bei dizygoten Zwillingen (Brandrup et al., 1982; Farber et al., 1974). In Australien ergab sich ein Verhältnis von 35 % versus 12 %, was der therapeutisch wirksamen Sonneneinstrahlung zugeschrieben wird (Duffy et al., 1993). Des Weiteren stellte man fest, dass monozygote Zwillinge, sofern sie eine Konkordanz für die Schuppenflechte aufweisen, große Ähnlichkeiten bezüglich der Ausprägung der Psoriasis, des Manifestationsmusters und des Zeitpunktes der Erstmanifestation zeigen. Auch dies weist auf den Einfluss genetischer Faktoren hin. Dennoch erreicht die Konkordanz auch unter monozygoten Zwillingspaaren niemals 100 %, womit den Umwelteinflüssen bei der Krankheitsexpression große Bedeutung zugesprochen wird (Barker, 2001).

1.4.2 Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium)

Bei der Vererbung der Psoriasis ist ein wesentlich beeinflussender Faktor das Phänomen des *Linkage Disequilibrium (LD)*, auch Kopplungsungleichgewicht genannt. Dieses beschreibt die nicht zufällige Assoziation von Allelen zweier getrennter Loci infolge ihrer physikalischen Nähe und dem Fehlen von Rekombination zwischen ihnen (Jenisch et al., 1999a). Voraussetzung hierfür ist, dass ein potentielles Risikoallel von einem frühzeitig entstandenen Vorfahrenhaplotypen abstammt und über eine Vielzahl von Generationen weitergegeben wurde (*Foundereffekt*). Während der Vorfahrenhaplotyp durch Rekombination zerbrach, wurden die Markerallele, die in enger Nachbarschaft zu dem Risikoallel lagen, gemeinsam mit diesem vererbt und lassen sich daher höher frequentiert als üblich nach Crossing over unter betroffenen Patienten nachweisen. Auch im Falle der Psoriasis ist die Ursache des LD in der geringeren Rekombinationshäufigkeit im HLA-Bereich auf Chromosom 6 zu sehen, wodurch in der kaukasischen Bevölkerung relativ wenige überrepräsentierte Vorfahrenhaplotypen erhalten sind (Degli-Esposti et al., 1992). Das LD erklärt die weltweit starke Assoziation der Psoriasis zu HLA-Cw6, obwohl umstritten ist, ob HLA-Cw6 selbst das auslösende Krankheitsallel darstellt (Jenisch et al., 1999a; Elder et al., 2001).

1.4.3 Genetische Analysen

Assoziations- und Kopplungsanalysen werden als Untersuchungsmethoden von genetisch bedingten Erkrankungen herangezogen. Assoziationsanalysen beruhen auf Populationsfrequenzen und untersuchen die Korrelation zwischen einer Erkrankung und dem Allel eines Verdachtsgens. Kopplungsanalysen hingegen basieren auf der gemeinsamen Transmission von Markern und krankheitsassoziierten Genen innerhalb von Stammbäumen (Lander et Schork, 1994).

Der von Spielmann et al. 1993 entwickelte *Transmission-Disequilibrium-Test* (TDT, Transmissions-Ungleichgewichts-Test), ursprünglich basierend auf Erkrankungsfall-Eltern-Trios, vergleicht eine erwartete Anzahl von Transmissionen und Non-Transmissionen eines Markerallels von heterozygoten Eltern auf ihren erkrankten Nachkommen anhand von Populationsfrequenzen. Hiermit kann die Kopplung zwischen Marker-Locus und einem Suszeptibilitätslocus bei durch Linkage disequilibrium-bedingten Assoziationen und damit die Abweichung von erwarteten Werten untersucht werden (Spielman et al., 1993).

Die von der Arbeitsgruppe um te Meerman entwickelte *Haplotyp-Sharing-Statistic* (HSS)-Methode erfasst gleiche Haplotypen. Hierbei wird die Anzahl von gemeinsamen Markerintervallen um jeden einzelnen Marker von Haplotypen einer Patientengruppe im Vergleich zu Haplotypen einer Kontrollgruppe gemessen (te Meerman et al., 1995; van der Meulen et al., 1997; Beckmann et al., 2001). Als Indiz für einen Krankheitslocus wird ein Überschuss gemeinsamer Haplotypen bei der Patientengruppe gewertet. Dieses Verfahren erfasst die absolute Länge des gemeinsamen Genabschnitts von Patientenhaplotypen. Die Länge stellt hierbei ein Maß für die Wahrscheinlichkeit dar, dass verschiedene Haplotypen *identical by descent (IBD)*, also identisch aufgrund ihrer Abstammung sind. Die HSS-Methode wird insbesondere dem Linkage disequilibrium gerecht, da sie sich auf Haplotypen und nicht auf Einzelloci fokussiert. Zudem ergänzt und verstärkt sie die Aussage des TDT, da sie einen anderen Parameter untersucht (Nolte et te Meerman, 2002) und eine hohe Auflösung der Feinkartierung zeigt (Beckmann et al., 2001; Nolte et te Meerman, 2002).

1.4.4 Humaner Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC/HLA)

Im menschlichen Organismus ist die Präsentation von Antigenen bzw. Antigenfragmenten eine Voraussetzung für die Immunantwort. Dabei erfolgt die Präsentation von intrazellulären oder internalisierten Proteinen mit spezifischen Membranproteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex, MHC*) auf der Zelloberfläche. Die MHC-Region umfasst ca. 4 Megabasen (4 Millionen Basenpaare) auf dem Chromosom 6p21.31 und besteht aus 224 Gen-Loci, von denen 128 als „Exprimierte“, zumeist hochpolymorphe Gene identifiziert wurden (MHC-Sequencing consortium, 1999). Zu diesen zählt ein komplexes, autosomal-kodominant vererbtes System von Gewebeantigenen, den HLA (humane Leukozytenantigen)-Molekülen. Sie kommen in den Klassen I, II und III vor und differieren in Aufbau und Funktion. Die telomerisch gelegenen Klasse I-Moleküle HLA-A, -B, und -C finden sich auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten. Die HLA-Klasse I-Moleküle präsentieren gegenüber den zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen intrazellulär synthetisierte Proteine. Die zentromerisch gelegenen Klasse II-Moleküle HLA-DR, -DQ und -DP werden auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und präsentieren gegenüber den CD4⁺-T-Zellen extrazelluläre, durch Endozytose aufgenommene und lysosomal fragmentierte Antigene. Die mittig gelegenen HLA-Klasse III-Moleküle kodieren für diverse Komplementfaktoren und

Tumornekrosefaktoren (Trowsdale et al., 1991; Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 3. Auflage, 1999).

1.4.5 Psoriasis-Kandidatengene

Genetische Epidemiologie-Studien verweisen seit mehreren Jahrzehnten auf den genetischen Hintergrund der Psoriasis, schließen jedoch den einfachen Mendelschen Erbgang aus (Elder et al., 1994; 2001; Capon et al., 2002). Es wird vermutet, dass Veränderungen in mehreren Genen, die aufeinander einwirken - „Epistasie“ - in Kombination mit Umwelteinflüssen für die Manifestation der Psoriasis verantwortlich sind (Barker et al., 2001). Einige der involvierten Gene scheinen den Schweregrad durch Regulierung der Entzündung und Immunität zu kontrollieren, bei anderen vermutet man einen krankheitsauslösenden Effekt für die Psoriasis (Elder et al., 2001). Ein schwerwiegendes Hindernis auf der Suche nach der für die Psoriasis verantwortlichen Mutation(en) besteht darin, dass die MHC-Region äußerst variationsreich und von stark ausgedehnten (*extended*) Haplotypen gekennzeichnet ist. Im Zusammenspiel mit der niedrigen Rekombinationsrate im Vergleich zu der genomweiten Rate (Walsh et al., 2003) führt dies zu dem oben beschriebenen hohen Grad an linkage disequilibrium innerhalb des HLA-Bereiches, was zu positiven Assoziationen von genomischen Sequenzen selbst bei einer Entfernung von einer 1 MB führt. Somit ist unklar, ob positive Assoziationen auf eine direkte Beteiligung vorgeschlagener Verdachtsloci schließen lassen oder auf das LD zurückzuführen sind.

1.4.6 Psoriasis-Suszeptibilitäts-Locus 1 (PSORS1)

Der einzige Locus, dem erstmalig vor 35 Jahren und seitdem konstant eine genetische Assoziation vornehmlich mit der Typ 1-Psoriasis nachgesagt wird, ist der HLA-Klasse I-Locus auf Chromosom 6. Dieser wird als Psoriasis-Suszeptibilitäts-Locus 1 (PSORS1) bezeichnet (Russel et al., 1972; Brenner et al., 1978; Morhenn et al., 1979; Henseler T et al., 1985; Trembath et al., 1997; Nair et al., 1997; Burden et al., 1998; Lowes et al., 2007). PSORS 1 befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.3) und ist Teil eines zwei Megabasen langen Vorfahrenhaplotypen EH 57.1 (*extended haplotype*) (Schmitt-Egenolf et al., 1993; Jenisch et al., 1998). Der Haplotyp EH 57.1 wird als genetisch konservierter Satz vererbt und beinhaltet folgende Allele: Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303. In der Literatur tauchen neben HLA-Cw6 diverse Kandidatengene des Locus 6p21.3 auf: MICA (*major histocompatibility complex class*

I chain-related gene A) (Burden, 2000), Corneodesmosin (CDSN) (Jenisch et al., 1999b; Allen et al., 2001; Schmitt-Egenolf et al., 2001; Capon et al., 2003; Orru et al., 2002; Chang et al., 2006), POU5F1 (*POU class 5 homeobox 1*, auch bekannt als *octomer-binding transcription factor-3*, OTF3) (Gonzalez et al., 2000), HCR (*a-helix coiled-coil rod homolog*, auch bekannt als *putative gene 8 protein*, Pg8) (Asumalahti et al., 2002; Elomaa et al., 2004), TCF19 (Transkriptionsfaktor 19) (Oka et al., 1999), PSORS1C2 (*psoriasis susceptibility 1 candidate 2*, auch bekannt als SPR1) und PSORS1C1 (auch bekannt als SEEK1) (Holm et al., 2003) und PSORS1C3 (Chang et al., 2006). Jedes der Allele zeigt Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP), die potentiell mit der Psoriasis assoziiert sein können.

Träger des Haplotypen EH 57.1 haben ein 26-fach erhöhtes Risiko, an einer Typ 1-Psoriasis zu erkranken. Dabei sind die HLA-Klasse I-Moleküle Cw6 und B57 mit einem signifikant höheren relativen Risiko für die Entwicklung einer Typ 1-Psoriasis gegenüber denen der Klasse II assoziiert (Schmitt-Egenolf et al., 1996; Tiilikainen et al., 1980; Henseler T et al., 1985; Enerbäck et al., 1997b; Jenisch et al., 1998; Mallon et al., 1999). Viele unabhängige Arbeitsgruppen verifizierten die Assoziation von HLA-Cw6 in Fall-Kontroll-Assoziationsstudien (Enerbäck et al., 1997a; Mallon et al., 1997; Tiilikainen A et al., 1980) und Kopplungsanalysen (Burden et al., 1998, Trembath et al., 1997; Nair et al., 1997). Homozygotie für HLA-Cw6 geht mit einem zweieinhalbfach erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Psoriasis gegenüber Cw6-Heterozygoten einher (Gudjonsson et al., 2003). Nichtsdestotrotz sind nicht alle Psoriasis-Patienten Träger des HLA-Cw6-Haplotypen, und in verschiedenen Studien konnte die positive Assoziation mit HLA-Cw6 nicht bestätigt werden (Allen et al., 2005; Ameen et al., 2005; Schmitt-Egenolf et al., 2001). Daher wurde wiederholt vermutet, dass HLA-Cw6 selbst nicht das Suszeptibilitätsgen darstellt (Jenisch et al., 1999b; Leder et al., 1998; Elder et al., 2001). Diverse Arbeitsgruppen sehen die Lokalisation von PSORS1 auf dem gleichen Chromosom (Elder et al., 2001) telomerisch von HLA-Cw6 (Oka et al., 1999; Nair et al., 2000; Teraoka et al., 2000; Martínez-Borra et al., 2003; 2005; Foerster et al., 2005).

1.4.6.1 Die RH1/RH2-Zielregion für PSORS1 (Nair et al., 2000)

Um das Zielintervall für PSORS1 weiter einzugrenzen, führten Nair et al. einen 339 Familien umfassenden Typ 1-Psoriasis-Haplotypen-Pool auf rekonstruierte Ursprungshaplotypen zurück, die nach maximaler Ähnlichkeit in Clustern gruppiert und

mittels des Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT) analysiert wurden. 62 Mikrosatellitenmarker kartierten räumlich den MHC-Komplex auf Chromosom 6 besonders engmaschig um die HLA-Klasse I (siehe Abbildung 1.1). Dabei wurden sechs Hauptcluster identifiziert, die mit der Psoriasis assoziiert waren. Diese sechs Haplotypen-Cluster ähnelten sich in einer etwa 60-kb-langen Region, die Risikohaplotyp 1 (RH1) genannt wurde (Abbildung 1.1). Sie reicht von 29 kb bis 90 kb telomerisch des HLA-C-Gens und schließt HLA-C selbst nicht mit ein (Nair et al., 2000). Die Spitzen des LD sind hier am größten und stimmen mit zuvor publizierten Studien überein (Oka et al., 1999; Balendran et al., 1999). Fünf von sechs Clustern glichen sich über rund 130 kb und stellen den Risikohaplotypen 2 (RH2) dar. Dieser schließt sich nach einem 2-kb-Zwischenintervall telomerisch an RH1 an (siehe Abbildung 1.1). In späteren Arbeiten wird deutlich, dass die RH1/RH2-Region auf der Grundlage der vorhandenen Daten nicht eindeutig voneinander getrennt werden kann (Nair et al., 2006). Die rund 190-kb-umfassende RH1/2-Zielregion konnte letztlich auch durch eine SNP-basierte Untersuchung bestätigt werden (Nair et al., 2009). Sie stellt ein Fragment des Vorfahrenhaplotypen EH 57.1 dar und codiert für die 3 Pseudogene (Transkriptionseinheiten) HCGII-2, HCGIX-3 und NOB4 sowie für die Gene Corneodesmosin (CDSN) (Jenisch et al., 1999b; Schmitt-Egenolf et al., 2001; Orru et al., 2005), HCR (Pg8) (Asumalahti et al., 2000), POU5F1 (OTF3) (Gonzalez et al., 2000), TCF19 (Oka et al., 1999), SPR1 (PSORS1C2), SEEK1 (PSORS1C1) (Holm et al., 2003), PSORS1C3 (Chang et al., 2006) und STG (Sánchez et al., 2004), die sich innerhalb des RH2-Intervalls befinden. All diese Gene spielen eine putative Rolle in der Pathogenese der Psoriasis und wurden mit Ausnahme von STG als Kandidatengene postuliert. Keines dieser Gene bestimmt das Auftreten der Psoriasis in einem solch starken Maß wie das Vorhandensein von RH1 (Nair et al., 2000; 2006), allerdings sind bis zum heutigen Zeitpunkt keine Gene in diesem Bereich beschrieben worden. HLA-C und Corneodesmosin wurden primär durch die Ergebnisse von Nair (Nair et al., 2000) mit einer gewissen Sicherheit ausgeschlossen, HLA-C jedoch durch spätere Untersuchungen wieder in den Fokus der Aufmerksamkeit gestellt (Nair et al., 2006). Aktuelle Publikationen bestätigen zwar die Lokalisation der Zielmutation um HLA-C, beweisen jedoch nicht, dass HLA-C selbst die PSORS1-Mutation darstellt (Nair et al., 2009). Die Diskussion über die genaue Lokalisation von PSORS1 ist noch immer kontrovers.

1.4.7 Andere Psoriasis-Suszeptibilitäts-Loci

Die Penetranz von PSORS1 wird auf 10 bis 15 % geschätzt. Dies deutet darauf hin, dass mehr als ein Krankheitsallel und die hinzukommenden Umweltfaktoren an der Manifestation der Psoriasis beteiligt sein müssen (Nair et al., 2000; Elder et al., 2001; Bowcock et Krueger, 2005). In der Vergangenheit wurden neben PSORS1 mindestens 18 weitere Psoriasis-Suszeptibilitäts-Loci vorgeschlagen. Nur einige von ihnen wurden in unterschiedlichen Populationsstudien repliziert, und nur bei einzelnen konnten die Gene innerhalb der Verdachtsbereiche identifiziert werden (Bowcock et Krueger, 2005). Zu den wichtigsten gehören PSORS2 auf Chromosom 17q (Tomfohrde et al., 1994), PSORS3 auf Chromosom 4q (Matthews et al., 1996), PSORS4 auf Chromosom 1q (Capon et al., 1999), PSORS5 auf Chromosom 3q21 (Enlund et al., 1999) und PSORS6 auf Chromosom 19p13 (Lee et al., 2000).

1.4.8 Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zur Identifizierung von Psoriasis-Risikopolymorphismen

In der jüngeren Vergangenheit wird seitens einiger Arbeitsgruppen die These aufgestellt, dass Assoziationsstudien für multifaktorielle Erkrankungen, bei denen einzelne Gene typischerweise in einem geringeren Umfang zum individuellen Risiko beitragen, aussagekräftiger seien als Kopplungsanalysen. Letztere wären geeigneter für die Suche von Genen, die maßgeblich zu einer Erkrankung führen (Botstein et Risch, 2003). So unternahmen diverse Arbeitsgruppen genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zur Identifizierung von genetisch prädisponierenden Faktoren für die Psoriasis. Die Psoriasis ist durch gewebsspezifische Immunzellen gekennzeichnet, die auf ein signifikant alteriertes Profil von kutaner Zytokinexpression anspricht (Boyman et al., 2007; Lowes et al., 2007). So wurde mehrfach die positive Assoziation von Genpolymorphismen des Interleukin-12B-Gens (IL-12B), des Interleukin-23-Rezeptors (IL23R) (Tsunemi et al., 2002; Capon et al., 2007; Cargill et al., 2007; Chang et al., 2007a; Nair et al., 2008; 2009) und von IL-23A (Nair et al., 2009) mit der Psoriasis vulgaris dargelegt. IL-12 induziert zusammen mit IL-2 und TNF α die IFN γ -Produktion. Bei einer Modifikation des IL-23R, die zu einer geringeren Rezeptorfunktion führt, ist zu erwarten, dass die Entwicklung der T-Zellen in Richtung Th1-Antwort gelenkt wird, die in psoriatischen Läsionen deutlich erhöht ist (Liu et al., 2007). Darüber hinaus regt IL-23 die Gedächtnis-T-Zellen zu einer IFN γ -Produktion an und wird in Keratinozyten und antigenpräsentierenden Zellen läsionaler psoriatischer Haut im Vergleich zu gesunder

sowie nicht-läsionaler psoriatischer Haut verstärkt exprimiert. Dies weist darauf hin, dass IL-23 an der Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses bei der Psoriasis beteiligt ist (Piskin et al., 2006). In einer kürzlich veröffentlichten genomweiten Assoziationsstudie wurden darüber hinaus Polymorphismen von zwei bei $TNF\alpha$ gelegenen, den NF- κ B-Signalweg regulierenden Loci sowie von zwei weiteren, interessanter Weise bei der Modulation der Th2-Antwort (IL-4, IL13) involvierten Genpolymorphismen identifiziert (Nair et al., 2009). HLA-Cw6 selbst zeigte dabei die stärkste Assoziation mit der Psoriasis, wobei wiederum nicht alle beobachteten Assoziationssignale HLA-Cw6 zugeschrieben werden konnten, was für ein weiteres, anderes Risikogen spricht (Nair et al., 2009).

Die hier dargebotene Arbeit wird ausschließlich auf den MHC-gebundenen Suzeptibilitätslocus PSORS1 eingehen.

1.5 Retroviren

Die in den Fokus gestellte RH1/RH2-Region ist reich an repetitiven Sequenzen, die auch Fragmente endogener Retroviren einschließen. Die Expression eines solchen Sequenzelements wird in vorliegender Arbeit als möglicher Kandidatenlocus für die sogenannte PSORS1-Mutation untersucht.

1.5.1 Klassifikation der Retroviren

Retroviren sind nach ihrem Enzym reverse Transkriptase benannt, das die virale RNA in komplementäre doppelstängige DNA umschreibt. Sie werden heutzutage gemäß ihrer Morphologie, Genomsequenz, antigenen Eigenschaften, Wirtsspezifität und Pathogenese in sieben verschiedene Genera eingeteilt: Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilonretroviren und Lentiviren sowie Spumaviren („Fields Virology“, Kapitel 55, 5. Auflage, 2007). Des Weiteren wird eine Typisierung hinsichtlich endo- und exogener Retroviren vorgenommen. Die als exogen Bezeichneten werden durch Infektion weitergegeben. Gelangt ein Virus in die Keimbahn, und wird die virale DNA in das Genom der Keimzelle integriert, so bezeichnet man das entstandene Virus als Provirus. Dieses ist nun endogener Bestandteil des Wirtsgenoms und wird wie ein stabiles Gen vertikal weitervererbt (Nelson et al., 2003). Für die integrierten Proviren verwendet man den Terminus endogener Retrovirus (ERV) oder endogene retrovirale Sequenz.

1.5.2 Aufbau und Genomstruktur der Retroviren

Retroviren besitzen ein einzelsträngiges Positivstrang-RNA-Genom. Anhand des Genoms sowie der Anzahl der Genprodukte unterscheidet man einfache und komplexe Retroviren (Coffin, 1992, „Strukture and classification of retroviruses“). Einfache Retroviren kodieren in 5' – 3' Richtung für wenigstens drei Gene: *gag* (*group specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*). Diese Gene sind von zwei LTRs (*long terminal repeats*) am 5'- und 3'-Ende begrenzt. Die LTRs sind für die Integration der Retroviren essentiell, da sie alle Signalstrukturen (z. B. Promotoren) für die RNA-Expression und Proteinexpression von Gag, Pol und Env enthalten. Der Gag-Leserahmen enthält die Information für das gruppenspezifische Antigen und kodiert für das Gag-Pol-Vorläuferprotein. Aus ihm entstehen durch proteolytische Spaltung das Matrix-(MA), Capsid-(CA) und das Nucleokapsidprotein (NC), die für den Aufbau des Viruscapsids verantwortlich sind. Der Pol-Abschnitt kodiert unter anderem für die reverse Transkriptase (Temin et Mizutani, 1970). Der Env-Leserahmen kodiert für virale Glykoproteine, die in die Virushülle eingelagert und für die Anheftung des Retrovirus an Zellen und dessen Infektiosität verantwortlich sind. Zwischen der *gag*- und *pol*-Region liegt der Leserahmen für die *Protease*, der häufig mit den Sequenzen für das NC-Protein überlappt. Je nach Retrovirus wird dieses Protein als Teil des Gag- oder Pol-Leserahmens oder in einem separaten Leserahmen exprimiert. Es ist für die proteolytischen Spaltungen während eines retroviralen Lebenszyklus verantwortlich und katalysiert somit die Prozessierung der Gag-, Pol- und Env-Vorläuferproteine (Oroszlan et Luftig, 1990). Die Synthese solcher Polyproteine erlaubt es den Retroviren, eine Vielzahl von Genprodukten unter Verwendung einer mRNA zu synthetisieren. Bei komplexen Retroviren findet man eine Vielzahl kleiner offener Leserahmen für Proteine mit regulatorischen Funktionen oder andere akzessorische Genprodukte. Diese entstehen durch unterschiedliches Spleißen der Pro-mRNA (Löwer et al., 1995). In superinfizierten Zellen oder in Kombination mit Genprodukten endogener Elemente können sich auch neue rekombinante Viruspartikel aus den Genprodukten verschiedener Viren komplementieren (Tönjes et al., 1999).

1.5.3 Endogene Retroviren

ERV weisen die gleiche fundamentale Struktur wie Retroviren auf, wobei die Gene *gag*, *pol* und *env* häufig durch Terminationssignale oder Deletionen unterbrochen sind. Sie sind zuweilen inaktiv, jedoch fähig, wieder aktiviert zu werden. Einige Familien erhöhen

ihre provirale Kopienzahl um ein Vielfaches durch die sogenannte *retrovirus-like Retrotransposition*. Dieser Prozess beschreibt die Bildung neuer Proviren durch reverse Transkription retroviraler RNA und erneute Integration innerhalb einer Zelle (Leib-Mösch et al., 1993). Die Aktivierung von ERVs kann indirekt durch Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase oder durch Messung der Expression retroviraler RNA bzw. Proteine nachgewiesen werden (Löwer et al., 1993; Medstrand et al., 1992).

1.5.4 Humane endogene Retroviren (HERVs)

Das humane Genom besteht zu etwa 8 % aus Sequenzen retroviraler Abstammung (Lander et al., 2001). Es wird vermutet, dass diese sogenannten humanen endogenen Retroviren durch Infektionen der Keimbahnzellen von Primatenvorfahren mit exogenen Retroviren entstanden sind, und Retroviren somit in das Genom aller Zellen der Primaten integriert wurden (Mayer et Meese, 2005; de Parseval et Heidmann, 2005). Der Endogenisierungsprozess der HERVs wird auf eine Zeit vor etwa 30 bis 45 Millionen Jahren datiert (Sverdlov, 2000). Als Teil des humanen Genoms wurden sie zusammen mit den Wirtsgenen repliziert und weitervererbt. Diese Hypothese wurde im Mama-Karzinom-Virus der Maus und im Jaagsiekte-Schafs-Virus belegt. Hier fanden sich sowohl exogene als auch endogene Vertreter der Viren (Moore et al., 1987; York et al., 1992). Die meisten der HERV-Proviren waren ausgedehnten Deletionen und Mutationen ausgesetzt. Einige behielten jedoch offene Leseraster (open reading frame, ORF) für die viralen Strukturproteine zurück (Mayer, et al., 1999; Griffiths, 2001; Turner et al., 2001). So können sie transkriptionell aktiv sein, Proteine exprimieren und möglicherweise Erkrankungen verursachen (Balada et al., 2009; Moyes et al., 2007).

1.5.5 HERV-K/HML-2.HOM

Die HERV-K-Familie gehört der Klasse II der humanen endogenen Retroviren an, die große Ähnlichkeit mit den B- oder Beta-Retroviren zeigt (Wilkinson et al., 1994). Aufgrund ihrer Homologie zum *mouse mammary tumor virus* werden einige als *human MMTV-like (HML)* bezeichnet (Medstrand et Blomberg, 1993; Andersson et al., 1999). Zu dieser Familie gehört die im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierte retrovirale Sequenz im PSORS1-Locus. Die HERV-K-Familie ist humanspezifisch (Mayer et al., 1999; Barbulescu et al., 1999), was auf ihre Integration in das humane Genom nach der Differenzierung von Mensch und Schimpanse vor etwa 30 Millionen

Jahren hindeutet (Takahata et Satta, 1997). Sie zählt zu den biologisch aktivsten Gruppierungen der humanen endogenen Retroviren und besitzt offene Leserahmen für die viralen Proteine Gag, Protease, Polymerase und Envelope. Diese werden wie bei exogenen Retroviren zunächst als Polyproteine translatiert und später in die einzelnen Komponenten gespalten (Tönjes et al., 1996; Löwer et al., 1996). Der erste Nachweis für einen fast intakten HERV-K-Provirus beim Menschen gelang mit der Entdeckung der HERV-K/HML-2.HOM-genannten Sequenz mit offenen Leserahmen für alle proviralen Gene auf Chromosom 7p22 (Mayer et al., 1999; Barbulescu et al., 1999; Tönjes et al., 1999). Lediglich eine für die Aktivität der reversen Transkriptase essentielle Aminosäuresequenz weist Mutationen auf, weshalb das Enzym vermutlich keine Aktivität besitzt. In einem Teil der menschlichen Bevölkerung konnte ein komplett intaktes HERV-K-Provirus (HERV-K113) mit einem intakten Polymerase-Motiv identifiziert werden (Reus et al., 2001; Turner et al., 2001). Diese Daten weisen auf potentielle Einzelstrangpolymorphismen hin. Diverse humane polymorphe HERV-K-Loci suggerieren eine replikationskompetente Aktivität der HERV-K in der heutigen Population (Moyes et al., 2007; Belshaw et al., 2005). Die HERV-K-Familie kodiert auch für eine in der vorliegenden Arbeit relevante dUTPase (Desoxyuridintriphosphat-Pyrophosphatase)-Domäne innerhalb des Proteasen-ORF (Harris, 2000; Mayer und Meese, 2003). Ihre enzymatische Kapazität schützt die Zellen vor der toxischen Fehlinkorporation von dUTP in die cDNA und ist für das Überleben der Zellen wichtig.

1.5.5.1 Expression der HERV-K in humanem Gewebe

HERV-Partikel wurden erstmals in Teratokarzinomzelllinien nachgewiesen und in Anlehnung daran HTDV-Partikel (*human teratocarcinoma derived virus*) genannt (Löwer et al., 1984). Später wurde dargelegt, dass diese HTDV-Partikel von HERV-K (HML-2) kodiert werden (Boller et al., 1993). Heutzutage geht man davon aus, dass nahezu alle humanen Gewebe HERV-Transkripte aufweisen (Flockerzi et al., 2008). Insbesondere in Brustkrebs- und Keimzelltumorgeweben findet man komplexe Expressionsmuster von HERV-K-Transkripten (Löwer et al., 1993; Sauter et al., 1995; Wang-Johanning et al., 2001). Gleiches wurde jedoch auch für multiple andere Tumore nachgewiesen (Büscher et al., 2005; Wang-Johanning et al., 2007).

1.5.6 Biologische Relevanz der HERVs für den Wirtsorganismus

HERVs neigen gemäß ihrer unigen Struktur zu vielen Amplifikations- und Transpositionereignissen, die zu einer weitreichenden Verteilung von kompletten oder inkompletten retroviralen Sequenzen über das gesamte Genom führen (Retrotransposition). Dabei tendieren sie insbesondere dazu, sich in transkriptionsaktive Regionen unseres Chromosoms zu integrieren. De novo Insertionen bergen in zweifacher Hinsicht ein potentiell Risiko zur Karzinogenese. Die Integration viraler Sequenzen kann sowohl die Aktivierung von Proto-Onkogenen als auch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Folge haben (Löwer, 1999). Zum anderen können einige HERVs selbst virale Onkogene exprimieren. So konnte der Beweis für die Assoziation zwischen der Entstehung von Keimzelltumoren und der Expression des *rec*-Gens (*regulator of expression encoded by corf*) von HERV-K/HML-2.HOM erbracht werden. Transgene *rec*-exprimierende Mäuse entwickelten im Gegensatz zu *rec*-negativen Kontrollmäusen Carcinoma in situ (Galli et al. 2005). HERVs sind in der Lage, die Transkription der proviralen Gene, jedoch auch benachbarter zellulärer Gene zu initiieren (Flockerzi et al., 2008). Dabei können Splice-Signale innerhalb der HERVs zu unterschiedlichen Transkripten zellulärer Gene führen (Leib-Mösch et al., 2005). HERVs können humane Gene umgestalten oder nahe gelegene humane Gene, z. B. durch Expression von transkriptionsregulierenden Elementen wie Promotoren, Verstärkern, hormonsensitiven Elementen, HERV-untranslatierten Regionen (UTRs) und Polyadenylierungssignalen regulieren. Dies kann zu einem Funktionsverlust des betroffenen Gens führen (Kidwell et Lisch, 2001; Mager et al., 1999; Baust et al., 2001). Eine zentrale Bedeutung kommt dabei den solitären LTRs zu, die Träger von regulatorischen Elementen sein können und in sehr hoher Kopienzahl im Genom vertreten sind (Kidwell et Lisch, 2001; Medstrand et al., 2001). Endogene Retroviren können jedoch auch einen Funktionsgewinn für das Wirtsgenom darstellen. Es ist denkbar, dass die Expression endogener retroviraler Proteine einen Schutz des Organismus vor einer Infektion mit nahe verwandten exogenen Retroviren darstellt (Löwer et al., 1996). So können sie in der Plazenta Rezeptoren beeinflussen und somit Schutz vor Infektionen durch exogene Retroviren bewirken oder auch lokale Immunsuppression als Toleranz gegenüber dem Fetus gewähren (Blond et al., 2000).

1.6 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

1.6.1 Reanalyse der PSORS1-Lokalisation von Nair et al., 2000

Unter Anwendung der Haplotyp-Sharing-Statistic (HSS)-Methode wurden die von Nair et al. 2000 publizierten Daten zur Lokalisation von PSORS1 anhand einer neu rekrutierten Patienten- und einer Kontrollgruppe reanalysiert. Das Ergebnis bestätigte die Lokalisation von PSORS1 innerhalb der RH1/RH2-Risikoregion und grenzte die Zielregion auf einen Bereich um den Mikrosatellitenmarker M6S168 zwischen den Markern M6S105 und M6S178 ein. M6S168 befindet sich gut 30 kb telomerisch von HLA-C auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6.

1.6.2 BLAST-Analyse der PSORS1-Zielregion

Eine sogenannte BLAST (basic local alignment search tool)-Analyse dieser Region mithilfe des pairwise-BLAST-Programms deckte die Konservierung residualer Fragmente eines endogenen Retrovirus auf. Diese retroviralen Fragmente zeigen eine signifikante Homologie zu dem Tandem-Repeat-Virus HML-2.Hom auf dem Chromosom 7, welcher der HERV-K-Familie angehört. Dieser wurde auch unter HERV-K108 und HERV-K(C7) publiziert (Barbulescu et al., 1999; Tönjes et al., 1999). Der HERV-K/HML-2.HOM (Reus et al., 2001) weist eine Tandem-Struktur auf.

1.6.3 Proteinalignment und Identifizierung einer retroviralen dUTPase

Auf genomischer Ebene lässt sich der Marker M6S168 innerhalb eines 4,3-kb-Intervalls zwischen nt20996 und nt25254 bei nt21082 auf dem Klon AC006048 lokalisieren. In dieser Region befinden sich zwei einander überlappende offene Leseraster (open reading frame, ORF): ORF 22576 (182 Aminosäuren) und ORF 23048 (208 Aminosäuren), die nach ihrer Position innerhalb des Klons AC006048 benannt wurden (Abbildung 1.3). In dem sich anschließenden 3'-untranslatierten Bereich des ORF 23048 existiert ein weiteres offenes Leseraster namens ORF 24019 (140 Aminosäuren).

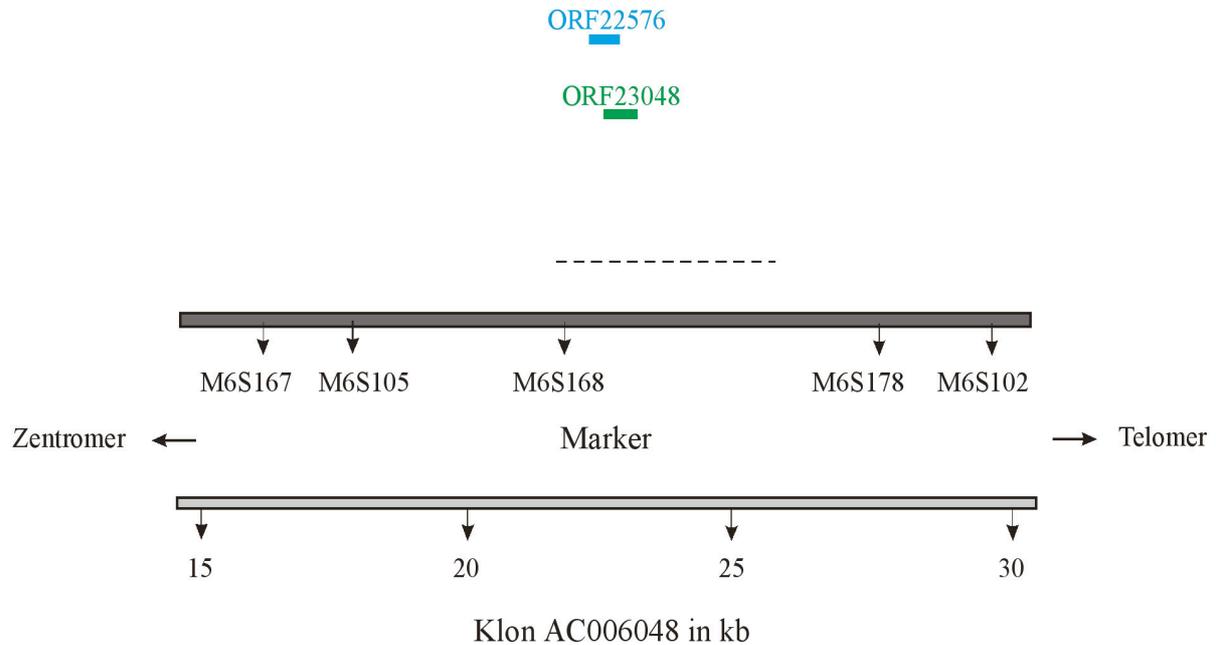


Abbildung 1.1: Sequenzmerkmale der putativen PSORS1-Zielregion

Die Abbildung illustriert die Lage der PSORS1-Zielregion zwischen den Markern M6S167 bis M6S102 in Bezug zu dem Klon AC006048. Dargestellt sind die putativen ORFs in der Zielregion. Entlang der gestrichelten Linie findet man eine repeat-Region hoher Homologien zu einer Vielzahl genomischer Sequenzen. Dies führt zu einer Maskierung dieser Region mittels des RepeatMasker Programms, welches genomweit häufig vorkommende repeat-Regionen bei Sequenzanalysen ausblendet.

Die Homologien der gefundenen retroviralen Sequenz auf dem Klon AC006048 zu HML-2.HOM auf Chromosom 7 positionieren den ORF 22576 innerhalb des N-terminalen HERV-K-*gag*-Gens und den ORF 23048 innerhalb des C-terminalen *pro* (*Protease*)-Gens des HERV-K-Genoms (Abbildung 1.4). Im intakten Retrovirus unterliegt dieses Fragment proteolytischen Spaltungen, wobei der N-terminale Anteil des *pro*-Gens eine dUTPase ausbildet. Kurze Fragmente des *pol*- und *env*-Gens sind ebenfalls erhalten. HERV-K-LTR-Segmente sind gänzlich von der PSORS1-Region verschwunden (Abbildung 1.4).



Abbildung 1.2: Retrovirale Elemente telomerisch von HLA-C als Residuen eines HERV-K-Retrovirus. Dargestellt ist das schematische Alignment der PSORS1-Region auf dem Klon AC006048 (Chromosom 6) mit der überaus ähnlichen HERV-Sequenz auf Chromosom 7 (HML-2.HOM, GenBank acc. nr. AF074086) in Bezug zu den ORFs 23048 und 22576. Das Alignment erfolgte mithilfe des pairwise-BLAST-Programms.

1.6.4 Identifizierung Psoriasis-assoziiierter Sequenzvariationen

Zur näheren Untersuchung des 4,3-kb-langen Zielintervall zwischen der 21. und 25. kb auf dem Klon AC006048, innerhalb dessen sich die ORFs 23048 und 22576 befinden, galt es, Psoriasis-assoziierte Sequenzvariationen zu detektieren. Dazu wurden ein Patientenpool („*high risk*“, (HR)-Pool) und ein vergleichbarer Kontrollpool („*low risk*“, (LR)-Pool) zusammengestellt. Dabei bestand die Patientengruppe aus Individuen, die homozygote Träger des Hochrisikohaplotypen an den Markern M6S105, M6S168 und M6S178 waren. Der LR-Pool umfasste hingegen Individuen, die homozygot für einen „nicht-mit-Psoriasis-assoziierten Haplotypen“ waren. Erwähnenswert ist, dass die beiden Haplotypenpools nur an dem Marker M6S168 differierten. Die gepoolte DNA der Patientengruppe zum einen und der Kontrollgruppe zum anderen wurde mit zehn konstruierten spezifischen Primerpaaren, deren überlappende PCR-Produkte die 4,3-kb-Zielregion umspannten, amplifiziert. (Die Primer wurden nach der beginnenden Base benannt, wobei nt17430 am 5'-Ende des Klons AC006048 als Nullpunkt in der Namensgebung festgelegt wurde.) Anschließend wurden die sequenzierten PCR-Produkte auf Sequenzvariationen hin verglichen. Dabei wurden 17 Nukleotidvariationen (SNP, single nucleotide polymorphism) innerhalb der 4,3-kb-Zielregion identifiziert, von denen sich vier innerhalb des ORF23048 befinden. Die Sequenzierung eines 400-bp-

Fragmentes, diese vier Variationen beinhaltend, in einer größeren Patientenkohorte offenbarte, dass nur zwei der vier Basenpaarvariationen zwischen dem HR- und LR-Haplotypenpool mit einem vorhersagbaren Aminosäureaustausch korrelieren. Ein zusätzlicher SNP befindet sich in der potentiellen 3'-untranslatierten Region des ORF 23048. Die SNPs wurden nach ihrer Position innerhalb des 400-bp-Fragmentes als SNP143, SNP200 und SNP315 bezeichnet. Alle Individuen des HR-Pools waren homozygot für den Psoriasis-assoziierten Haplotypen C-A-G an den SNPs 143/200/315, wohingegen alle Probanden des LR-Pools homozygot für den gegensätzlichen Haplotypen waren. Der ORF 23048 beginnt gemäß der Sequenz des Referenzklons AC006048 mit einem Startcodon bei nt23048 (= 5618 gemäß der Namensgebung der Primer) und endet bei nt23674 (= 6244). Dies entspricht einer Basenpaarlänge von 626 Basen und einer putativ translatierten Aminosäure-Abfolge von 208 Aminosäuren. Gemäß der Aminosäuresequenz des ORF 23048 lokalisiert sich die HERV-K-dUTPase im Bereich der etwa 80. bis 185. putativ translatierten Aminosäure. Die HERV-K-dUTPase der vorliegenden Arbeit enthält die fünf evolutionär konservierten Motive (Harris et al., 1997), von denen das C-terminale Motiv am wenigsten erhalten ist. Die Aminosäuresequenz-Homologie zwischen dem ORF 23048 und der HERV-K-dUTPase bricht nach Y182 vor dem Motiv 5 aufgrund einer Leserasterverschiebung ab. Auf dem Nukleotidlevel reicht die Homologie hingegen bis nt24274. Die vorhergesagten Aminosäure-Variationen zwischen dem HR- und LR-Haplotypenpool (in Abbildung 1.5 rot hervorgehoben) folgen direkt auf den Abbruch der Sequenzhomologie. Die Primärsequenz betrachtend lässt sich nicht vorhersagen, ob eine oder beide der PSORS1-dUTPase-Varianten enzymatisch aktiv sein könnten.

1.6.5 Die dUTPase (Desoxyuridintriphosphat-Pyrophosphatase)

In der Mehrheit der biologischen Systeme ist Uracil kein natürlicher Bestandteil der DNA. Es kann jedoch in Form von dUTP (Desoxyuridintriphosphat) in die DNA eingebaut werden, da die DNA-Polymerase nicht zwischen dUTP und ihrem natürlichen Substrat dTTP (Desoxythymidintriphosphat) differenzieren kann. dUTP ist eine intermediäre Verbindung in der dTTP-Biosynthese und entsteht in allen sich teilenden Zellen aus UDP via Ribonukleotidreduktase und Nukleosiddiphosphatkinase. Steht dUTP in großen Mengen zur Verfügung, wird die Synthese von Uracil-substituierter DNA begünstigt (Warner et Duncan, 1978). Das Enzym dUTPase (Desoxyuridintriphosphat-Pyrophosphatase; EC 3.6.1.23) spaltet im intakten Zustand

ihr spezifisches Substrat dUTP zu dUMP (Desoxyuridinmonophosphat) und anorganischem Diphosphat. Die dUTPase verhindert so die Inkorporation von dUTP in die DNA, welche Strangbrüche und Apoptose zur Folge hätte (Tye et Lehman, 1977; Grafstrom et al., 1978; Caradonna et Muller-Weeks, 2001).

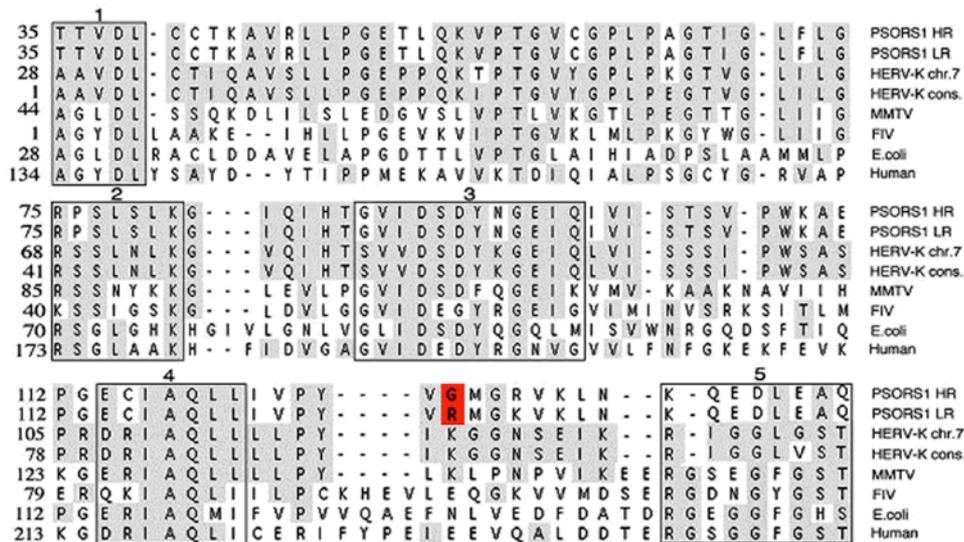


Abbildung 1.3: Sequenz-Alignment der vorhergesagten Aminosäure-Sequenz des ORF23048 in der PSORS1-Region sowohl für den HR-Pool als auch für den LR-Pool mit bekannten dUTPasen

Dabei zeigt die Konsenssequenz den angenommenen Wildtyp der dUTPase, also die Basen höchster Frequenz unter 22 Klonen (Harris et al., 1997). HERV-K Chromosom 7 = HML-2.HOM (GenBank acc. nr. AF074086), HERV-K cons. = Konsenssequenz der dUTPase (Harris et al., 1997), MMTV = dUTPase des mouse mammary tumor virus (SwissProt acc. nr. P10271), FIV = dUTPase des feline immuno-deficiency virus (SwissProt acc. nr. P16088), E. coli = dUTPase von E. coli (SwissProt acc. nr. Q8XDA1), Human = mitochondriale Isoform der humanen dUTPase (SwissProt acc. nr. P33316). Das Alignment ist nur für die evolutionär konservierten strukturellen Motive (Harris et al., 1999) umgebende Region abgebildet. Diese Motive sind gerahmt hervorgehoben. Die schattierten Bereiche kennzeichnen identische Aminosäuren bzw. konservierte Austauschbezüge auf die Konsenssequenz der HERV-K-dUTPase. Die Lage der dUTPase nach proteolytischer Spaltung des Polyprotein-Vorläufers ist ungewiss.

2 Zielstellung

In Vorarbeiten wurde das Zielintervall von PSORS1 durch unsere Arbeitsgruppe auf einen Bereich um den Marker M6S168, etwa 30 kb telomerisch von HLA-C auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 eingegrenzt. Dieser enthält Fragmente eines humanen endogenen Retrovirus der HERV-K-Familie. Hierunter befindet sich als längste intakte putative Transkriptionseinheit (sogenannter „Open reading frame“, ORF) der ORF 23048, der ein Fragment des HERV-K-Protease-Gens darstellt, das N-terminal eine dUTPase ausbildet. Ziel dieser Arbeit ist es, zu klären, ob dieses putative Transkript in vivo exprimiert wird. Dabei soll die Expression in mononukleären Zellen des Blutes (PBMC), in Vollblut und in Hautgewebeproben von Psoriasis-Patienten sowie gesunden Probanden untersucht und verglichen werden. Darüber hinaus soll mittels der sogenannten RACE (rapid amplification of cDNA ends)-PCR-Technik die potentielle komplette cDNA des gesuchten Suszeptibilitätsgens identifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Chemikalien

3.1.1 Geräte

Elektrophoreseeinheit (Power Supply EPS600)	Amersham Pharmacia Biotech
Elektrophoresekammern	BioRad Laboratories
Pipetten (2 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Autoclave (Varioklav 75S)	H+P Labortechnik
Inkubator (IG150)	Jouan GmbH
horizontale Gelelektrophoresekammern	Amersham Pharmacia Biotech
Magnetrührer IkaMag®REO	IKA® Werke
Megabace 1000 capillary sequencer	Amersham Pharmacia Biotec
Mikrowelle Micromat	AEG
Sterile Abzugshaube Hera safe	Heraeus Instruments
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultra Turrax® T25 basic	IKA® Werke
UV-Photometer	Biometra
Vortexer (G-560E)	Scientific Industries
Waage LC 621 S	Sartorius AG
Zentrifuge 5417C	Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-25/ GS-6	Beckman

3.1.2 Chemikalien/Puffer/Enzyme

Ampicillin	Sigma-Aldrich
Bacto-Agar	Difco
100-bp-Leiter	GIBCO™ Invitrogen Corporation
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Borsäure	Merck
Chloroform	J.T. Baker
Cip (calf intestinal phosphatase, 1 U/µl)	Sigma-Aldrich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	GIBCO™ Invitrogen Corporation
DNase I amplification grade	Invitrogen™

Material und Methoden

10x DNase I reaction buffer	Invitrogen™
dNTP Set (100 mM)	Amersham Biosciences
EDTA (Ethyldiamintetraacid)	Invitrogen™
Ethanol absolut (96 %)	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Roth
expand HF buffer 10x konzentriert + MgCl	Roche
Ficoll Paque™ Plus	Amersham Biosciences
5x first-strand buffer	Invitrogen™
Glycerol	Roth
Hefeextrakt	Difco
HCl rauchend	Merck
HotStarTaq™ DNA Polymerase	Qiagen
IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactose, 100 mM)	Fermentas
Isopropanol	Merck
LB-Broth (Luria/Miller)	Roth
Magnesium (Mg ²⁺)	Merck
NEPuffer 1	New England Bio Labs
Orange G (Certistain®)	Merck
PBS Duplecco`s (PBS, <i>phosphate buffered saline</i>)	GIBCO™ Invitrogen Corporation
PCR buffer (10x) + MgCl ₂	Roche
PCR reaction buffer (10x)	Roche
1 % Penicillin/Streptomycin	GIBCO
RNase OUT™ Ribonuklease Inhibitor (40 units/μl)	Invitrogen™
RPMI 1640 Medium	GIBCO™ Invitrogen Corporation
Sac1 (100,000 units/ml)	New England Bio Labs
SeaKem® LE Agarose	BMA (Rockland, USA)
Taq DNA Polymerase	Roche
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	ICN Biomedicals
TRizol® Reagent	GIBCO™ Invitrogen Corporation
X-Gal (20 mg/ml)	Fermentas
Xho1	New England Bio Labs

3.1.3 Zusammensetzungen häufig verwendeter Reagenzien, Puffer und Medien

<u>10x DNase I reaction buffer</u>	500,0 mM KCl 200,0 mM Tris-HCl pH 8,4 20,0 mM MgCl ₂
<u>5x first-strand buffer</u>	375,0 mM KCl 250,0 mM Tris-HCl pH 8,3 15,0 mM MgCl ₂
<u>LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)</u>	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto Hefe-Extrakt <u>1 % NaCl</u> mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren
<u>LB-Amp-Medium</u>	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
<u>LB-Agar-Platten</u>	1,5 % Agar in LB-Medium, pH 7,0, autoklavieren
<u>LB-Amp-Platten</u>	LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin
<u>Probenpuffer (loading buffer)</u>	0,1 g Orange G 1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 20 ml Ficoll Plus (20 %) ad 100 ml mit aqua dest., autoklavieren
<u>PCR reaction buffer 10x konzentriert</u>	pH 8,3 500 mM KCl 100 mM Tris-HCl 15 mM MgCl ₂
<u>SOC-Medium</u> (SOC, Super Optimal Broth)	20 g Bacto-Trypton 5 g Bacto Hefe-Extrakt 0,5 g NaCl 10 ml 0,25 M KCl 5 ml 2 M MgCl ₂ <u>20 ml 1 M Glukose</u> aqua dest. ad 1000 ml, pH7, autoklavieren
<u>10x TBE Puffer</u>	121 g 0,5 M Tris 61,8 g 0,5 M Borsäure 7,44 g 0,01 M EDTA aqua dest. ad 2 l

3.1.4 Kits

Oligotex mRNA Mini Kit	Qiagen
Oligotex® mRNA Kit	Qiagen
QIAamp® RNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
SMART™ Race cDNA Amplification Kit	Clontech
SuperScript™ II RNase H RT	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Promega

3.1.5 Bakterienstämme

Escherichia coli Top 10 (One shot Top10)	Invitrogen
Escherichia coli DH5 α	Invitrogen

3.1.6 Vektoren

Pet-22b(+)-Vektor	Novagen
pGem-T Easy-Vektor	Promega

3.1.7 Oligonukleotide

β -actin-Primer	BioTeZ
nested primer	Metabion
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0,5 μ g/ μ l)	Invitrogen
random hexamer primer	GIBCO™ Invitrogen Corporation
spezifische Primer	Metabion

<i>Paar</i>	<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Annealing Temp.</i>
6 462 bp	5600 forward	5'-GTT TTA ACT GTT TGA AGC ATG ATC AC-3'	57,5 °C
	6062 reverse	5'-CAA TGA CCC CTG TAT GTA TTT GTA TG-3'	
7 430 bp	6025 forward	5'-AAG TTT AAA AGG CAT ACA AAT ACA TAC AGG G-3'	59.5 °C
	6455 reverse	5'-GGA CCT TCA CAA TGC AAA ATA TAA TGG-3'	

Nest 7 260 bp	N6025 forward	5'-AAA GCA GAG CCA GGA GAG TGT ATA GC-3'	63 °C
	N6455 reverse	5'-GTT GAA CTG GCC ACG CAG AC-3'	
8 624 bp	6363 forward	5'-GTG GCC AGT TCA ACA CAC TCA AC-3'	61 °C
	6987 reverse	5'-CCT TCC TGG CTG TAA TGC TCC T-3'	

Tabelle 3.1: Spezifische Primerpaare

Aufgelistet sind Name, Sequenz, Primeranlagerungstemperatur (Annealing-Temperatur) der Primerpaare 6, 7, 8 und des nested Primerpaares 7 sowie die jeweilige Länge des erwarteten PCR-Produkts.

<i>Paar</i>	<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Annealing Temp.</i>
β-Actin 466 bp	β-Actin forward	5'-AGG AGA AGC TGT GCT ACG TC-3'	57 °C
	β-Actin reverse	5'-CTC GTC ATA CTC CTG CTT GC -3'	

Tabelle 3.2: β-Actin Primer

Aufgelistet sind Sequenz, Primeranlagerungstemperatur und die Länge des erwarteten PCR-Produkts.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)

Man entnimmt einem Probanden 50 ml Heparinvenenblut. Jeweils 25 ml Blut werden langsam auf ein 50 ml Tube, das mit 18 ml Ficoll (37 °C) gefüllt ist, geschichtet. Ficoll ist ein Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin zur Isolierung der mononukleären Zellen. Anschließend wird bei 1250 g ohne Bremse 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Aufgrund des Dichtegradienten zwischen Blut und Ficoll sammeln sich Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen am Boden des Röhrchens. Direkt darüber schließt sich die Ficoll-Schicht an. Das in der obersten Schicht befindliche Blutplasma, das die Thrombozyten enthält, wird abgenommen und entsorgt. Die in der Interphase befindlichen peripheren mononukleären Zellen, Buffy Coat genannt, werden vorsichtig abpipettiert, in 25 ml 37 °C warmem PBS-Medium resuspendiert und 5 min bei 580 g mit Bremse zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wird viermal wiederholt. Schließlich werden die Zellen in je 5 ml RPMI-Medium, welchem 10 % FCS, Penicillin und Streptomycin zugesetzt sind, aufgenommen und resuspendiert. Beide Zellvolumina werden zusammengeführt, die Zellen gezählt und zu drei gleichen Teilen in einer 24-Well-Platte über Nacht inkubiert.

3.2.2 RNA-Isolation aus PBMCs

Zunächst werden die über Nacht inkubierten Zellen in den 24-Well-Platten bei 235 g mit Bremse 5 min zentrifugiert. Anschließend nimmt man das RPMI Medium ab, füllt die Wells mit 2 ml 37 °C warmem PBS, resuspendiert und zentrifugiert wie oben beschrieben. Dieser Waschvorgang wird abermals wiederholt. Anschließend wird das PBS abgenommen, die Zellen in 750 µl Trizol-Reagenz resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Trizol ist eine toxische monophasische Flüssigkeit bestehend aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, welches die Zellwände zerstört. Aufgeteilt auf zwei Eppendorf-Gefäße werden nun den 750 µl Trizol 150 µl Chloroform zugesetzt, 15 Mal handgeschüttelt, 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei 12 000 g und 4 °C zentrifugiert. Hierbei wird eine Phasentrennung erzielt. Die geringe Menge an Chloroform löst sich im Phenol und verdrängt das Wasser von den Proteinen, so dass diese als Interphase ausfallen. Die DNA bleibt in der unteren organischen Phenol-Chloroformphase, während sich die RNA in der oberen wässrigen Phase anreichert. Diese Oberphase, die RNA enthaltend, wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Präparation bei 4 °C gelagert. Zur Präzipitation der RNA werden 750 µl Isopropanol zugegeben, kurz geschüttelt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min bei 12 000 g und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat bildet ein gelartiges Pellet am Rand oder Boden des Eppendorfgefäßes. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 1,5 ml Ethanol (75%ig, DEPC-H₂O enthaltend) gewaschen und 5 min bei 7500 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die RNA nach Abpipettieren des Restethanol luftgetrocknet und anschließend in 30 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Zur kompletten Auflösung der RNA und Verdampfung möglichen Restethanols erfolgt eine 10-minütige Phase bei 55 °C im Thermomixer. Die RNA wird anschließend bei -70 °C gelagert. Die Arbeitsschritte sind am RNA-Arbeitsplatz auszuführen und alle verwendeten Geräte sind vor Gebrauch mit RNase-Killer-Spray zu behandeln, um eine Kontamination mit RNasen weitestgehend zu vermeiden.

3.2.3 RNA-Isolation aus Hautgewebeproben

Eine entnommene 6 mm durchmessende Hautstanze (ein Gehalt von etwa 50 bis 70 µg RNA ergebend) wird sofort in einem Kryoröhrchen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei -80 °C gelagert und mit Trockeneis transportiert, um eine Degradierung der RNA zu vermeiden. Zur RNA-Isolation wird das Gewebe mit 3 ml Trizol-Reagenz versetzt und mittels des Ultra Turrax homogenisiert. Anschließend

werden analog zu dem Protokoll der RNA-Isolation aus PBMC's 750 μ l Trizol und 150 μ l Chloroform zur Separation der Phasen verwendet. Die RNA-Präzipitation wird mithilfe von Isopropanol erreicht, die gewonnene RNA mit Ethanol (75 %) gewaschen und wie oben beschrieben aufgenommen und gelagert.

3.2.4 Isolation von PolyA⁺-mRNA aus Gesamt-RNA

Für das Gewinnen der PolyA⁺-mRNA wurde in der vorliegenden Arbeit der Oligotex mRNA Mini Kit von Qiagen angewandt, der das spezifische Merkmal von eukaryonter mRNA, ein 20-250 Adenosin-Nukleotid-Ende aufzuweisen, nutzt. Als Ausgangsmaterial benötigt man isolierte RNA in einer Menge von $\geq 250 \mu$ g. Die mRNA umfasst einen Anteil von 1-5 % von der Gesamt-RNA. Die Konzentration und Reinheit der RNA werden mittels der Absorptionsspektrometrie bestimmt. Im Rahmen des Protokolls werden die in RNase-freiem Wasser gelöste RNA zusammen mit einem Bindungspuffer und der Oligotex-Suspension erhitzt und inkubiert. Dabei wird die Sekundärstruktur der RNA aufgelöst, und die Oligo-dT Partikel der Oligotex-Suspension hybridisieren an das Polyadenyl-Ende der mRNA, die dann durch Zentrifugation pelletiert wird. Die tRNA und rRNA, die kein PolyA⁺-Ende aufweisen, werden dabei nicht erfasst. Mittels Kopplung an eine solide Matrix innerhalb der *Spin Columns* wird die PolyA⁺-mRNA gewaschen und dann eluiert. Bestandteil des Protokolls ist außerdem ein DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set von Qiagen. Die Konzentration der RNA wird entweder densitometrisch unter Nutzung der WinCam-Software oder mithilfe der Absorptionsspektrometrie bestimmt. Anhand dessen kann man die für die cDNA-Synthese notwendige RNA-Menge von ungefähr 1-2 μ g RNA bestimmen.

3.2.5 Densitometrische Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Die Konzentrationen der auf ein Agarosegel aufgetragenen DNA- bzw. RNA-Proben werden mittels der WinCam-Software ermittelt. Als Referenz wird eine 100-bp-Leiter verwendet, wobei 15 μ l dieser 500 ng DNA entsprechen. Die ist aus 20 μ l der DNA-Leiter (1 mg/ml), 200 μ l Probenpuffer und 380 μ l H₂O zusammengesetzt.

3.2.6 RNA/DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie

Die zu untersuchende Probe wird in einem Konzentrationsverhältnis von z. B. 1:20 mit Wasser verdünnt in eine Quarzküvette gegeben und in einem Photometer mit UV-Lampe gegen reines Wasser bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei wird

die Konzentration der RNA bzw. DNA über die Messung der optischen Dichte (OD) ermittelt. Die Formel lautet: $c \text{ (ng/}\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times V \times F$ (c = Konzentration der Probe, V = Verdünnungsfaktor, F = Multiplikationsfaktor; 50 für DNA, 40 für RNA). Aus dem Verhältnis der OD_{260} und der OD_{280} erhält man eine Aussage über die Proteinkontamination der Probe. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen durch Proteine hin.

3.2.7 DNase-Verdau

Der cDNA-Synthese vorausgehend unterzieht man die RNA einem DNase-Verdau mit der Desoxyribonuklease I (DNase I), um einer Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA vorzubeugen. Die DNase I verdaut Einzel- und Doppelstrang-DNA zu Oligodesoxyribonukleotiden mit einem 5'-Phosphatende. Die pankreatische DNase I ist in Verbindung mit Mg^{2+} für Einzelstrangbrüche unabhängig voneinander in beiden Strängen der DNA verantwortlich. Das optimierte Protokoll lautet wie folgt (Tabelle 3.3).

Stammlösungen	n = 1	finale Konzentration
RNA	variabel	2,0 μg
DNase I, Amp Grade (1,0 U/ μl)	8,0 μl	0,27 U/ μl
10x DNase I Reaction Buffer (10 x konzentriert)	3,0 μl	1 x konzentriert
RNase Inhibitor (40,0 U/ μl)	1,5 μl	2,0 U/ μl
mit DEPC-H ₂ O auffüllen	ad 30,0 μl	

Tabelle 3.3: DNase-Verdau

Aufgelistet sind die Reagenzien, deren Anteil sowie deren finale Konzentration im DNase-Verdau-Reaktionsgemisch.

Die Proben werden 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase-Inaktivierung erfolgt durch Zugabe von 2 μl EDTA (25 mM), das als Komplexbildner während eines zehnmütigen Erhitzens bei 65 °C dem katalytischen Zentrum die Mg^{2+} - und Ca^{+} -Ionen entzieht. Das Endvolumen beträgt 32 μl .

3.2.8 cDNA-Erststrangsynthese

Von der isolierten gesamten zellulären RNA (80 % rRNA, 15 % tRNA, 5 % mRNA) dient die mRNA als Matrize für die Synthese der komplementären DNA (*complementary*

DNA, cDNA). Dazu bedient man sich einer modifizierten *moloney murine leukemia virus*-reversen-Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase und der zufälligen *random hexamer primer*. Diese sind Hexanukleotide mit einer statistischen Basenzusammensetzung, die zufällig an die mRNA hybridisieren und der reversen Transkriptase als Startpunkt zur cDNA-Synthese dienen. Der Vorteil dieser Hexamerprimer besteht darin, dass alle mRNA-Bereiche der cDNA vertreten sind und somit auch 10-kb-lange mRNAs erfasst werden. Die *random hexamer primer* binden jedoch auch an die anderen Subgruppierungen der RNA. Nach dem DNase-Verdau wird der Ansatz halbiert (2 x 16 µl). Die als Negativkontrolle dienende Hälfte wird mit 10 µl DEPC-H₂O aufgefüllt und bei -25 °C gelagert. Den anderen zur cDNA-Synthese bestimmten 16 µl werden zunächst 1 µl *random hexamer primer* (3 µg), 1 µl spezifischer Primer-Mix, (6 µmol/l) und 1 µl dNTP (25 mM) hinzugesetzt, für 5 min bei 65 °C erwärmt und dann sofort wieder auf Eis gestellt. Anschließend werden 5,5 µl 5 x First-Strand-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT als Oxidationsschutz der reversen Transkriptase und 1 µl RNase Inhibitor (40 units/µl) hinzugegeben und 2 min bei 42 °C erhitzt. Nach der Zugabe von 1 µl Superscript (reverse Transkriptase, 200 U) wird der Reaktionsansatz bei 42 °C über 50 min inkubiert und anschließend 15 min bei 70 °C inaktiviert. Die entstandene cDNA wird bei -20 °C gelagert und kann als Template für die folgende RT-PCR benutzt werden.

3.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) stellt eine vielfach angewandte Technik zur selektiven Detektion und Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen mithilfe einer DNA-Polymerase dar (Mullis et al., 1986). Dabei werden kleinste Mengen DNA exponentiell angereichert und somit kenntlich gemacht. Sie wird in sogenannten Thermocyclern durchgeführt, welche die Reaktionsproben in kürzester Zeit aufheizen und abkühlen können. Der PCR-Zyklus besteht grob aus drei Schritten: 1) Denaturierung, 2) Annealing und 3) Elongation. Das Reaktionsgemisch, das aus einem DNA-Template, zwei Oligonukleotidprimern, der thermostabilen DNA-Polymerase, einem dazugehörigen Puffer und einem Nukleotidtriphosphatgemisch besteht, wird zu Beginn auf 94 °C erhitzt, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen gelöst werden und die doppelsträngige DNA in ihre beiden Einzelstränge zerfällt (Denaturierung). Das anschließende schnelle Abkühlen auf 36-60 °C verhindert, dass sich die DNA-Stränge wieder aneinander lagern. Bei der folgend eingestellten Annealing-Temperatur, die von

Länge und GC-Gehalt der Primer abhängt, binden die zugegebenen Primer komplementär an die Enden der beiden Einzelstränge und bilden Hybridmoleküle, die als Ausgangspunkt für die Elongation dienen und den zu amplifizierenden Bereich markieren. Ein Primer besteht aus einer kurzen einzelsträngigen DNA-Sequenz, die man entweder synthetisch oder experimentell durch Isolierung des gewünschten DNA-Abschnitts herstellt. Die Annealingtemperatur für Primer mit einer Länge von etwa 20 bp kann mit der Gleichung nach Wallace: T_m (in °C) = 4 * (G + C) + 2 * (A + T) ermittelt werden. Der durch das Primer-Annealing entstandene doppelsträngige Bereich dient nun als Startpunkt für die DNA-Polymerase. Die DNA-Polymerase ist ein Enzym, das aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird, das bei 72 °C sein Temperaturoptimum hat. Dieses Enzym baut Nukleotidtriphosphate (dNTPs) komplementär in 5'-3'-Richtung ein und vervollständigt somit den Doppelstrang. Als Produkt erhält man zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle, deren Länge durch die 5'-Enden der Primer festgelegt ist. Durch erneutes Erhitzen auf 94 °C beginnt die Schrittfolge erneut. Jede Wiederholung dieses Zyklus führt zu einer Verdopplung der DNA im Sinne einer „Kettenreaktion“ und zu einer exponentiellen, selektiven etwa 10⁶-10⁷-fachen Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz.

3.2.10 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Mithilfe der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) können RNA-Sequenzen spezifisch amplifiziert werden. Besondere Bedeutung kommt dieser Methode zu, wenn seltene Transkripte nachgewiesen und die Stärke der Genexpression eingeschätzt werden soll. Nach der RNA-Isolation schließt sich wie beschrieben der DNase-Verdau, die cDNA-Synthese und schließlich die RT-PCR an. Um eine tatsächliche Expression von genomischer Verunreinigung zu differenzieren, wurde die RT-PCR-Reaktion grundsätzlich auch mit der zugehörigen Negativkontrolle durchgeführt, die aus einer DNase-verdauten RNA besteht, die während der cDNA-Synthese ohne Zusatz der reversen Transkriptase blieb. Zur Überprüfung der cDNA-Synthese diente die β -Actin-PCR. β -Actin wird als sogenanntes „Housekeeping“ Gen in allen Zellen unabhängig vom Aktivierungszustand der Zelle exprimiert. Die β -Actin-Primer sind derart gestaltet, dass sie den Exon-Exon-Übergang erkennen und somit spezifisch für cDNA sind, die eine Kopie der schon gespleissten, von Introns befreiten mRNA darstellt. Sofern eine *nested PCR* (siehe Resultate) angeschlossen wurde, diente ebenfalls das Protokoll für die spezifischen Primer als Vorlage. Die Reaktionsansätze und das PCR-Programm

sehen wie folgt aus (Tabelle 3.4, 3.5 und 3.6).

Stammlösungen	Konzentration	Finale Konzentration	N=1
DEPC-H ₂ O			18,5 µl
d-NTP	25 mM je dNTP	250 µM je dNTP	0,25 µl
PCR Reaktions-Puffer	10 x konzentriert	1 x konzentriert	2,5 µl
Primer Mix	6 µM	0,6 µM	2,5 µl
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	0,05 U	0,25 µl
Template DNA	variabel		1 µl

Tabelle 3.4: RT-PCR mit spezifischen Primern in einem Gesamtvolumen von 25 µl

Aufgelistet sind die Reagenzien mit ihrer ursprünglichen Konzentration, der finalen Konzentration sowie deren Anteil im RT-PCR-Reaktionsgemisch mit spezifischen Primern.

Stammlösungen	Konzentration	finale Konzentration	N=1
DEPC-H ₂ O			18,75 µl
d-NTP	25 mM je dNTP	250 µM je dNTP	0,25 µl
PCR reaction buffer	10 x konzentriert	1 x konzentriert	2,5 µl
β-Actin Primer Mix:	10 µM	0,5 µM	1,25 µl
Taq DNA Polymerase	5,0 U/µl	0,05 U	0,25 µl
Template DNA	variabel		2 µl

Tabelle 3.5: PCR mit β-Actin-Primern in einem Gesamtvolumen von 25 µl

Aufgelistet sind die Reagenzien mit ihrer ursprünglichen Konzentration, der finalen Konzentration sowie deren Anteil im RT-PCR-Reaktionsgemisch β-Actin-Primern.

PCR-Programm	Temperatur	Zeit	
1. Initiale Denaturierung	94,0 °C	3 min	} 35 Zyklen
2. Denaturierung	92,0 °C	20 sec	
3. Annealing	Spezif. Temp.	30 sec	
4. End-Elongation	72,0 °C	1 min	
5. Elongation	72,0 °C	5 min	

Tabelle 3.6: PCR-Programm für die RT-PCR abgestimmt auf die Taq-DNA-Polymerase

3.2.11 Vollblut-Assay

Bei dem Vollblut-Assay-Protokoll dienen 1,5 ml venöses Blut als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolierung mit dem QIAamp RNA Blood Mini-Kit. Dabei werden zunächst selektiv die Erythrozyten durch einen hypotonen Lysepuffer zerstört und extrahiert. Die verbleibenden Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) werden anschließend unter stark denaturierend wirkenden Bedingungen, die sofort sämtliche RNAsen inaktivieren, mittels des RLT-Puffers (Lysis-Puffer) lysiert. Dies bewirkt die Isolation von intakter RNA. Nach Homogenisierung in einer Shredder-Spin Säule und Zugabe von Ethanol wird die RNA während einer Zentrifugation an eine Silikon-Gel-Membran gebunden. Anschließende Waschvorgänge mit bereitgestellten Puffern beugen Kontaminationen vor. Ein eingefügter DNase-Verdau von 15 min bei Raumtemperatur mit dem RNase-Free DNase Set von Qiagen (DNase I = 1500 Kunitz units) behebt Verunreinigungen mit genomischer DNA. Die gewonnene RNA, ca. 3 µg/ml Vollblut, wird in 25 µl RNase-free-water eluiert. Ein am Ende durchgeführter zweiter DNase-Verdau mit der DNase I von Invitrogen (4 µl DNase, 4 µl 10 x DNase I reaction buffer und 3 µl RNaseOUT, RNA-Eluat) wird 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und beseitigt verbleibende DNA-Kontaminationen. Weitere 4 µl EDTA (25 mM) und eine 10-minütige Erhitzung des Ansatzes bei 65 °C inaktivieren die DNase. Die Konzentration der RNA wird mit den zuvor beschriebenen Methoden bestimmt. Die Hälfte des 40 µl-Reaktionsansatzes, die mindestens 2 µg RNA ergeben, wird für die nun folgende cDNA-Synthese verwendet. Man versetzt die 20 µl Ansatz mit 2 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈-Primer (500 µg/ml) und 2 µl dNTP (10 mM each), inkubiert den Ansatz 5 min bei 65 °C und repositioniert ihn dann sofort wieder auf Eis. Nach einer kurzen Zentrifugation erfolgen die Zugabe von 8 µl 5x first-strand Buffer, 4 µl 0,1 M DTT und 2 µl RNase-Inhibitor (40 units/µl). Der Reaktionsansatz wird vermischt und zwei Minuten bei 42 °C erhitzt. Es ergibt sich eine Gesamtmenge von 38 µl, die halbiert wird, wobei die eine Hälfte als Kontrolle fungiert. Der anderen Hälfte werden 1,5 µl Superscript (reverse Transkriptase) für die cDNA-Synthese zugeführt. Die Inkubation dieser reversen Transkriptase erfolgt über 50 min bei 42 °C, die anschließende Inaktivierung über 15 min bei 70 °C. Die entstandene cDNA kann nun wieder als Template für die RT-PCR genutzt werden. Bei dem Vollblut-Assay werden während der RT-PCR anstelle der *random hexamer primer* Oligo-dT-Primer verwendet, die aus 16-20 Thyminen bestehen und an das PolyA⁺-Ende der mRNAs binden. Einerseits gewährleisten die Oligo dT-Primer die selektive Bindung an die mRNAs und erhöhen damit die Spezifität;

andererseits synthetisiert die reverse Transkriptase hierbei lediglich cDNAs von 1-2 kb Länge.

3.2.12 Agarosegel-Elektrophorese

Die hier angewandte Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäuren zu analysieren. DNA-Stränge bzw. PCR-Amplifikate werden der Größe nach aufgetrennt und ihre Größe durch Vergleich mit Banden bekannter Größe bestimmt. Dazu wird ein 1%iges Agarosegel, bestehend aus LE-Agarose und Elektrophoresepuffer (1x TBE), nach dem Erhitzen gegossen, das kleine Taschen für das Auftragen von Proben enthält. 3 µl der zu untersuchenden Probe werden jeweils 5 µl Probenpuffer zugesetzt. Dieser enthält Ficoll, dessen größere Dichte die DNA in die Geltaschen sinken lässt und Orange G, das die Lauffront sichtbar macht. Es wird eine Spannung von 60 bis 140 V angelegt, wodurch die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung zur positiv geladenen Anode wandert. Für Amplifikate, die kleiner als 3 kb sind, gilt, dass die Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge ist. Als Referenz für sich abbildende Banden läuft eine DNA-Leiter mit. Dem Gel zugegebenes Ethidiumbromid (0,6 µg/ml), ein Fluoreszenzfarbstoff, der die DNA interkaliert, wird bei anschließender UV-Strahlung von 220 nm angeregt und demaskiert die erwünschten DNA-Banden. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorhandenen DNA/RNA-Menge.

3.2.13 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Für die spätere Sequenzierung und bei Klonierungen müssen die PCR-Produkte aus dem Gel gelöst werden. Dafür verwendet man den QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen). Zunächst schneidet man die Bande von Interesse unter UV-Licht aus, um eine DNA-Degradierung zu verhindern. Das Protokoll wird nach Angaben des Herstellers weitergeführt.

3.2.14 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zum späteren Sequenzieren müssen PCR-Produkte von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen befreit werden. Mittels des QIAquick PCR Purification Kit I wird dies ermöglicht. Dabei folgt man den Angaben des Herstellers.

3.2.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wird mithilfe eines ABI capillary sequencer nach Angaben des

Herstellers durchgeführt. Dafür werden 10 ng DNA pro 100 zu sequenzierende bp in einem Volumen zwischen 1 und 6 μ l benötigt. Die Sequenzanalyse wird mit der SeqMan-Software (DNASStar) ausgeführt.

3.2.16 Klonierung von PCR-Produkten

Unter *Klonierung* versteht man die Vermehrung eines bestimmten DNA-Fragmentes in Wirtszellen. Zunächst schneidet man mit Restriktionsendonukleasen die Moleküle der Ziel-DNA in Fragmente passender Größe. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die an spezifische Sequenzen der DNA binden und sie dort schneiden. Anschließend verknüpft man die Ziel-DNA mit einem Replikon, einer DNA-Sequenz, die eine unabhängige DNA-Replikation vermitteln kann. Als Replikon dienen Vektoren, z. B. Plasmidvektoren, die sich durch ihre geringe Größe und hohe Kopienzahl auszeichnen und zumeist nur noch das für die Selektion notwendige Resistenzgen sowie einen Replikationsursprung für ihre Vermehrung besitzen. Sie verfügen über eine „multiple cloning side“, die eine Reihe sogenannter singulärer Restriktionsstellen enthält, an denen sie selektiv mit Restriktionsenzymen (bzw. -endonukleasen) geschnitten werden können. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind zumeist palindromisch aufgebaut. Liegen die Schnittstellen nicht auf der Symmetrieachse der Erkennungssequenz, erzeugen die Restriktionsendonukleasen überhängende Enden, auch „sticky“ oder kohäsive Enden genannt. Dabei schneiden sie die Ziel-DNA und den Vektor so, dass dieselbe Art von Enden erzeugt wird, die sich anschließend mithilfe des Enzyms Ligase während der *Ligation* miteinander verknüpfen lassen. Die bei der Ligation entstehenden Hybridmoleküle (rekombinante DNA) überträgt man auf geeignete Wirtszellen, die schließlich durch Zellteilung proliferieren. Die Aufnahme exogener DNA-Moleküle in eine Wirtszelle, in der sich das Replikon mit der rekombinanten DNA unabhängig vom Genom der Wirtszelle repliziert, wird als *Transformation* bezeichnet. Dazu bedürfen Bakterien einer „natürlichen Kompetenz“. Besitzen sie diese nicht, muss die Kompetenz induziert werden. Das Hybridmolekül aus Vektor und dem eingebrachten Fragment von Ziel-DNA wird während einer Übernachtkultur in einer schnell wachsenden, transformierten Bakterienpopulation (z. B. *Escherichia coli*) vermehrt und kloniert. Das heißt, das gleiche rekombinante DNA-Fragment findet sich in allen Zellen einer entstandenen Kolonie als DNA-Klon wieder. Nach Ernten der Zellkulturen kann man selektiv die rekombinante DNA, z. B. mittels Plasmidpräparation isolieren. Dabei erhält man ein Vielfaches der anfänglich

eingesetzten DNA-Menge.

3.2.16.1 Design der Primer

Für die Ligation müssen die Enden von Vektor und PCR-Fragment kompatibel gestaltet werden. Dafür werden sie zuvor einem Restriktionsverdau mit Restriktionsenzymen unterzogen, wobei dieselbe Art von Enden erzeugt wird. Das Ziel-DNA-Fragment muss zuvor mit den Sequenzen der Schnittstellen versehen werden. In der „multiple cloning side“ des verwendeten pET-22b(+)-Vektors wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Xho1 und Sac1 ausgewählt und entsprechende Primer konstruiert. Diese bestehen aus der Restriktionsenzym-Schnittstellensequenz, einer zum PCR-Fragment komplementären Sequenz und einem Überhang (Primersequenz Kapitel 4.3.1). Die Annealing-Temperatur der Primer errechnet sich mit folgender Formel: Annealing-Temperatur in °C = $69,3 + 0,41 \times \frac{G}{C} \text{ Gehalt \%} - \frac{650}{B_p}$ errechnet, wobei die Xho1- bzw. Sac1-Sequenz und der Überhang nicht berücksichtigt wurden.

3.2.16.2 Sac1-5785-Xho1-6241-PCR

Bei der Sac1-5785-Xho1-6241-PCR wird das in diesem Fall zu klonierende 456-bp-Ziel-Fragment des bereitstehenden 1387-bp-PCR-Fragmentes amplifiziert. Darüber hinaus wird die Ziel-DNA mit den Schnittstellensequenzen der Restriktionsenzyme verknüpft. Die Sac1-5785-Xho1-6241-PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 53,5 °C durchgeführt. Das PCR-Programm wurde analog zu dem der RT-PCR eingestellt. Aufgeführt ist der Reaktionsansatz für die PCR in einem 50 µl-Gesamtvolumen. Auf einem 1%igen Agarose-Gel werden 36 µl des PCR-Produkts mit 10 µl Probenpuffer aufgetragen und einer Elektrophorese unterzogen. Das PCR-Produkt wird per Gelreinigung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit purifiziert und in 30 µl destilliertem Wasser eluiert.

Sac1-5785-Xho1-6241-PCR-Reaktionsansatz

5 µl	Primer-Mix (5 µMol)
5 µl	10-fach Puffer
0,4 µl	Taq-Polymerase
1 µl	dNTP (10 mM)
36,6 µl	H ₂ O
2 µl	5600-6987-PCR-Fragment
50 µl	Gesamtvolumen

3.2.16.3 Restriktions-Verdau

Die Restriktionsenzyme spalten im doppelsträngigen DNA-Molekül die Phosphodiesterbindungen. Bei der Spaltung können 5'- bzw. 3'-überlappende oder glatte DNA-Enden entstehen. Die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Puffer, BSA-Zusatz) werden nach Angaben des Herstellers gewählt. Pro 1 µg DNA werden 1-2 Units Enzym zugesetzt. Die Inkubationsdauer ist von der DNA- und Enzymmenge abhängig. Im speziellen Fall wurden die Restriktionsenzyme Sac1 und Xho1 gewählt, die bei dem Vektor innerhalb der „multiple cloning side“ und bei dem PCR-Produkt an den spezifischen Schnittstellen ansetzten. Die Restriktionsansätze wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch eine 20-minütige Inkubation bei 65 °C beendet.

Restriktionsendonuklease-Verdau von Insert und Vektor

Insert (Ziel-DNA)

4 µl 10 x BSA
4 µl 10 x NEPuffer 1
28 µl Insert
2 µl Sac1
2 µl Xho1
ad 40 µl mit H₂O dest.

Vektor pET-22b(+)

2 µl 10 x BSA
2 µl 10 x NEPuffer 1
10 µl Vektor
2 µl Sac1
2 µl Xho1
ad 20 µl mit H₂O dest.

→ 2 h Inkubation bei 37 °C
→ 20 min Inaktivierung bei 65 °C

Kontrollverdau

4 µl Miniprep
2 µl NEPuffer 1
1 µl xho1
1 µl sac 1
12 µl H₂O

2 h Inkubation bei 37°C
20 min Inaktivierung bei 65°C

Neben der Vorbereitung von DNA-Fragmenten und Vektoren für eine Ligationsreaktion dient ein Restriktionsverdau auch der Kontrolle, ob bereits präparierte Plasmide das gewünschte Insert-Fragment enthalten. Kontrollrestriktionen von Plasmid-Präparationen wurden für ca. 2 Stunden in 20 µl Gesamtvolumen inkubiert.

3.2.16.4 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA

Bei der Dephosphorylierung werden die 5'-endständigen Phosphatgruppen restringierter DNA durch das Enzym alkalische Phosphatase (*cal* *intestinal*

phosphatase, CIP) abgespalten. Durch diese Reaktion soll die Religation des geschnittenen Vektors verhindert werden. Für die Dephosphorylierung werden dem bereits verdauten Vektor-Restriktionsansatz noch vor der Beendigung der Reaktion das CIP-Enzym und der entsprechende CIP-Puffer nach Herstellerangaben zugesetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch 20-minütiges Erhitzen bei 65 °C kann das Enzym inaktiviert und die Reaktion beendet werden.

3.2.16.5 Ligation

Vor der Ligation müssen die Restriktions-Verdau-Reaktionsansätze nach einer Agarose-Gelelektrophorese (1 %) mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt werden. Anschließend erfolgt die Konzentrationsbestimmung der DNA mittels Spektrometrie, um die einzusetzende Menge festzulegen. Das zu klonierende Fragment wird in einem 2 bis 5-fachen molaren Überschuss zugegeben. Die Ligation bewirkt die Aufnahme des Inserts in den Vektor. Die T4-Ligase katalysiert dabei die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen linearer, doppelsträngiger DNA von Vektor und DNA-Fragment. Der Ligationsansatz wird zentrifugiert und bei 16 °C über Nacht inkubiert. Er steht damit für die Transformation in kompetente Bakterien zur Verfügung.

Ligation-Reaktionsansatz

10 µl Ansatz:

1 µl 10 x Ligase-Puffer

1 µl T4-Ligase

6 µl Insert-DNA (100-200 ng)

2 µl pET-22b(+)-Vektor

Inkubation bei 16 °C über
Nacht

20 min Raumtemperatur

3.2.16.6 Transformation rekombinanter DNA

Es werden 50 bzw. 100 µl kompetenter Bakterienzellen auf Eis bereitgestellt und mit 3 µl (1-5 µl empfohlen, 2-10 ng DNA bzw. 50-200 ng Plasmid-DNA im Falle einer Retransformation) rekombinanter DNA versetzt. Nach 30 min Inkubationszeit auf Eis, bei der sich die DNA an die Bakterienzellwand anlagert, erfolgt ein 45-90 sec langer Hitzeschock bei 42 °C Wasserbadtemperatur und die sofortige Reposition auf Eis für weitere 2 min. Nach Zugabe von 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium werden die Zellen 1 Stunde bei 225 rpm und 37 °C im Schüttelinkubator angereichert. Hiernach werden jeweils 50 bis 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agar Platten (+100 µg/ml

Ampicillin) ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag stellen sich die Insert-tragenden Kolonien aufgrund der Blau-Weiß-Selektion weiß dar.

3.2.16.7 Selektion positiver Klone durch den Blau-Weiß-Test

Der Blau-Weiss-Test dient dazu, die Klone mit rekombinanten Plasmidvektoren von denen, die nur den Plasmidvektor enthalten, zu differenzieren. Er beruht auf der sogenannten α -Komplementierung des β -Galaktosidasegen *lacZ*. Bakterienstämme, die eine Mutation des *lacZ*-Gens aufweisen, können keine aktiven Tetramere der β -Galaktosidase bilden. Eine Komplementierung mit dem plasmidkodierten *lacZ* α -Peptid führt zur Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität β -Galaktosidase. Der Leserahmen des α -Peptids kann durch Insertion unterbrochen werden. Die Insert-tragenden Kolonien können demnach anhand ihrer mangelnden Enzymaktivität identifiziert werden, da sie das chromogene Substrat X-Gal nicht umsetzen. Sie bilden weiße Kolonien. Kolonien ohne Insert-tragenden Plasmidvektor präsentieren sich hingegen blau, denn sie exprimieren die β -Galactosidase. Die LB-Agarplatten, auf denen die Kultivierung der transformierten Bakterien erfolgt, müssen mindestens 0,5 Stunden vor dem Ausplattieren der Bakterien mit 10 μ l IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid, 100 mMol) und 40 μ l X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid, 20 mg/ml) bestrichen werden. Das Substrat X-Gal wird in Anwesenheit des Induktors IPTG durch das Enzym β -Galaktosidase zu einem blauen Produkt umgewandelt.

3.2.16.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Nach der Transformation werden die selektierten Kolonien „gepickt“ und zusammen mit 3 ml LB-Medium (mit 50 mg/ml Amp. versetzt) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend werden die Bakterienkulturen bei 3000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Mithilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) werden nach den Angaben des Herstellers geringe Mengen rekombinanter Plasmid-DNA aus den Bakterien-Pellets isoliert. Die Qiagen-Säulen enthalten ein Anionen-Austauschermaterial. Die in dem Zellysate enthaltene DNA bindet aufgrund ihrer negativen Ladung an das Anionen-Austauschmaterial in der Säule. Anschließend erfolgen die Elution der DNA in bidestilliertem Wasser und die Lagerung bei -20 °C. Die Konzentration der DNA-Lösung erfolgt spektralphotometrisch bei 260 nm. Die Plasmid-DNA kann sequenziert werden. Anschließend wird die Ligation mittels eines Kontroll-Restriktionsverdau und nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese (1 %)

überprüft. Dabei sollten sich eine Insert- und eine Vektorbande zeigen. Mittels Sequenzierung der purifizierten Vektorbande kann nochmalig die Herkunft des Inserts verifiziert werden.

3.2.17 RACE (rapid amplification of cDNA-ends)-PCR

Die Race-PCR wurde mit dem SMARTTM Race cDNA Amplification Kit (Clontech) anhand der Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese wurde 1 µg DNase-verdaute RNA eingesetzt. Anschließend erfolgt die first strand cDNA-Synthese jeweils gesondert für die 3'- und 5'-Race cDNA. Die cDNA-Produkte sind Ausgangsmaterial für die sich anschließende Amplifikation bei der 3'-Race-PCR bzw. 5'-Race-PCR.

3.2.17.1 3'-Race-cDNA-Synthese und 3'-Race-PCR

Die 3'-Race-PCR dient dazu, die Sequenz der gesuchten mRNA in Richtung 3'-Ende darzustellen. Die cDNA-Synthese wird mit einem im Kit gestellten 3'-RACE-Primer durchgeführt, dessen 5'-„Fragment“ aus einer bekannten Sequenz, SMART genannt, besteht und dessen 3'-Fragment“ ein Oligo-dT-Ende darstellt, das während der cDNA-Synthese an die potentielle PolyA⁺-Sequenz der mRNA bindet. Die cDNA wird mit einer reversen Transkriptase in 5'-3' Richtung synthetisiert. Dabei wird an die synthetisierte cDNA die zusätzliche SMART-Sequenz angefügt. Es schließt sich eine RT-PCR an, welche die synthetisierte cDNA als Template nutzt. Als Primer dient dabei einerseits ein UPM (Universal Primer Mix), der komplementär an die SMART-Sequenz bindet. Der zweite Primer ist ein genspezifischer Primer (GSP), der komplementär an eine ausgewählte Sequenz am 3'-Ende der cDNA bindet und spezifisch anhand der potentiellen Sequenz der mRNA konstruiert wurde. Während der RT-PCR wird die gesuchte mRNA mit dem GSP am 5' -Ende beginnend in Richtung 3'-Ende der mRNA synthetisiert.

3.2.17.2 5'-RACE-cDNA-Synthese und 5'-RACE-PCR

Die 5'-RACE-PCR verfolgt das Ziel, die Sequenz der gesuchten mRNA in 5'-Richtung darzustellen. Zunächst wird die cDNA mit einem Oligo-dT-Primer, der an die PolyA⁺-Sequenz der mRNA bindet, durch eine zugegebene reverse Transkriptase in 5'-3'-Richtung synthetisiert. Hat die reverse Transkriptase das 5'-Ende der mRNA erreicht, fügt sie komplementär dazu an das 3'-Ende der cDNA eine PolyC-Sequenz mittels

einer Funktion an, die terminale Transferase genannt wird. Dies ist notwendig, um später eine spezifische Sequenz zur Verfügung zu haben. Komplementär zu diesem Cytosinüberhang heftet sich an das 3'-Ende der mRNA wiederum ein definiertes bekanntes Oligonukleotid (SMART II genannt), das mit einer PolyG-Sequenz an die Cytosinabfolge der synthetisierten cDNA bindet. Die reverse Transkriptase nutzt wiederum die SMART II-Sequenz, die nun das 5'-Ende der mRNA darstellt und synthetisiert die cDNA komplementär zu dieser weiter. In der folgenden 5'-RACE-PCR wird nun abermals ein Universal Primer Mix (UPM) verwendet, der an das zur SMART II-Sequenz komplementäre 3'-Ende der cDNA bindet und den Beginn für die Amplifikation in 3'-Richtung darstellt. Der genspezifische Primer ist spezifisch komplementär zum 3'-Ende der synthetisierten cDNA bzw. identisch zum 5'-Ende der gesuchten mRNA konstruiert.

3.2.17.3 Nested RACE-PCR

Bei der nested RACE-PCR wurden ein genspezifischer nested Primer und ein nested UPM (Universal Primer Mix) eingesetzt. Für die nested RACE-PCR wurde das PCR-Produkt der RACE-PCR 1:10 verdünnt und davon 1 µl als Template eingesetzt.

3.2.17.4 RACE-PCR-Schema

Für die RACE-PCRs wurde folgendes „touchdown“ PCR-Schema angewandt, das auf die Taq-DNA-Polymerase von Roche abgestimmt war. Die Annealing-Temperaturen wurden entsprechend der eingesetzten genspezifischen Primer variiert.

RACE-PCR-Schema

5 Zyklen: 94 °C 30 sec
72 °C 3 min

5 Zyklen: 94 °C 30 sec
70 °C 30 sec
72 °C 3 min

25 Zyklen: 94 °C 30 sec
Annealing-Temp. 30 sec
72 °C 3 min

4 °C fortwährend

Nested RACE-PCR-Schema

15-30 Zyklen: 94 °C 30 sec
60 °C 30 sec
72 °C 3 min

1 Zyklus: 72 °C 10 min

4 °C fortwährend

3.2.18 Klonierung der RACE-PCR-Produkte in E. coli-Zellen

Die RACE-PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen und dargestellt. Anschließend wurden die selektierten PCR-Produkte (7 μ l) während der Ligation mithilfe der T4-Ligase mit dem pGemTeasy-Vektor verknüpft. Die bei der RACE-PCR genutzte RNA-Polymerase fügt während der Transkription eine PolyA⁺-Sequenz an, an die der hier genutzte pGemTeasy-Vektor mit einer Poly-T-Klonierungsstelle komplementär während der Ligation bindet. Es folgte die Hitzeschock-Transformation in die kompetenten DH5 α -E. coli-Bakterien. Rekombinante Klone wurden mittels der Blau-Weiß-Selektion und Kolonie-PCR identifiziert und über Nacht kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde aus den Bakterienzellen isoliert und sequenziert.

3.2.19 Kultivierung von E. coli

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide trugen eine Ampicillin-Resistenz. E. coli-Zellen wurden in Flüssigmedien (5 ml LB-Medium \pm Antibiotikum) bei 37 °C unter Schütteln bei 225 rpm über Nacht herangezogen. Dazu wurden 3 ml Kulturmedium mit E. coli-Kolonien (Einzelklone von Agarplatte) angeimpft.

3.3 BLAST-Analyse

Die BLAST (basic local alignment search tool)-Analyse (Altschul et al., 1990) wird verwendet, um DNA- oder Protein-Sequenzen mit bereits in einer Datenbank vorhandenen Sequenz zu vergleichen. Das Programm präsentiert dabei eine Reihe lokaler Alignments, das heißt Gegenüberstellungen von Stücken der gesuchten Sequenz mit ähnlichen Stücken aus einer Datenbank und gibt deren Signifikanz an.

4 Resultate

4.1 Expressionsanalyse der HERV-K-dUTPase

Wie in der Einleitung ausgeführt, konnte in Vorarbeiten ein Fragment einer humanen endogenen retroviralen dUTPase im PSORS1-Zielbereich um den Marker M6S168 auf dem Klon AC006048 zwischen nt20996 und nt25254 bei nt21082 identifiziert werden. Dieses entspricht dem offenen Leseraster ORF 23048, der gemäß der Sequenz des Referenzklons AC006048 mit einem Startcodon bei nt23048 (= 5618) entsprechend der Namensgebung der Primer) beginnt und bei nt23674 (= 6244) endet. Der ORF 23048 umfasst damit 626 Basen und eine putativ translatierte Aminosäure-Abfolge von 208 Aminosäuren. Gemäß der Aminosäuresequenz des ORF 23048 lokalisiert sich die HERV-K-dUTPase im Bereich der etwa 80. bis 185. putativ translatierten Aminosäure. Weiterhin konnten durch Sequenzierungsanalysen zwei Varianten („low risk“ und „high risk“) des HERV-K-dUTPase-Fragmentes identifiziert werden, die sich durch Einzelstrangpolymorphismen voneinander unterscheiden. Die korrespondierenden Aminosäure-Variationen zwischen dem HR- und LR-Haplotypenpool folgen direkt auf den Abbruch der Sequenzhomologie. Die Primärsequenz betrachtend lässt sich nicht vorhersagen, ob eine oder beide der PSORS1-dUTPase-Varianten enzymatisch aktiv sein könnten.

In Vorarbeiten wurde bereits die Expression eines 260-bp-Fragmentes des PSORS1-dUTPase-ORF in den peripheren mononukleären Zellen (PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cell) gesunder Probanden unter Anwendung einer nested PCR nachgewiesen. Der Nachweis der Expression des dUTPase-ORF in Vollblut von Psoriasis-Patienten sowie in Hautgewebeproben gelang bisher nicht und stellte ein Ziel dieser Arbeit dar.

4.2 Strategie zum Nachweis der Expression des HERV-K-dUTPase-ORF 23048

Die Abbildung 4.1 stellt die drei Polymerasekettenreaktionen dar, die den Bereich des dUTPase-ORF 23048 umfassen. Die 56-60-PCR wird mit dem Primerpaar 6 durchgeführt, das gemäß der Namensgebung der vorliegenden Arbeit aus dem 5600 forward- und 6062 reverse Primer besteht (erwartete Basenpaarlänge 462 bp). Auf dem Klon AC006048 befinden sich die Primerbindungsstellen bei nt23030 und nt23492. Die

60-64-PCR nutzt das Primerpaar 7, bestehend aus dem 6025 forward- und 6455 reverse Primer, das ein PCR-Produkt von 430 bp umfasst. Bei der 63-69-PCR wird das Primerpaar 8 verwendet, das aus dem 6363 forward- und 6987 reverse Primer zusammengesetzt ist und ein 624-bp-PCR-Produkt einschließt. Die Sequenz und Eigenschaften sämtlicher in der Arbeit erwähnter Primer sind im Material-Methoden-Teil aufgeführt. Ein sehr wesentlicher Aspekt der hier verwendeten Primerpaare ist, dass diese so ausgewählt sind, dass sie nicht an homologe Sequenzen anderer endogener Retroviren im Genom binden.

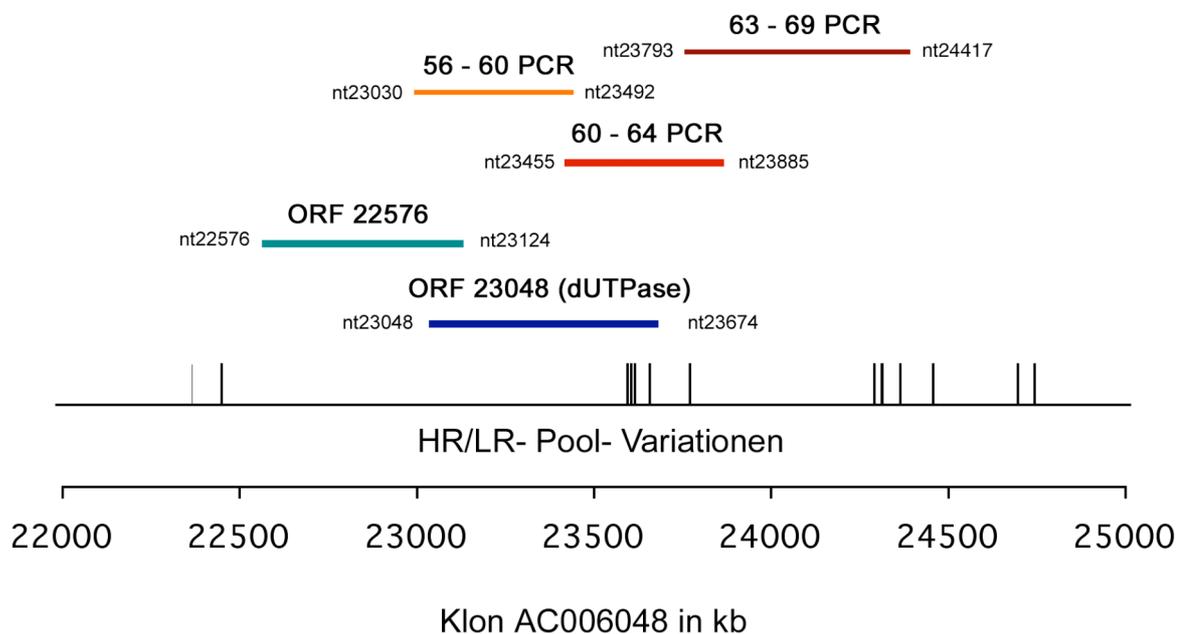


Abbildung 4.1: Spezifische Polymerasekettenreaktionen in Relation zu den offenen Leserastern (open reading frames, ORF) 22576 und 23048 und zu den Psoriasis-assoziierten Sequenzvariationen zwischen dem HR- und LR-Pool im 4,3-kb-Zielintervall

Dargestellt sind die Lage der identifizierten ORFs auf dem Klon AC006048 und die dazugehörigen PCR-Primerpaare der insgesamt zehn, den gesamten 4,3-kb-Zielbereich abdeckenden Primerpaare mit ihren Primerbindungsstellen im Klon AC006048. Im Verhältnis dazu sieht man die Positionen der Sequenzvariationen, welche durch Sequenzierung zwischen dem Hoch- und Niedrigrisikohaplotypen auf dem Klon AC006048 detektiert wurden.

4.2.1 Expression des dUTPase-ORF in den PBMCs einer Probandin

Für die Expressionsanalyse des dUTPase-ORF wurde zunächst das Primerpaar 7 genutzt. Da sich in Vorarbeiten kein Expressionsprodukt in der RT-PCR mit dem Primerpaar 7 gezeigt hatte, wurde das Amplifikationsprodukt als Template (Matrize) für

eine sogenannte *nested PCR* verwendet. Bei der nested PCR handelt es sich um eine ineinander geschachtelte PCR, bei der ein bereits amplifiziertes DNA-Fragment mittels eines zweiten Primerpaares ein weiteres Mal amplifiziert wird. Das zweite Primerpaar befindet sich dabei innerhalb des Reaktionsproduktes der primären PCR. Vorteil der nested PCR ist, dass auch geringste Mengen cDNA amplifiziert und darstellbar gemacht werden können - illegitime Transkription - genannt (Chelly et al., 1989). Die verwendeten nested Primer sind unspezifisch, liegen innerhalb des PCR-Produktes des Primerpaares 7 und werden N6025 forward und N6455 reverse (N 60-64 PCR) genannt. Die Anlagerungstemperatur der nested Primer ist höher als die der äußeren Primer, um eine unspezifische Bindung der äußeren Primer bei der nested PCR zu verhindern. Unter Anwendung der nested PCR konnte die Expression eines 260-bp-langen Fragmentes des HERV-K-dUTPase-ORF in den peripheren mononukleären Blutzellen einer gesunden Probandin nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.2). Folgend sollte geprüft werden, ob der HERV-K-dUTPase-ORF auch in psoriatischen Hautgewebeproben exprimiert wird.

4.2.2 Expression des dUTPase-ORF in läsionaler und nicht-läsionaler psoriatischer Haut

Ausgangsmaterial waren Gewebeproben läsionaler und nicht-läsionaler Haut von fünf Psoriasis-Patienten sowie eine Gewebeprobe gesunder Haut. Äquivalent zu dem Expressionsnachweis in den PBMCs wurde RNA aus der Haut extrahiert, die cDNA mittels einer reversen Transkriptase synthetisiert und eine RT-PCR durchgeführt. Unter Anwendung der 60-64-RT-PCR mit dem Primerpaar 7 gelang die Darstellung eines PCR-Produktes primär nicht. Daher wurde die nested-60-64-PCR mit dem nested Primerpaar 7 angeschlossen. Im Ergebnis ließ sich erstmalig in zwei läsionalen Hautgewebeproben zweier Patienten, einer nicht-läsionalen Hautgewebeprobe eines weiteren Patienten und in der Haut eines gesunden Probanden die Expression eines 260-bp-Fragmentes des dUTPase-ORF nachweisen (Abbildung 4.2 oben). Der Vergleich der Sequenzen der dargestellten Amplifikationsprodukte mit dem Referenzklon AC006048 auf Chromosom 6 ergab eine hundertprozentige Übereinstimmung. Sowohl in der Ziel-Transkript-PCR (Abb. 4.2 oben) als auch in der Kontroll-PCR mit β -Actin (Abb 4.2 unten) war kein Produkt nachweisbar, wenn bei der cDNA-Umschreibung keine reverse Transkriptase verwendet wurde. Dies zeigt, dass die amplifizierten Transkripte RNA-Spezies sind und keine genomischen DNA-

Fragmente darstellen. Somit bestätigen diese Daten, dass das retrovirale dUTPase-Fragment in vivo in Hautgewebeproben von drei unabhängigen Psoriasis-Patienten exprimiert wird.

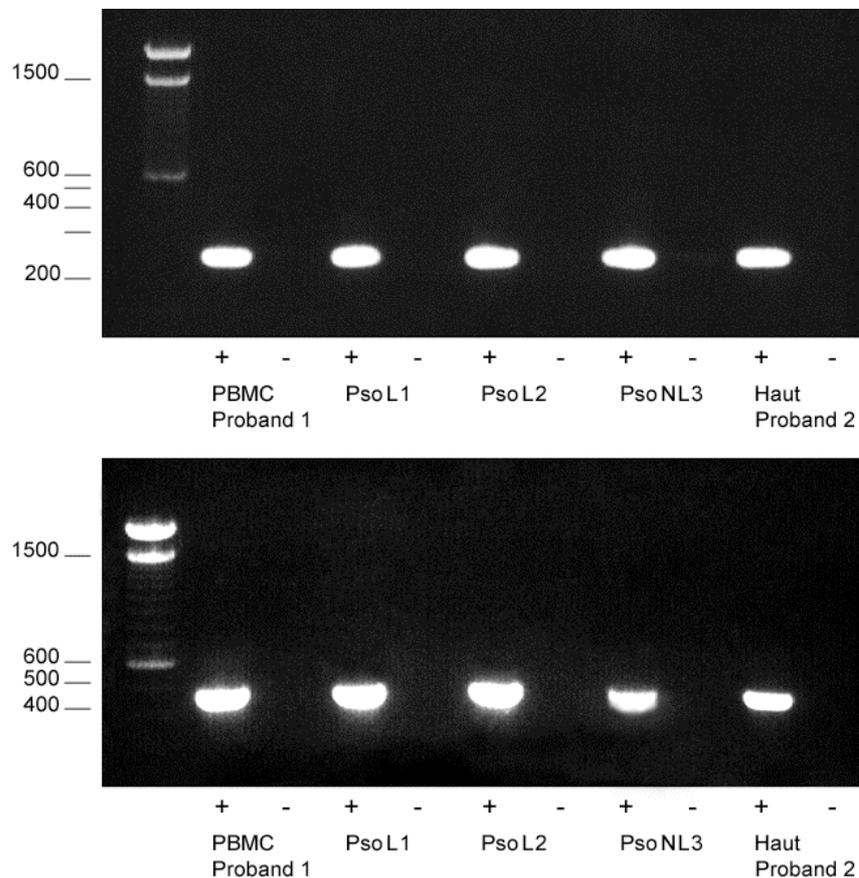


Abbildung 4.2: Expression des dUTPase-ORF (oben) und von β -Actin (unten) in psoriatischer und gesunder Haut sowie in PBMCs

Dargestellt ist die Expression des dUTPase-ORF in läsionalen und nicht-läsionalen Hautgewebeproben von Psoriasis-Patienten, in einer Hautgewebeprobe eines gesunden Probanden und in den PBMCs einer gesunden Probandin (oben). Hierbei wurde das nested Primerpaar 7 in der N6025-6455-PCR (erwartete Länge 260 bp) verwendet. Unten sind die entsprechenden cDNA-Kontrollen mittels der β -Actin-PCR (erwartete Länge 466 bp) abgebildet.

Legende: (+) Positivkontrolle = cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase, (-) Negativkontrolle = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, Pso = Psoriasis-Patient, L = läsional, NL = nicht-läsional

4.2.3 Expression des dUTPase-ORF unter Verwendung von PolyA⁺-mRNA

Die mRNA stellt einen Anteil von 1 % bis 5 % an der Gesamt-RNA dar und dient bei der Synthese der cDNA als Matrize. Würde man bei der Expressionsanalyse des HERV-K-dUTPase-ORF eine cDNA nutzen, bei deren Synthese ausschließlich die PolyA⁺-mRNA als Matrize diente, könnte dies als ein weiterer wichtiger Hinweis für die Existenz einer mRNA eines potentiell translatierten Gens gewertet werden. Die PolyA⁺-mRNA wurde daher aus der Gesamt-RNA, die zuvor aus den PBMCs einer gesunden Probandin extrahiert worden war, unter Verwendung des Oligotex mRNA Mini Kit von Qiagen isoliert. Dieser bedient sich des spezifischen Merkmals eines 20-250-Adenosin-Nukleotid-Endes von eukaryoter mRNA. Die tRNA und rRNA, die kein PolyA⁺-Ende aufweisen, werden dabei nicht erfasst. Es folgten die cDNA-Synthese, die isolierte mRNA als Matrize nutzend und anschließend die RT-PCR mit dem Primerpaar 7. Im Ergebnis zeigte sich erstmalig die Expression eines 430-bp-langen PCR-Fragmentes des HERV-K-dUTPase-ORF in den PBMCs einer gesunden Probandin ohne eine angeschlossene nested PCR (Abbildung 4.3 links). Dargestellt ist auch die Kontroll-PCR mit β -Actin (Abbildung 4.3 rechts). Dieser Befund legt nahe, dass der im Blut exprimierte retrovirale dUTPase eine mRNA zugrunde liegt.

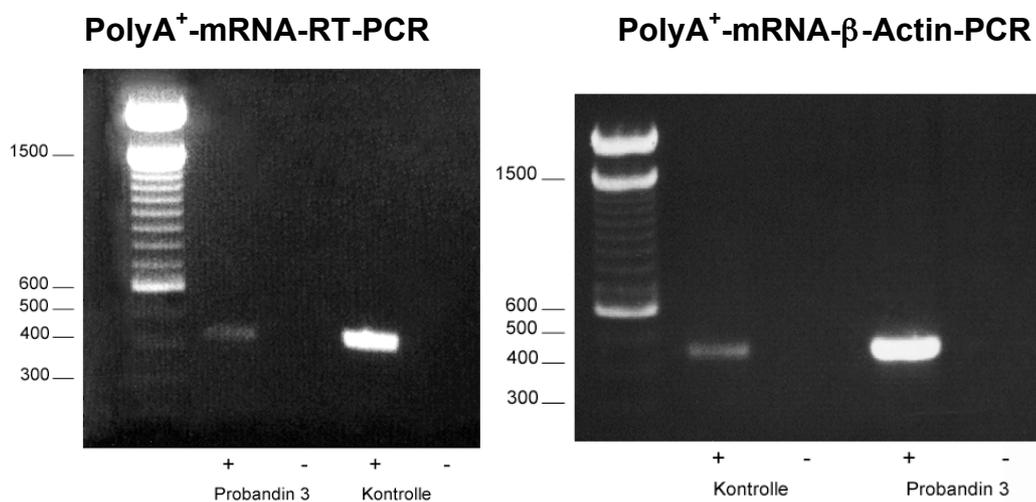


Abbildung 4.3: Expression der HERV-K-dUTPase (links) und von β -Actin (rechts) in den PBMCs einer gesunden Probandin

Für die cDNA-Synthese wurde ausschließlich PolyA⁺-mRNA als Matrize genutzt. Bei der Expression des HERV-K-dUTPase-ORF (links) wurde das Primerpaar 7 in der 60-64-RT-PCR (erwartete Länge 430 bp) verwendet. Rechts sind die entsprechenden cDNA-Kontrollen anhand der β -Actin-PCR (erwartete Länge 466 bp) abgebildet. Legende siehe Abbildung 4.2.

4.2.4 Etablierung eines RT-PCR-Assays aus Vollblut zum Nachweis PSORS1 assoziierter dUTPase-Fragmente in Einzelschritt-PCR

Im Verlauf der experimentellen Arbeit stellte sich die bis dato durchgeführte RNA-Isolation aus den PBMCs mittels des Trizol-Reagenz als zunehmend unzuverlässig dar, da die Ausbeute an RNA insbesondere in Hinblick auf die vermutlich schwache Expression des putativen Suszeptibilitätsgens gering war. Darüber hinaus offenbarte sich eine weitere Schwierigkeit. Der von uns definierte 4,3-kb-umfassende PSORS1-Zielbereich auf dem Chromosom 6 ist in seiner Struktur hoch redundant aufgebaut. Dies beruht darauf, dass die retroviralen Sequenzen Homologien zu einer Vielzahl genomischer Sequenzen in unserem gesamten Erbgut aufweisen. So waren im Verlauf einige nested-PCR-Amplifikate von psoriatischer Haut nicht zu unserer PSORS1-Zielregion zuzuordnen. Der Versuchsablauf musste daher mit dem Ziel eines höheren Maßes an Spezifität optimiert werden. Es schien wahrscheinlich, dass die Nutzung von unspezifischen nested Primern den Grad an Unspezifität erhöht. Demnach galt es, den Schritt der nested PCR zu umgehen und einzig mittels der RT-PCR die Expression des dUTPase-ORF nachzuweisen.

Die RNA-Isolation wurde dabei mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit aus Vollblut bewerkstelligt. Der Unterschied gegenüber der RNA-Isolation mit Trizol besteht darin, dass die RNA-Extraktion aus Vollblut auch die Granulozyten einschließt. Demgegenüber wird die Mehrheit der Granulozyten bei der PBMC-Isolation nicht isoliert und dementsprechend auch keiner RNA-Isolation unterzogen. Somit steigt der Anteil an isolierter RNA bei der Vollblut-RNA-Extraktion. Ein weiterer Aspekt ist die funktionelle Rolle der Granulozyten bei den pathophysiologischen Prozessen der Psoriasis. Darüber hinaus besteht bei dem RT-PCR-Assay aus Vollblut durch einen zweifachen integrierten DNase-Verdau ein doppelter Kontrollmechanismus zur Verhinderung genomischer Kontaminationen. Bei der sich anschließenden cDNA-Synthese werden anstelle von random hexamer Primer Oligo-dT-Primer verwendet, die selektiv an das PolyA⁺-Ende der mRNA hybridisieren. Als Negativkontrolle dient ein Ansatz, dem während der cDNA-Synthese das Enzym reverse Transkriptase nicht zugesetzt wurde. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend als Template für die RT-PCR mit dem Primerpaar 7 (6025 forward – 6455 reverse) verwendet.

4.2.5 Expression des dUTPase-ORF mittels der Einzelschritt-60-64-RT-PCR

Hierbei wurde erstmalig bei drei von vier Psoriasis-Patienten die Expression des 430-bp-60-64-PCR-Produktes des HERV-K-dUTPase-ORF in Vollblut nachgewiesen (Abbildung 4.4 oben).

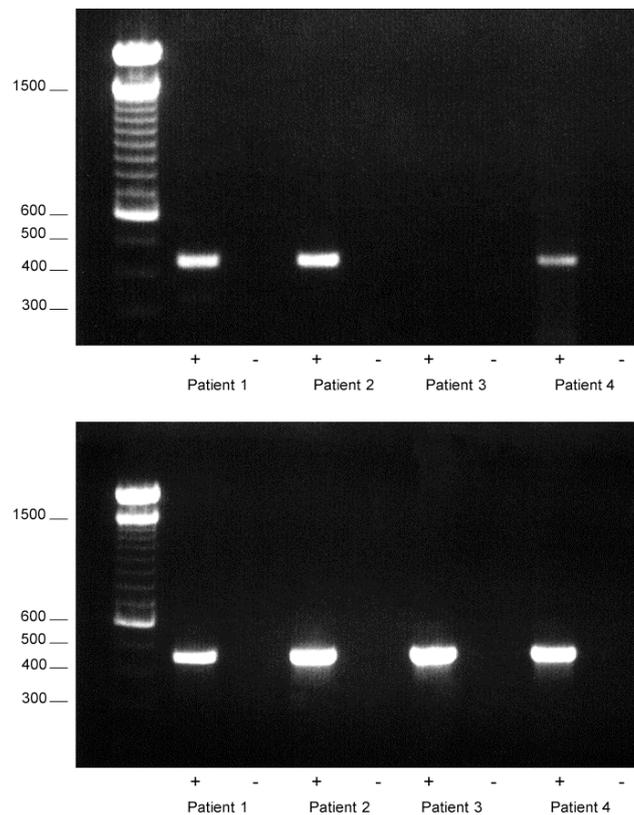


Abbildung 4.4: Expression des dUTPase-ORF mit der 60-64-Einzelschritt-RT-PCR (oben) und von β -Actin (unten) in Vollblut von Psoriasis-Patienten

Dargestellt ist die Expression des dUTPase-ORF in Vollblut von drei der vier untersuchten Psoriasis-Patienten (oben). Hierbei wurde der Versuchsablauf des RT-PCR-Assays aus Vollblut mit dem Primerpaar 7 in der 60-64-RT-PCR (erwartete Länge 430 bp) angewendet. Unten sind die entsprechenden cDNA-Kontrollen mittels der β -Actin-PCR (erwartete Länge 466 bp) abgebildet. Legende siehe Abbildung 4.2.

Die in Abbildung 4.4 benannten Patienten 1, 3 und 4 sind Typ 1-Psoriasis-Patienten, der Patient 2 ist ein Typ 2-Psoriasis-Patient. Alle PCR-Produkte wurden sequenziert, und ihre Sequenz mit dem Sequenzvergleichsprogramm BLAST dem Klon AC006048 zugeordnet. Die Expression von β -Actin konnte bei allen der eingesetzten cDNAs aufgezeigt werden (Abbildung 4.4 unten). Dies könnte als Hinweis dafür gewertet

werden, dass nicht alle an Psoriasis erkrankten Patienten die HERV-K-dUTPase im Blut exprimieren.

Vergleichend dazu wurde die Expression des 430-bp-60-64-PCR-Produktes des ORF 23048 bei gesunden Probanden untersucht. Alle getesteten gesunden Probanden exprimieren das 430-bp-PCR-Produkt des ORF 23048 (Abbildung 4.5 oben). Dargestellt ist auch die Kontroll-PCR mit β -Actin (Abbildung 4.5 unten).

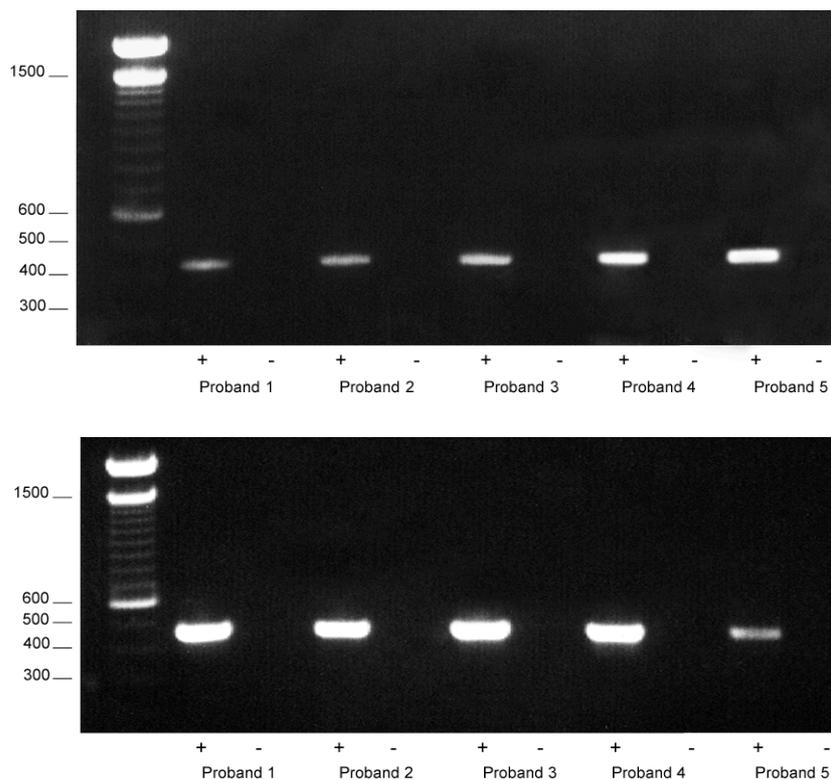


Abbildung 4.5: Expression des dUTPase-ORF mit der 60-64-Einzelschritt-RT-PCR (oben) und von β -Actin (unten) in Vollblut von gesunden Probanden

Dargestellt ist die Expression des dUTPase-ORF in Vollblut von fünf gesunden Probanden (oben). Hierbei wurde der Versuchsablauf des RT-PCR-Assays aus Vollblut mit dem Primerpaar 7 in der 60-64-RT-PCR (erwartete Länge 430 bp) angewendet. Unten sind die entsprechenden cDNA-Kontrollen mittels der β -Actin-PCR (erwartete Länge 466 bp) abgebildet. Legende siehe Abbildung 4.2.

Die RT-PCR-Produkte wurden sequenziert und wiesen die Sequenz des Referenzklons AC006048 auf. Diese Kontrolle ist in diesem Falle von extremer Wichtigkeit, da – wie bereits aufgeführt – aufgrund der weiten Verbreitung retroviraler Fragmente im

Resultate

menschlichen Genom, welche zum Teil über 90 % Homologie zueinander aufweisen, immer die Amplifikation eines exprimierten Produktes aus einer anderen genomischen Region möglich ist. Die folgende Abbildung 4.6 stellt die Sequenz des PCR-Amplifikates der 60-64-RT-PCR mit dem Primerpaar 7 der Probandin 2 dar. Alle schwarz markierten Sequenzen entsprechen Homologien von retroviralen Fragmenten anderer genomischer Regionen. Die Abbildung 4.6 zeigt eindeutig, dass das hier amplifizierte Produkt (rot) ausschließlich mit den blau markierten Klonen übereinstimmt, welche alle die PSORS1-Zielregion abdecken. Somit sind die dargestellten, mittels RT-PCR amplifizierten Produkte (Abbildungen 4.4 und 4.5) eindeutig in der PSORS1-Region kodiert.

```

      ZOKS 1      acaatacacataggggtcattgattcagattacaatggggaaattcaaattgttatatc 60
18250835 95051 ..... 94992
3924649 23470 ..... 23529
5926696 8209 ..... 8268
2401262 179379 ..... 179438
38141668 28970 ..... 28911
21212039 173372 ..... 173313
32400087 31075 ..... 31016
16418266 133024 .....a...c.....t 132965
20198582 7986 .....a..... 8045
12733668 92561 .....a...c.....c... 92619
22213300 58298 .....a.....t..a..... 58357
18873975 129980 .....a..... 129921
23304623 92382 .....a..... 92441
17975470 9430 .....a.....g..c... 9488
19774396 28752 .....a.....g..... 28811
11493240 119408 .....a.....c.....a..... 119465
19774362 57454 .....a.....g..... 57513
16931048 51250 .....a.....c.....g... 51191

      ZOKS 1      acaatacacataggggtcattgattcagattacaatggggaaattcaaattgttatatc 60
18250835 95051 ..... 94992
3924649 23470 ..... 23529
5926696 8209 ..... 8268
2401262 179379 ..... 179438
38141668 28970 ..... 28911
21212039 173372 ..... 173313
32400087 31075 ..... 31016
16418266 133024 .....a...c.....t 132965
20198582 7986 .....a..... 8045
12733668 92561 .....a...c.....c... 92619
22213300 58298 .....a.....t..a..... 58357
18873975 129980 .....a..... 129921
23304623 92382 .....a..... 92441
17975470 9430 .....a.....g..c... 9488
19774396 28752 .....a.....g..... 28811
11493240 119408 .....a.....c.....a..... 119465
19774362 57454 .....a.....g..... 57513
16931048 51250 .....a.....c.....g... 51191
```

Resultate

SNP143

1_19041	121	gtatgtggga-a-t--g-gg-aa <u>ga-gt</u> gaaattaa-caaacaggaggatttggaagca	172
18250835	94931	94880
3924649	23590	23641
5926696	8329	8380
2401262	179499	179550
38141668	28850a.....	28799
21212039	173252a.....	173201
32400087	30955a.....g.....	30904
16418266	132904a.a.....g.....	132852
20198582	8106	a.....g.....a.....tg....a..a.....	8158
12733668	92680a--a--a--g.....g.....	92732
22213300	58418c--a--a--a.....	58470
18873975	129860aa--g--a--t.....	129808
23304623	92502a--g--a--tg.....t.....	92554
17975470	9549a--a--a--g.....	9601
19774396	28872a--a--a--tg.....	28924
11493240	119526	a...a...a--ca--a--tg.....	119578
19774362	57574a--g--a--tg....t.....	57626
16931048	51130a--a--g.....	51078

SNP200

1_19041	173	caaataaacaag-gcaaa-acagcttattgggtgaa-tcaaattactgataaacgtccta	229
18250835	94879	94823
3924649	23642	23698
5926696	8381	8437
2401262	179551	179607
38141668	28798g.....	28742
21212039	173200g.....	173144
32400087	30903g.....	30847
16418266	132851a.....t.....	132795
20198582	8159a.....a.....	8215
12733668	92733a.....	92789
22213300	58471g.....a.....	58527
18873975	129807c-g.g.....a.....	129751
23304623	92555gt.....c.....	92611
17975470	9602g.....g.....	9658
19774396	28925g.....a.....t.....	28981
11493240	119579a--g.....a--g.g.....a.....	119635
19774362	57627	..g...t--g.....	57683
16931048	51077g.....a.....g.....	51021

1_19041	230	cctgtgaaataa----ctattcagggaagaaa-tg--t-aag-att-tggtagataca	279
18250835	94822	94773
3924649	23699	23748
5926696	8438	8487
2401262	179608	179657
38141668	28741	28692
21212039	173143	173094
32400087	30846	30797
16418266	132794t--g.....	132745
20198582	8216t--g.....	8265
12733668	92790g.....t--g.....	92839
22213300	58528t--g.....	58577
18873975	129750t--g.....	129701
23304623	92612	..t.....t--g.....	92661
17975470	9659a.....t--g.....g.....	9708
19774396	28982a.....t--g.....	29031
11493240	119636c.....t--g.....c	119685
19774362	57684t--g.....	57733
16931048	51020t--g.....	50971

wiederum eine variable Expression der HERV-K-dUTPase im Blut von Psoriasis-Patienten an. β -Actin wird von allen Patienten exprimiert (Abbildung 4.7 unten).

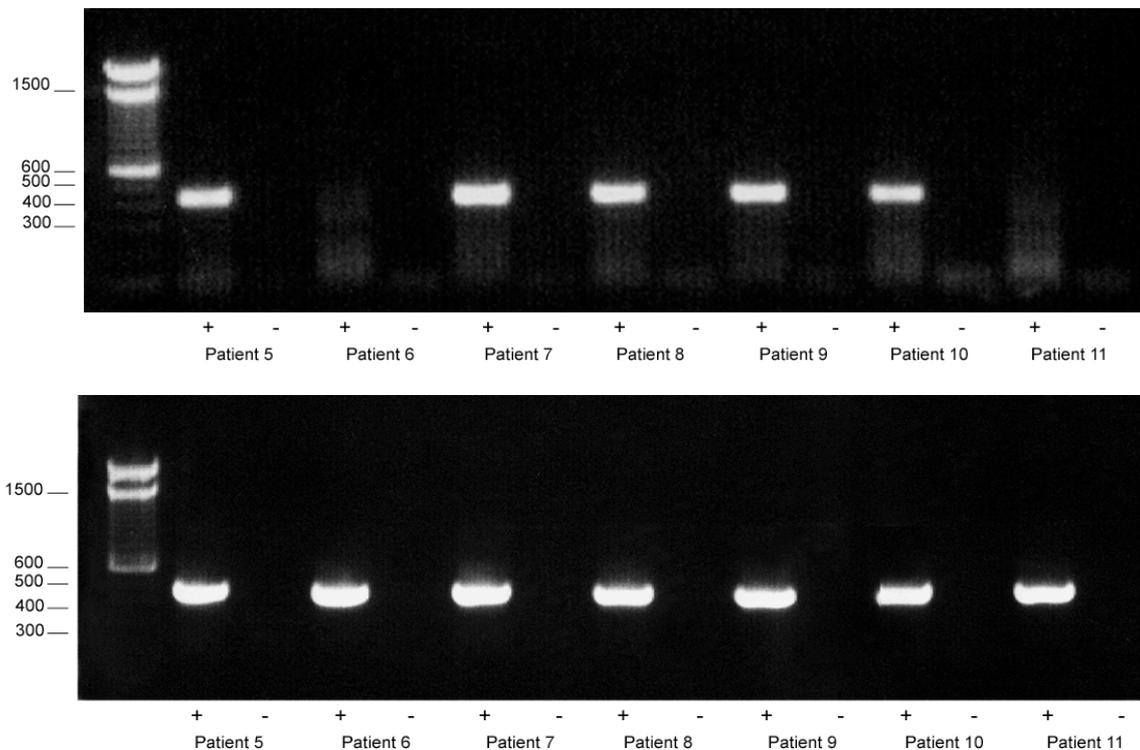


Abbildung 4.7: Expression des dUTPase-ORF mit der 60-64-Einzelschritt-RT-PCR (oben) und von β -Actin (unten) in Vollblut von Psoriasis-Patienten

Dargestellt ist die Expression des dUTPase-ORF in Vollblut einer größeren Psoriasis-Patienten-Kohorte (oben). Hierbei wurde der Versuchsablauf des RT-PCR-Assays aus Vollblut mit dem Primerpaar 7 in der 60-64-RT-PCR (erwartete Länge 430 bp) angewendet. Bei den Patienten 6 und 11 lässt sich die Expression des dUTPase-ORF nicht nachweisen. Unten sind die entsprechenden cDNA-Kontrollen mittels der β -Actin-PCR (erwartete Länge 466 bp) abgebildet. Legende siehe Abbildung 4.2.

4.2.6 Expression des dUTPase-ORF mittels der Einzelschritt-56-60-RT-PCR

Der ORF 23048 erstreckt sich von nt23048 bis nt23674 auf dem Klon AC006048. Das Primerpaar 7 erfasst dabei einen 430-bp-langen Bereich, beginnend bei nt23455 bis nt23885. Somit ließen die bisherigen Versuche offen, ob der gesamte Bereich der retroviralen dUTPase (ORF 23048) oder nur ein C-terminales Fragment in vivo exprimiert wird. Um diese Frage zu klären, wurde ein neues Primerpaar etabliert. Das Primerpaar 6, 5600 forward – 6062 reverse genannt, schließt sich in 5'-Richtung an das Primerpaar 7 an und hybridisiert bei nt23030 und nt23492 des Klons AC006048. Es erfasst damit die rund ersten 400 Basenpaare des ORF 23048 (Abbildung 4.8).

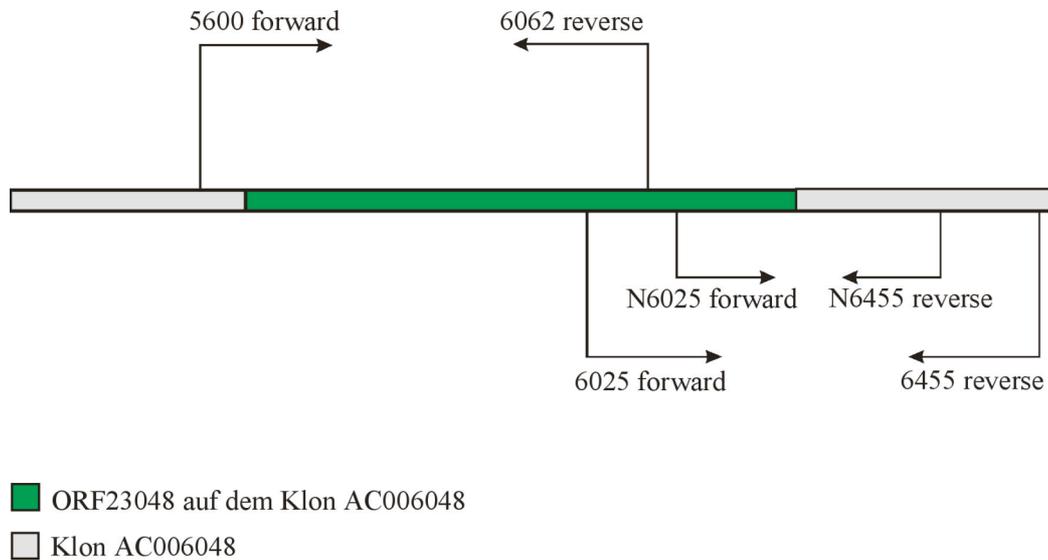


Abbildung 4.8: Lage der spezifischen Primerpaare im Verhältnis zum ORF 23048

Der grün dargestellte Abschnitt zeigt den ORF 23048 auf dem Klon AC006048. Im Verhältnis dazu sieht man die Primerpaare 6 (5600 forward – 6062 reverse) und 7 (6025 forward – 6455 reverse) sowie das dazugehörige nested Primerpaar N6025 forward – N6455 reverse.

Unter Anwendung des RT-PCR-Assays aus Vollblut mit dem Primerpaar 6 gelang es, die Expression des 462-bp-langen PCR-Fragmentes des dUTPase-ORF 23048 in Vollblut von Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden nachzuweisen. Das 56-60-PCR-Fragment wird inkonstant von sechs der 14 untersuchten Patienten bzw. vier der sechs untersuchten gesunden Probanden in Vollblut exprimiert (Abbildung 4.9 oben und mittig; nicht alle dargestellt). Fünf der sechs positiv exprimierenden Psoriasis-Patienten gehören per definitionem der Typ 1-Psoriasis an (siehe Tabelle 4.1). β -Actin wird von allen untersuchten Patienten und Probanden exprimiert (siehe Abbildungen zuvor). Dargestellt sind die β -Actin-PCR-Produkte jener Patienten und Probanden, die kein nachweisbares 50-56-PCR-Amplifikat aufweisen (Abbildung 4.9 unten). Darüber hinaus gelang der Nachweis des 56-60-PCR-Fragmentes in Vollblut der Probandin 3 mittels einer RT-PCR, bei der ausschließlich eine die mRNA als Matrize nutzende synthetisierte cDNA als Template diente (nicht abgebildet). Insgesamt deuten diese Resultate daraufhin, dass die Gesamtlänge des dUTPase-Fragmentes interindividuell verschieden sein kann bzw. ein heterogener Transkriptionsbeginn bei dem ORF 23048 vorliegt, was ebenfalls zu biologisch unterschiedlichen Funktionen der jeweils

transkribierten Produkte beitragen könnte.

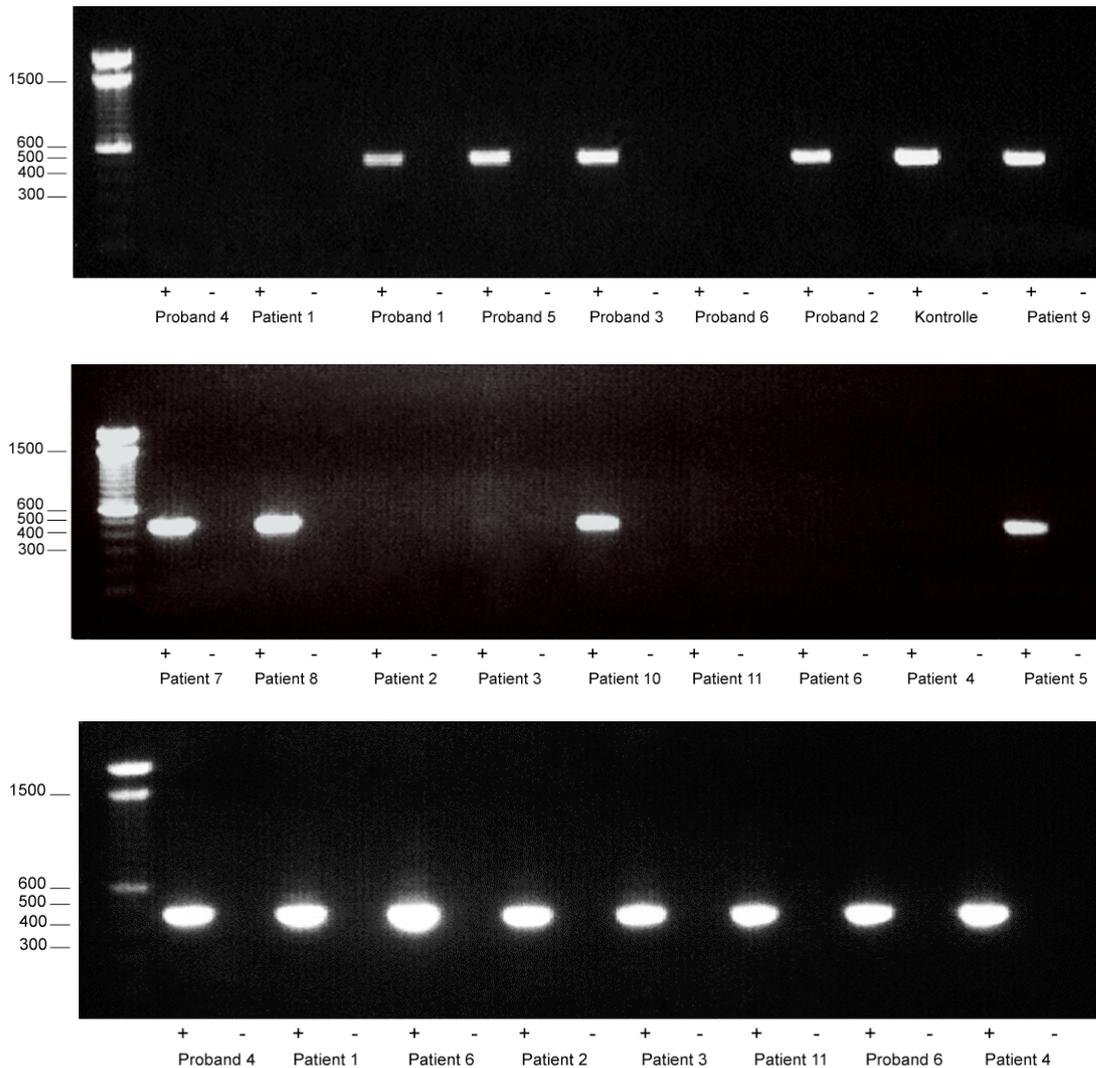


Abbildung 4.9: Expression des dUTPase-ORF 23048 mit der 56-60-Einzelschritt-RT-PCR (oben und mittig) und von β -Actin (unten) in Vollblut von Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden
 Dargestellt sind die PCR-Produkte des RT-PCR-Assays aus Vollblut mit dem Primerpaar 6 in der 56-60-RT-PCR (erwartete Länge 462 bp) von elf Psoriasis-Patienten und sechs gesunden Probanden (oben und mittig). Sechs der insgesamt 14 untersuchten Psoriasis-Patienten und vier der sechs gesunden Probanden exprimieren das 56-60-RT-PCR-Produkt (oben und mittig). Unten sind die entsprechenden cDNA-Kontrollen mittels der β -Actin-PCR (erwartete Länge 466 bp) der Patienten und Probanden abgebildet, die das 56-60-PCR-Produkt des dUTPase-ORF 23048 nicht exprimieren. Legende siehe Abbildung 4.2.

4.2.7 Expression des 3'-Endes des HERV-K-dUTPase-ORF

Bis dato war es gelungen, die Expression des dUTPase-ORF 23048 auf dem Klon AC006048 des Chromosoms 6 in dem Bereich von nt23030 bis nt23885 aufzuzeigen. Die Länge der potentiellen mRNA unseres vorgeschlagenen PSORS1-Suszeptibilitätsgens war nicht bekannt. Im 3'-Bereich des ORF 23048 befinden sich mehrere potentielle PolyA⁺-Sequenzen. Für die Untersuchung dieses Bereiches wurden die aus Vollblut anhand der extrahierten RNAs synthetisierten cDNAs in einer RT-PCR mit dem Primerpaar 8, genannt 6363 forward – 6987 reverse, eingesetzt. Der forward Primer hybridisiert bei nt23793, der reverse Primer bei nt24417 des Klons AC006048. Hierbei zeigte sich im Ergebnis, dass alle sechs untersuchten Probanden und 13 untersuchten Psoriasis-Patienten (nicht alle dargestellt) dieses Fragment in Vollblut exprimieren (Abbildung 4.10). Alle PCR-Produkte wurden sequenziert und ihre Sequenz dem PSORS1-Locus zugeordnet. Die entsprechenden Kontrollen der cDNAs mit β -Actin sind bereits zuvor aufgeführt.

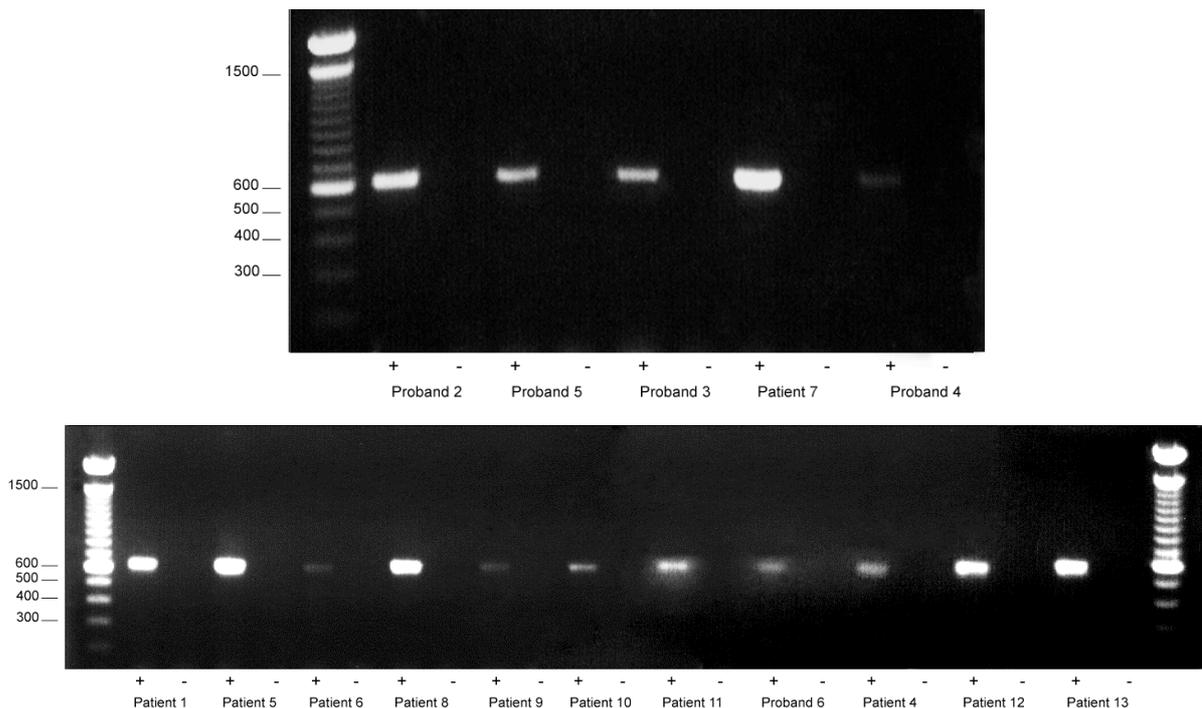


Abbildung 4.10: Expression des 3'-Endes des dUTPase-ORF 23048 in Vollblut von Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden

Dargestellt ist die Expression des 63-69-RT-PCR-Produktes (erwartete Länge 624 bp) in Vollblut von elf Psoriasis-Patienten und fünf gesunden Probanden. Hierbei wurde der Versuchsablauf des RT-PCR-Assays aus Vollblut mit dem Primerpaar 8 in der 63-69-RT-PCR (erwartete Länge 624 bp) angewendet. Legende siehe Abbildung 4.2.

Die in Abb. 4.10 gezeigten Daten dokumentieren, dass im Unterschied zum putativ interindividuell unterschiedlichen Transkriptionsstart, die C-terminale Länge der dUTPase einheitlich zumindest die mit diesem Primerpaar erfasste putativ erkannte PolyA⁺-Sequenz umfasst. Anzumerken ist, dass sich im 3'-Bereich des dUTPase-ORF auf dem Klon AC006048 ein weiteres offenes Leseraster namens ORF 24019 befindet. Dieser erstreckt sich von nt24019 bis nt24441. Dies entspricht einer Basenpaarlänge von 422 bp und einer putativ translatierten Aminosäureabfolge von 140 Aminosäuren. Gemäß der Aminosäuresequenz wird in dem Bereich der 94. bis ca. 135. putativ translatierten Aminosäure eine reverse Transkriptase ausgebildet.

4.2.8 Expression der dUTPase-ORF-Einzelschritt-RT-PCR-Fragmente unter Verwendung von PolyA⁺-mRNA

Die folgende Abbildung dokumentiert die Einzelschritt-PCRs 56-60, 60-64 und 63-69 zum Nachweis der PSORS1-assoziierten-dUTPase-Fragmente in Vollblut einer gesunden Probandin (Probandin 1) mit den Primerpaaren 6, 7 und 8 unter Verwendung von isolierter PolyA⁺-mRNA als Matrize für die first strand cDNA-Synthese (Abbildung 4.11). Somit lässt sich die Expression des gesamten ORF 23048 und des sich anschließenden 3'-Endes nur anhand von PolyA⁺-mRNA als Ursprung nachweisen, was für die Existenz einer mRNA eines potentiell translatierten Gens der HERV-K-dUTPase spricht.

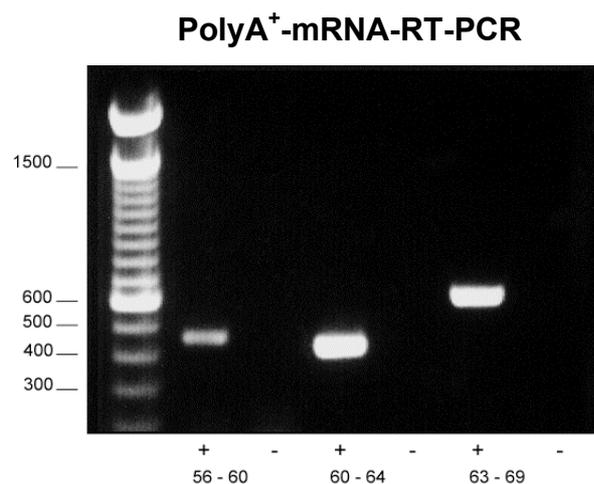


Abbildung 4.11: Expression PSORS1-assoziiierter dUTPase-Fragmente mit der 56-60-RT-PCR (erwartete Länge 462 bp), 60-64-RT-PCR (erwartete Länge 430 bp) und der 63-69-RT-PCR (erwartete Länge 624 bp) in Vollblut der gesunden Probandin 1

Für die cDNA-Synthese wurde die PolyA⁺-mRNA als Matrize benutzt. Legende siehe Abbildung 4.2.

Die gesunde Probandin exprimiert alle untersuchten PCR-Fragmente, wobei die Ausprägung der Banden eine schwächere Expression des 56-60-PCR-Produktes gegenüber einer deutlich stärkeren Expression des 60-64- und 63-69-PCR-Produktes andeutet.

4.2.9 Häufigkeitsverteilung der Einzelschritt-RT-PCR-Expressionen

Die folgende Tabelle 4.1 präsentiert im Überblick die Resultate der Polymerasekettenreaktionen mit den Primerpaaren 6, 7 und 8 aller untersuchten Patienten und gesunden Kontrollprobanden zur Expressionsanalyse PSORS1-assoziiertes dUTPase Fragmente in Vollblut auf dem Chromosom 6.

HERV-K-dUTPase-Einzelschritt-PCRs im Überblick

Patientennummer	Psoriasis Typ 1/2	56-60 PCR	60-64 PCR	63-69 PCR
1	1	-	+	+
2	2	-	+	/
3	1	-	-	+
4	1	-	+	+
5	1	+	+	+
6	1	-	-	+
7	1	+	+	+
8	1	+	+	+
9	2	+	+	+
10	1	+	+	+
11	2	-	-	+
12	1	-	+	+
13	1	-	+	+
14	1	+	+	+
Probandennummer				
1		+	+	+
2		+	+	+
3		+	+	+
4		-	+	+
5		+	+	+
6		-	+	+

Tabelle 4.1: Dargestellt sind die Expressionsergebnisse der 56-60-PCR, 60-64-PCR und 63-69-PCR bei allen analysierten Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden

Legende: (+) positive Expression des PCR-Produktes; (-) keine Expressionsbande des PCR-Produktes nachweisbar; (/) PCR nicht durchgeführt.

Hierbei fällt auf, dass sowohl das 56-60-PCR-Produkt als auch das 60-64-PCR-Produkt inkonstant in Vollblut der untersuchten Probanden und Patienten exprimiert wird. Das 63-69-PCR-Fragment wird hingegen von allen untersuchten Patienten und gesunden Probanden exprimiert. Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der PCR-Expressionen zwischen Typ 1- und Typ 2-Psoriasis-Patienten ist nicht festzustellen. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass der fehlende Nachweis einzelner PCR-Fragmente technisch durch limitierte Sensitivität der PCR bedingt ist - insbesondere für das mittlere Primerpaar 60-64 - scheint bei 50 % der hier analysierten Proben ein N-terminal längeres Fragment vorzuliegen (50-56-PCR positiv). Ob diese Verteilung zwischen gesunden Probanden versus Psoriasispatienten Unterschiede aufweist, muss in nachfolgenden Studien anhand größerer Kohorten geklärt werden.

4.2.10 Expression des PSORS1-assoziierten 1400-bp-dUTPase-Fragmentes

Unter Anwendung der 56-60-PCR, 60-64-PCR und 63-69-PCR war es gelungen, die Expression des 462-bp-, 430-bp- bzw. 624-bp-umfassenden PCR-Produktes der PSORS1-assoziierten-dUTPase-Fragmente des ORF 23048 und der sich anschließenden Region in 3'-Richtung aufzuzeigen. Unklar war, ob sich die Expression des gesamten Bereichs mit nur einer Polymerasekettenreaktion darstellen ließe. Dieser Ansatz würde insbesondere gegen eine unterschiedliche Empfindlichkeit des Nachweises einzelner interner Fragmente sprechen. Dazu wurden die cDNAs zweier Typ 1-Psoriasis-Patienten (Patienten 5 und 7) ausgewählt, die in allen Einzelschritt-PCR-Reaktionen eine Expression gezeigt hatten.

4.2.10.1 Design der spezifischen Primerpaare für das 1400-bp-Fragment

Zur Eingrenzung der 1400-bp-Zielregion wurden entsprechende Primer konstruiert, die spezifisch für den redundant aufgebauten PSORS1-Locus sein mussten (Tabelle 4.2). Das Primerpaar 5600 forward – 6987 reverse wurde aus den bereits in Vorarbeiten entworfenen zehn spezifischen Primerpaaren zusammengestellt. Das Primerpaar 5593 forward – 6962 reverse wurde unter Einbeziehung von GC-Gehalt, Annealingtemperatur und Spezifität per Hand entworfen. Die Primerpaare wurden anschließend mit dem Sequenzvergleichs-Programm BLAST (basic local alignment search tool) auf ihre Spezifität hin überprüft.

Name	Sequenz	Annealing- temperatur	PCR- Produkt
5600 forward	5'-GTT TTA ACT GTT TGA AGC ATG ATC AC-3'	57 °C	1387 bp
6987 reverse	5'-CCT TCC TGG CTG TAA TGC TCC T-3'		
5593 forward	5'-GGA GCT TGT TTT AAC TGT TTG AAG C-3'	58 °C	1369 bp
6962 reverse	5'-GCT TGT ATA ACT GAA TTA ATG GCT CCT-3'		

Tabelle 4.2: Spezifische Primerpaare für das 1400-bp-Fragment

Aufgelistet sind die Namen der einzelnen Primer, die Sequenz, Annealingtemperatur der PCR-Reaktion und die Länge des erwarteten PCR-Produktes.

4.2.10.2 56-69-PCR

Die cDNA des Typ 1-Psoriasis-Patienten 5 wurde in der 5593-6962-PCR als DNA-Matrize eingesetzt und amplifiziert. Die cDNAs des Typ 1-Psoriasis-Patienten 7 und der gesunden Probandin 2 wurden in der 5600-6987-PCR als DNA-Matrize eingesetzt und amplifiziert. Die PCR-Bedingungen entsprachen denen der Einzelschritt-PCRs. Im Ergebnis zeigte sich erstmalig die Expression eines rund 1400-bp-langen PCR-Fragmentes unserer PSORS1-Zielregion auf dem Chromosom 6 in Vollblut von zwei Typ 1-Psoriasis-Patienten (Abbildung 4.12). Dieser exprimierte Bereich schließt den gesamten ORF 23048 mit der HERV-K-dUTPase und den sich anschließenden 3'-Bereich ein. Die Expression 5600-6987-PCR-Produktes der Probandin 2 in Vollblut ist äußerst schwach ausgeprägt. Die 1400-bp-PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert, und ihre Sequenz mit dem Sequenzvergleichsprogramm BLAST dem Klon AC006048 des Chromosoms 6 zugeordnet. Auch in diesem Experiment zeigt das Fehlen eines Amplifikates in den Proben ohne reverse Transkriptase-Behandlung, dass die nachgewiesenen Banden nicht genomischer DNA-Kontamination entsprechen. Insgesamt liefert dieser Versuch eine unabhängige Bestätigung des Expression der retroviralen dUTPase in vivo.

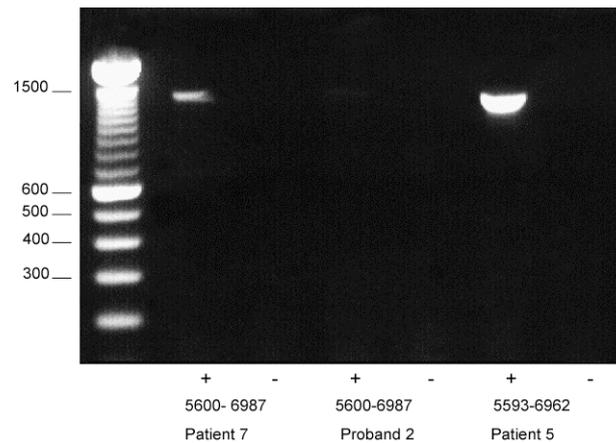


Abbildung 4.12: Expression des rund 1400-bp-umfassenden PSORS1-assoziierten dUTPase-Fragmentes in Vollblut der Typ 1-Psoriasis-Patienten 5 und 7 sowie der gesunden Probandin 2

Hierbei wurde der Versuchsablauf des RT-PCR-Assays aus Vollblut mit den in der Abbildung aufgeführten Primerpaaren angewendet. Legende siehe Abbildung 4.2.

4.3 Klonierung des 1400-bp-PCR-Fragmentes in *E. coli*

Psoriasis-Patienten hatten im Serum eine erhöhte IgG-Antikörperantwort gegen die MLV (*murine leukemia virus*)-like-HERVs gegenüber gesunden Kontrollen aufgewiesen (Molès et al., 2003). Dies wurde als indirekter Hinweis transkriptioneller Aktivität von Retroviren mit der Entstehung immunogener Epitope gewertet (Molès JP et al., 2003). In Anlehnung an diese Arbeit stellte sich die Frage, ob auch die HERV-K-dUTPase als ein immunogenes Epitop agieren könnte. Dafür musste der dUTPase-ORF 23048 kloniert und für derartige Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden. Das entsprechende Fragment des rund 1400-bp-PCR-Produkts wurde als Insert in dem pET-22b(+)-Vektor integriert in eine *E. coli*-Bakterienpopulation eingebracht (Transformation). Im Anschluss wurde der rekombinante Vektor durch diese Bakterienpopulation während der Kultivierung vervielfacht (Klonierung). Für dieses Experiment wurde das 1387-bp-PCR-Produkt des Typ 1-Psoriasis-Patienten 7 ausgewählt.

4.3.1 Design der Restriktionsendonuklease-Primer

Für die Ligation, bei der Vektor und Insert verknüpft werden, mussten die Enden von Vektor und PCR-Fragment kompatibel gestaltet werden. Dafür werden sie von den gleichen zwei Restriktionsendonukleasen geschnitten, womit dieselbe Art von Enden erzeugt wird. In einer PCR mit Primern, deren Sequenzen die Schnittstellensequenz für

die Restriktionsenzyme beinhalten, wird die Ziel-DNA amplifiziert. Dabei werden die Sequenzen der Schnittstellen der ausgewählten Restriktionsenzyme mit dem Ziel-DNA-Fragment verknüpft. In der „multiple cloning side“ des Vektors pET-22b(+) wurden die Restriktionsenzyme Xho1 und Sac 1 ausgewählt und zwei zugehörige Primer entworfen. Die Primer bestehen aus der Restriktionsenzym-Schnittstellensequenz, einer jeweils zu einem der beiden Enden des PCR-Fragmentes komplementären Sequenz und einem aus wenigen Basen bestehenden Überhang. Von dem 1387-bp-langen PCR-Fragment sollte lediglich der Bereich des ORF 23048, der sich auf dem Klon AC006048 von nt23048 bis nt23674 erstreckt, kloniert werden. Gemäß der Namensgebung für die spezifischen Primer, bei der nt17430 am 5'-Ende des Klons AC006048 den Nullpunkt darstellt, erstreckt sich der ORF 23048 von 5618 am 5'-Ende bis 6244 am 3'-Ende. Innerhalb des 1387-bp-PCR-Fragmentes, welches das amplifizierte Intervall zwischen nt23030 und nt24417 darstellt, positioniert sich der sac1-5785-5'-forward Primer bei nt23215 (entspricht 5785) und der reverse Primer bei nt23671 (entspricht 6241). Das dabei resultierende, zu klonierende 456-bp-PCR-Fragment beginnt damit bei dem 2. Startcodon ATG im ORF 23048 und schließt die HERV-K-dUTPase ein, die sich in dem 208 Aminosäuren-umfassenden ORF von der 85. bis ca. 185. Aminosäure erstreckt.

Sac1-5785-5' forward Primer	Annealingtemperatur: 54,5 °C
------------------------------------	------------------------------

5'-cta tga gct caa aca cca tga ggg gcc cat -3'

<i>Überhang Sac1 PCR-Fragment komplementäre Sequenz</i>

Xho1-6241-3' reverse Primer	Annealingtemperatur: 59,35 °C
------------------------------------	-------------------------------

5'-cta tct cga gcc caa taa gct gtt ttg cc -3'
--

<i>Überhang Xho1 PCR-Fragment komplementäre Sequenz</i>

4.3.2 Sac1-5785-Xho1-6241-PCR

Während der sich anschließenden Sac1-5785-Xho1-6241-PCR wurde das 456-bp-Ziel-Fragment amplifiziert und mit den Sequenzen der Schnittstellensequenzen der Restriktionsenzyme verknüpft.

4.3.3 Restriktionsverdau – Ligation – Transformation

Bei dem Restriktionsverdau mit Xho1 und Sac1, die den Restriktionsendonucleasen vom Typ II angehören, wurden sowohl der Vektor pET-22b(+) als auch das 456-bp-Ziel-DNA-Fragment an den spezifischen Schnittstellen geschnitten. Dabei wurde dieselbe Art kohäsiver Enden erzeugt, die sich bei der darauf folgenden Ligation mithilfe des Enzyms T4-Ligase miteinander verknüpfen lassen. Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli*-Bakterien namens „One Shot®Top10 competent cells“. Die positiven Klone wurden unter Anwendung des Blau-Weiß-Tests selektioniert. Nach Kultivierung der selektionierten Klone in einem Schüttelinkubator wurde die Plasmid-DNA isoliert. Anschließend erfolgte mit einem Kontroll-Restriktionsverdau und nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese (1 %) die Überprüfung der Ligation. Bei neun von zehn selektionierten Klonen zeigten sich sowohl eine Insert- als auch eine Vektorbande (nicht dargestellt). Die isolierten Plasmid-DNAs dieser neun Klone wurden sequenziert und die Zugehörigkeit zum Klon AC006048 verifiziert.

4.4 Analyse putativer regulatorischer Elemente der Expression des ORF 23048

Für die Initiierung der mRNA-Transkription benötigt die RNA-Polymerase II entweder eine TATA-Box als Bestandteil der Promotorregion oder funktionell äquivalente Ersatzstrukturen in der genomischen Sequenz. Unsere Arbeitsgruppe identifizierte keine intakten LTRs des ehemaligen HERV-K-Retrovirus, die als Promotor der dUTPase-Sequenz fungieren könnten. Dagegen wurden jedoch putative TATA-Boxen gesehen (Abbildung 4.13). Zudem konnte eine DNA-Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor IRF3 identifiziert werden. Dabei handelt es sich um einen die Regulation der Interferon-Produktion beeinflussenden Transkriptionsfaktor. Weiterhin fanden sich putative PolyA⁺-Sequenzen im 3'-Bereich der dUTPase bei nt24520, nt25459 und nt25749. Bei PolyA⁺-Sequenzen handelt es sich um eine Kette von Adenin-Nukleotiden, die an das Ende von eukaryontischen mRNA-Molekülen angehängt werden. Dieses Polyadenylende wird von dem Enzym PolyA⁺-Polymerase während der Prozessierung der prä-mRNA im Zellkern mit dem 3'-Ende der mRNA verknüpft. Dieser Vorgang wird als Polyadenylierung und eine solche mRNA als PolyA⁺-mRNA bezeichnet. Die Länge der PolyA⁺-Sequenz variiert dabei von Gen zu Gen. Üblicherweise findet man etwa 150 bis 200 Nukleotide. Die PolyA⁺-Sequenz wird vom PolyA⁺-Bindungsprotein erkannt und ist notwendig für die Initiation der Translation. Zusätzlich schützt es die mRNA vor schnellem Abbau. Im 5'-Bereich wurde bei nt22279

eine putative Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie identifiziert, die sogenannte c-Rel site. Bei der NF- κ B-Familie handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Apoptose-relevanten Genen sowie die transkriptionelle Regulation von Zellzyklus-Proteinen steuern. C-Rel stellt dabei ein Mitglied dieser Familie dar.

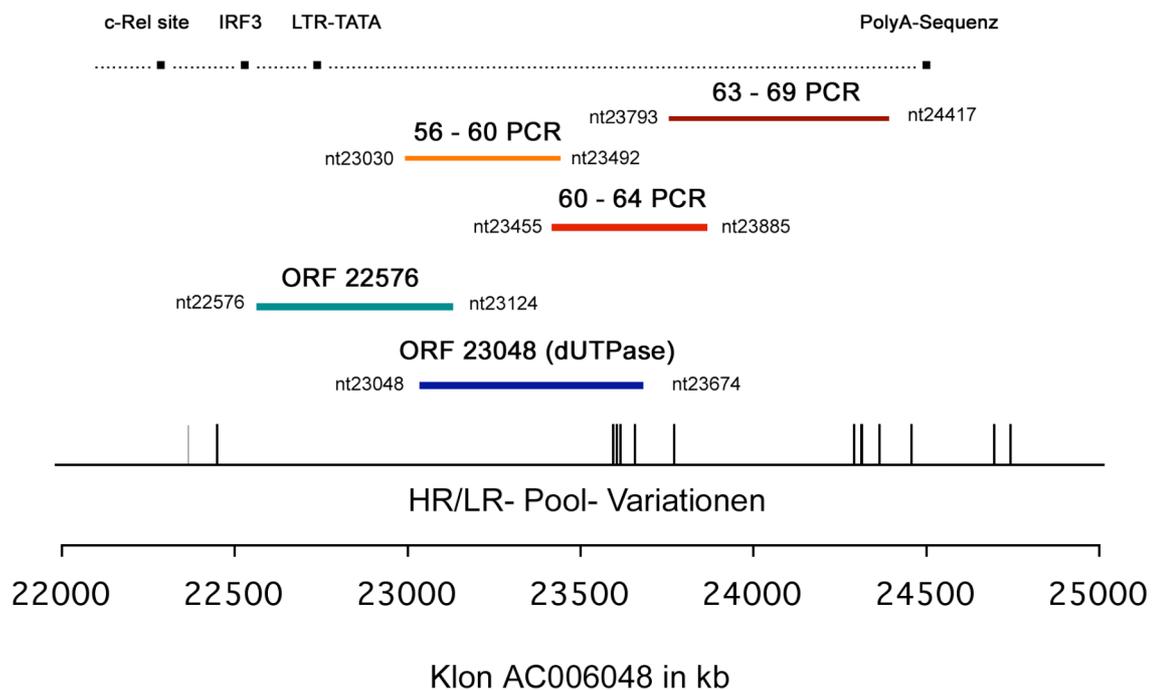


Abbildung 4.13: Putative regulative Elemente der exprimierten HERV-K-PSORS1-dUTPase

Dargestellt sind die putativen regulativen Elemente IRF3, TATA-Box und PolyA⁺-Sequenz in Relation zu den PCR-Fragmenten, den identifizierten ORFs und den Positionen der Unterschiede zwischen dem Hoch- und Niedrigrisikohaplotypen auf dem Klon AC006048.

4.5 RACE (rapid amplification of cDNA ends)-PCR

Aufgrund der bisher dargestellten Ergebnisse stellte sich die Frage nach der exakten C-terminalen Begrenzung des identifizierten dUTPase-Fragmentes. Der Klärung dieser Frage sollte die sogenannte RACE-PCR dienen. Die RACE-PCR bezeichnet eine Methode zur Verlängerung von kurzen cDNA-Fragmenten für die Rekonstruktion einer vollständigen cDNA (Frohmann et al., 1988). Ausgehend von einer bekannten Sequenz in der kodierenden Region des Transkripts werden das 5'-Ende und 3'-Ende der mRNA rekonstruiert. Dabei werden auch die nicht-kodierenden, jedoch regulativen Sequenzen

wie die untranslatierten Regionen erfasst. Der genaue Versuchsablauf ist ausführlich im Kapitel 3 „Material und Methoden“ beschrieben.

4.5.1 Primerdesign der genspezifischen Primer für die RACE-PCR

Die genspezifischen Primer mussten bestimmte Anforderungen erfüllen. Sie sollten ca. 23 bis 28 Nukleotide lang sein, einen GC-Gehalt von 50 bis 70 % und eine Annealingtemperatur von über 65 °C aufweisen. Bei einer Annealingtemperatur der genspezifischen Primer von über 70 °C war es möglich, eine Touchdown-PCR durchzuführen. Bei der Touchdown-PCR werden während der initialen PCR-Zyklen höhere Annealingtemperaturen als die des „Universal Primer Mix“ eingestellt. Somit erfolgt primär nur eine genspezifische Synthese. Im Verlauf der PCR wird die Annealingtemperatur langsam bis auf die des „Universal Primer Mix“ reduziert. Weiterhin galt es, selbst-komplementäre Primersequenzen zu vermeiden, die sich zurückfalten und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden könnten. Darüber hinaus sollten die genspezifischen Primer nicht komplementär zu den Sequenzen der „Universal Primer“ sein. Das Design der genspezifischen Primer gestaltete sich als äußerst kompliziert, da die PSORS1-Zielregion Homologien zu einer Vielzahl von Sequenzen im gesamten Genom aufweist. Die Primer wurden unter Berücksichtigung oben genannter Kriterien „per Hand“ gemäß der Sequenz des Klons AC006048 entworfen und unter Anwendung des Sequenzvergleichs-Programm BLAST auf ihrer Spezifität hin überprüft.

4.5.2 Ergebnisse der RACE-PCR

Trotz mehrfacher Wiederholung der RACE-PCR mit eigens konstruierten genspezifischen Primern stellte sich bei der Sequenzierung der Insert-Banden und Vergleich mit dem Sequenzvergleichs-Programm BLAST nicht die Homologie zu dem Klon AC006048 des Chromosoms 6 dar. Daraufhin wurden die genspezifischen Primer mehrmalig neu entworfen, wobei sich deren komplementäre Sequenz an die potentielle PolyA⁺-Sequenz bei nt24520 annäherte. Dennoch ließ sich kein Produkt amplifizieren, das homolog zu unserer Zielregion auf Chromosom 6 war. Dies weist darauf hin, dass mit diesem Untersuchungsansatz die Existenz einer mRNA bzw. cDNA eines potentiellen Suszeptibilitätsgens zwischen der 20. und 25. kb des Klons AC006048 nicht dargestellt werden kann.

5 Diskussion

Die Pathogenese der Psoriasis ist hochkomplex und noch nicht bis ins Detail verstanden. Seit langem wird eine genetische Prädisposition vermutet (Hoede, 1957), und neuere Untersuchungen zeigten eine Vererbbarkeit der Psoriasis zwischen 60 und 90 % auf (Liu et al., 2007). Heutzutage wird die Psoriasis als eine polygen determinierte Hauterkrankung angesehen, bei der eine Reihe von fakultativen Genloci im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren eine besondere entzündliche Prädisposition der Haut bedingt.

5.1 Welche Sequenzvariabilität entspricht PSORS1?

Obwohl aktuelle GWAS (*genome wide association studies*)-Studien (Elder, 2009; Cargill et al., 2007; Liu et al., 2008) etliche Risikogene und auch die Assoziation der Psoriasis mit der HLA-Klasse I (Feng et al., 2009; Nair et al., 2009) bestätigen konnten, ist noch immer ungeklärt, wo der Risiko-Locus auf Chromosom 6p21 exakt lokalisiert ist. Allgemein bekannt ist, dass von allen in Diskussion stehenden Suszeptibilitätsloci dem PSORS1-Locus bei der genetischen Prädisposition der Psoriasis mit 33 bis 50 % die größte Bedeutung beigemessen wird (Trembath et al., 1997; The International Psoriasis Genetics Consortium, 2003). PSORS1 reflektiert die HLA-Assoziation, die als erstes Korrelat der genetischen Prädisposition identifiziert wurde (Russell et al., 1972). Der hohe Grad an *Linkage Disequilibrium (LD)* im Bereich des PSORS1-Locus erschwert eine allgemein anerkannte Auffassung darüber, was PSORS1 darstellt, und wo es lokalisiert ist (Pasic´ et al., 2009). Es besteht gleichfalls die Möglichkeit, dass nicht der HLA-Cw6-Locus selbst, sondern ein benachbarter, im Kopplungsungleichgewicht mit HLA-Cw6 stehender Genpolymorphismus das eigentliche Risikoallel darstellt (Nair et al., 2000). Ähnliches vermutet man bei dem Systemischen Lupus erythematoses (Hartung et al., 1992; Kaiser et Criswell, 2010).

5.2 Die PSORS1-Suszeptibilitätsgene in der näheren Betrachtung

Die Assoziation von TCF19 mit der Schuppenflechte wurde bereits widerlegt (Teraoka et al., 2000), STG nicht als Kandidat in Betracht gezogen (Sanchez et al., 2004; Nair et al., 2000; 2006). Das Suszeptibilitätsgen PSORS1C3 (Chang et al., 2006) zeigte gegenüber dem HLA-Cw6-Allel eine schwächere Psoriasis-Assoziation in der schwedischen Bevölkerung (Holm et al., 2005). OTF3 wies im Vergleich mit HLA-Cw6

in Spanien eine stärkere Assoziation mit der Psoriasis auf (Gonzalez et al., 2000). Dieser Zusammenhang bestätigte sich jedoch weder in der chinesischen (Chang et al., 2003a) noch in der amerikanischen (Nair et al., 2000; 2006) Bevölkerung. Eine spätere Untersuchung belegte wiederum die Korrelation der Psoriasis vulgaris mit Polymorphismen des OTF3-Gens (Chang et al., 2007b). Für Polymorphismen des SPR1- und SEEK1-Gens wurde in Schweden der Nachweis einer positiven Assoziation mit der Psoriasis erbracht (Holm et al., 2003), der allerdings weder durch eine chinesische Arbeitsgruppe (Chang et al., 2003b; 2005) noch von Nair et al. verifiziert werden konnte (Nair et al., 2006). Auch dem HCR-WWCC-Allel des HCR (alpha-helix-coiled-coil rod homolog)-Gens wird eine positive Assoziation mit der Psoriasis vulgaris zugeschrieben (Asumalahti et al., 2000; 2002; Chang et al., 2004). Zudem gelang es, eine Überexpression dieses Allels in den Keratinozyten psoriatischer gegenüber gesunder Haut darzulegen (Asumalahti et al., 2002; Suomela et al., 2003). Aber auch im Falle des HCR-WWCC-Allels wird diskutiert, ob das Kopplungsungleichgewicht mit HLA-Cw6 der positiven Assoziation mit der Psoriasis zugrunde liegt (O'Brien et al., 2001; Chia et al., 2001).

5.2.1 Corneodesmosin (CDSN)

Corneodesmosin befindet sich etwa 160 kb telomerisch von HLA-C und wäre funktionell ein exzellenter Kandidat für die PSORS1-Mutation, da es bei der Kohäsion der terminal differenzierten Keratinozyten mitwirkt (Matsumoto et al., 2008). Zudem wurde eine divergierende Expression von CDSN in psoriatischer gegenüber normaler Haut dargelegt (Allen et al., 2001). Verschiedene Studien wiesen die positive Assoziation von Corneodesmosin mit der Psoriasis nach (Schmitt-Egenolf et al., 2001; Orru et al., 2002; Capon et al., 2003; Chang et al., 2006). In Japan (Ameen et al., 2005; Hui et al., 2002), China (Chang et al., 2003a; Fan et al., 2008), Thailand (Romphruk et al., 2003) und Spanien (Gonzalez et al., 2000) hingegen ließ sich diese positive Korrelation in Bevölkerungsstudien nicht reproduzieren. Darüber hinaus mangelt es einigen Studien an einer Differenzierung zu anderen Risikoallelen, die stark im Kopplungsungleichgewicht mit CDSN stehen (Enerbäck et al., 2000; Hui et al., 2002; Romphruk et al., 2003), wobei teilweise auch deren Unabhängigkeit voneinander aufgezeigt wurde (Schmitt-Egenolf M et al., 2001; Orrú et al., 2002; Chang et al., 2006; Fan et al., 2008).

5.2.2 HLA-Cw6

Reproduzierbar zeigt HLA-Cw6 die stärkste genetische Assoziation mit der Psoriasis vulgaris (Nair et al., 2006; Trembath et al., 1997; Fan et al., 2008). Schon lange untersuchte man die Korrelation zwischen der Prävalenz der Psoriasis und dem HLA-Cw6-Allel, wobei die Prävalenz beider in Nordeuropa am höchsten, mäßig in der asiatischen Bevölkerung und fast nicht existent in der amerikanoindianischen Bevölkerung ist (Farber et Nall, 1974; Yip, 1984; Tsuji et al., 1992; Mallon et al., 1999; Youn et al., 1999). Obwohl das Vorhandensein von HLA-Cw6 ein stark erhöhtes relatives Risiko für die Entwicklung einer Psoriasis in nahezu allen untersuchten Populationen mit sich bringt (Mallon et al., 1999), variiert der Anteil von Cw6-positiven Psoriasis-Patienten und dem assoziierten relativen Risiko substantiell in verschiedenen Bevölkerungen. Offenkundig ließe sich HLA-Cw6 gut mit der Autoimmunhypothese der Psoriasis vereinbaren. So scheinen divergierende Expressionswege von HLA-C bei der Psoriasis und dem Ekzem zu existieren, womit HLA-C mehr Bedeutung als ein beliebiger Faktor im Rahmen der allgemeinen Entzündungsreaktion zugesprochen wird (Carlén et al., 2007). Obgleich HLA-C gelegentlich selbst als das Risikogen der Psoriasis erklärt wird (Nair et al., 2006; 2009), fehlt hierfür bislang ein Nachweis. HLA-C wird funktionell als Ligand für sogenannte KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*)-Rezeptoren auf NK-Zellen erachtet (Boyington et Sun, 2002; Bari et al., 2011). Daher ist es auffällig, dass auch in neueren GWAS-Studien keine Interaktion des genetischen Risikos bezüglich der Psoriasis zwischen HLA-C und dem gleichfalls polymorphen KIR-Rezeptor-Gen-Cluster gefunden werden konnte. Insgesamt bleibt somit die Frage offen, ob HLA-C selbst oder ein nahe gelegener Locus wie der hier identifizierte HERV-K-dUTPase-Locus verantwortlich für die Assoziation ist, da dieser sich lediglich 30 kb telomerisch von HLA-C befindet.

5.3 Die HERVK-dUTPase als putativer Locus von PSORS1

Unter Anwendung der HSS-Methode wurde die von Nair et al. vorgeschlagene, rund 190-kb-lange RH1/2-Region auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 bestätigt (Nair et al., 2000), und die Lokalisation von PSORS1 auf ein Intervall um den Marker M6S168 eingegrenzt (Foerster et al., 2005). In einer späteren Publikation arbeiteten Nair et al. einen 224-kb-umfassenden Zielbereich heraus (Nair et al., 2006). Nair et al. stellten mit dieser Arbeit abermals HLA-Cw6 in den Mittelpunkt der PSORS1-Risikoallelsuche für Typ 1-Psoriasis-Patienten (Nair et al., 2006). Gleichwohl wird darin die Möglichkeit von

Intron-Variationen bekannter Gene innerhalb der Risikoregion bzw. von bislang nicht identifizierten Genen, regulatorischen Variationen oder regulatorischen RNAs in der Umgebung bekannter Gene eingeräumt, welche die Transkription, die mRNA-Prozessierung oder die Chromatin-Struktur beeinflussen könnten. Der in der vorliegenden Arbeit postulierte Zielbereich um den Marker M6S168 befindet sich innerhalb des von Nair et al. 2006 vorgeschlagenen 224-kb-Risikointervalls. Die dargelegten Ergebnisse stehen damit nicht im Widerspruch zu den neuerlichen Erkenntnissen. Die identifizierte retrovirale dUTPase könnte somit als ein bislang nicht identifiziertes Gen die Pathogenese der Psoriasis entscheidend beeinflussen. Auch eine spanische Arbeitsgruppe stellt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine 150-kb-Region telomerisch von HLA-C als Zielintervall in den Mittelpunkt (Martinez-Borra et al., 2005). So auch Oka et al., die das PSORS1-Gen durch eine Assoziationsanalyse in der japanischen Bevölkerung innerhalb einer 111-kb-Region telomerisch von HLA-C datierten (Oka et al., 1999). Eine SNP-basierte Assoziationsanalyse favorisiert ein 46-kb-Intervall telomerisch von HLA-C in der kaukasischen Bevölkerung (Lench et al., 2005). Orrù et al. ordnen PSORS1 anhand einer Haplotypenanalyse innerhalb der sardischen Bevölkerung einem 70-kb-Intervall um das Corneodesmosin-Gen zu, das HCR und SEEK1 beinhaltet, jedoch die HLA-Klasse I-Moleküle ausschließt (Orrù et al., 2005). Eine weitere Arbeit identifizierte einerseits HLA-C als das primäre Risikogen des PSORS1-Locus, legte jedoch zugleich dar, dass die genetischen Varianten des HLA-C-Gens nicht zur Erklärung des gesamten Linkage-Beweises genügen. Vielmehr wird ein weiteres Risikogen bzw. -allel innerhalb der postulierten 172-kb-Risikoregion telomerisch von HLA-B vermutet, in der sich darüber hinaus ausschließlich die HERV-K-Fragmente mit der von uns postulierten dUTPase und HCG27 befinden (Fan et al., 2008).

Die vorliegende Arbeit weist die Expression einer HERV-K-dUTPase in der PSORS1-Zielregion in Vollblut von gesunden Kontrollpersonen und Psoriasis-Patienten sowie in läsionaler und nicht-läsionaler psoriatischer Haut nach. Ein Alignment dieser dUTPase zeigt Homologien zu einer HERV-K/HML-2.HOM-dUTPase auf Chromosom 7 (7p22). Dabei handelt es sich um ein menschenpezifisches Provirus, dessen Formationen erst in der neuen Evolution aufgetreten sind (Mayer et al., 1999; Tönjes et al., 1999; Barbulescu et al., 1999). In verschiedenen ethnischen Gruppen gelang es, DNA-Produkte dieses Virus zu amplifizieren, was daraufhin weist, dass es häufig im

menschlichen Genom vorkommt (Mayer et al., 1999).

5.4 HERVs und Autoimmunerkrankungen

Humane endogene Retroviren (HERVs) werden als einzelne oder multiple Kopien im gesamten humanen Genom angetroffen und als provirale DNA vererbt. Neben vielen putativen Rollen für zelluläre Abläufe werden retrovirale Infektionen seit dem Nachweis kreuzreaktiver Antikörper gegen retrovirale Proteine in serologischen Untersuchungen als Triggerfaktoren chronisch-entzündlicher Erkrankungen diskutiert (Blomberg et al., 1994; Bengtsson et al., 1996). So weisen Patienten mit einem SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen in höherer Frequenz Antikörper gegen Peptide der Typ C-HERVs auf (Bengtsson et al., 1996). Auch bei Patienten mit einem Sjögren-Syndrom bzw. einer Multiplen Sklerose (MS) fanden sich erhöhte Antikörpertiter gegen diverse HERV-Sequenzen einschließlich HERV-K (Hervé et al., 2002). Ferner wird ein Zusammenhang zwischen einem von HERV-K18 (entspricht HERV-K110 der HERV-K (HML-2) Familie) kodierten Superantigen und dem Typ 1-Diabetes (Conrad et al., 1997; Marguerat et al., 2004) sowie zwischen der Expression von *MSRV (multiple sclerosis-associated retrovirus)*-Produkten der HERV-W-Familie und der Multiplen Sklerose kontrovers diskutiert (Perron et al., 2001; Antony et al., 2011). Im Falle der MS wurde eine signifikant höhere Expression von HERV-H und HERV-W-Env-Epitopen auf B-Zellen und Monozyten von Patienten mit einer aktiven MS im Vergleich zu einer stabilen MS bzw. gesunden Kontrollen gefunden. Damit korrelierend fand sich eine erhöhte Antikörperreaktivität im Serum dieser Patienten (Brudek et al., 2009).

5.4.1 Die Rolle der HERVs bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen

Es existieren verschiedene pathogenetische Modelle, die retroviralen Sequenzen eine ursächliche Rolle bei Autoimmunerkrankungen zuschreiben: Die Retrotransposition und Insertion eines ERV in ein oder nahe eines Gens, welches die Immunantwort und Toleranz reguliert, könnte zu einer Insertionsmutagenese und damit zu einer Änderung der zellulären Regulation mit einer Störung der Genfunktion bzw. zu einer Gendestruktion führen (Nakagawa et Harrison, 1996). Ein weiterer Mechanismus besteht in der Expression von endogenen retroviralen Proteinen, die als Autoantigen fungieren. So können endogene Retroviren für Proteine kodieren, die in ihrer Struktur und Aminosäuresequenz körpereigenen Proteinen ähneln – molekulares Mimikry genannt – und folglich auch eine Immunantwort provozieren. Hinter dem Versagen der

Immunfunktion könnte auch die Expression von Superantigenen stehen. Superantigene sind Proteine, die von Mikroorganismen wahrscheinlich zur Verbesserung ihrer Transmission produziert werden. Sie rufen eine heftige Immunantwort hervor, indem sie T-Zellen zur Expression von T-Zell-Rezeptor- β -Ketten stimulieren (Woodland et Blackman, 1992). So induzieren die HERV-K18 und HERV-W-env-Proteine im Falle der MS und des Diabetes mellitus eine antigenabhängige polyklonale Aktivierung von T-Zellen mit einer spezifischen variablen T-Zell- β -Kette (Perron et al., 2001). Ferner wurde nachgewiesen, dass HERV-W-Elemente für ein immunopathogenetisches env-Protein kodieren, das eine proinflammatorische und autoimmune Kaskade induziert (Perron et Lang, 2010).

5.4.2 Antikörperantwort auf HERVs bei Psoriasis-Patienten

Die Gruppe um Molès et al. verglich 2003 die Seren von Psoriasis-Patienten mit Kontrollen auf eine Antikörperantwort gegen das *murine leukemia virus* (MLV)-like-HERV hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit der Psoriasis. Im Ergebnis fanden sich bei 91 % der untersuchten Psoriasis-Patienten gegenüber 53 % bei den Kontrollen Anti-MLV-Antikörper im Serum (Molès et al., 2003). Insbesondere das IgG zeigte sich in der Differenzierung bei Psoriasis-Patienten deutlich erhöht. Diese Resultate wurden als indirekter Hinweis transkriptioneller Aktivität von Retroviren mit der Entstehung immunogener Epitope gewertet (Molès et al., 2003). Trotzdem wird damit den HERVs keine kausale Rolle bei der Pathogenese der Psoriasis zugesprochen, könnte ihre Bedeutung doch auch in der Kontrolle anderer relevanter zellulärer Gene liegen. Dafür müssten die HERV-Elemente nicht zwangsläufig intakt sein, da auch – wie bereits erwähnt – die Expression von Verstärkern, Promotoren, untranslatierten Regionen oder Polyadenylierungssignalen maßgeblich sein könnte. So ist auch vorstellbar, dass die in dieser Arbeit charakterisierten residualen Fragmente eines HERV-K fähig sind, benachbarte Gene wie den HLA-C Locus zu beeinflussen.

5.4.3 Nachweis der Expression von HERVs in psoriatischer Haut

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Gewebeproben läsionaler psoriatischer Plaques und Zellkulturen von Bestandteilen dieser erbrachten erstmalig 1983 den Nachweis virusähnlicher Partikel, deren Proteinkomposition dem murinen Typ C Retrovirus ähnelte (Dalen et al., 1983). Eine weitere Charakterisierung dieser Partikel führte zu der Beschreibung eines Proteins namens *Pso p27*, dem die Funktion eines

Psoriasis-assoziierten Antigens zugeschrieben wurde (Iversen et al., 1995; Asbakk et al., 1990). In gesunder Haut gelang bereits der Nachweis einer Expression verschiedener humaner endogener Retroviren unter Anwendung einer RT-PCR auf dem mRNA-Level (Hohenadl et al., 1999). Des Weiteren zeigte sich in Keratinozytenkulturen eine variable Regulation der HERV-Transkripte durch UV-B-Bestrahlung (Hohenadl et al., 1999). Auch das HERV-E-envelope-Protein wird in psoriatischer und atopischer Haut gegenüber der normalen Haut häufiger exprimiert (Bessis et al., 2004). Die Intensität der HERV-E-env-Expression stellte sich bei weiteren Untersuchungen in läsionaler und periläsionaler psoriatischer Haut stärker als in nicht-läsionaler psoriatischer Haut dar. Daher stellten Bessis et al. die Vermutung auf, dass die Expression von HERV-E-env der Entstehung von psoriatischen Plaques vorausgehen könnte (Bessis et al., 2004). Unterstützt wurde diese Vermutung durch die Beobachtung, dass die CD4⁺-T-Lymphozyten der psoriatischen Plaques (Bata-Csorgo et al., 1995) im Gegensatz zum dermalen Entzündungsinfiltrat der atopischen Dermatitis HERV-env exprimieren (Bessis et al., 2004). Darüber hinaus hatte auch hier eine UVB-Bestrahlung die Downregulation des HERV-env-Proteins zufolge (Bessis et al., 2004). Dies könnte die positiven Effekte von UVB-Licht bei der Psoriasis erklären. Auf der mRNA-Ebene konnte daneben auch eine Überexpression von HERV-W, -K und -E in läsionaler psoriatischer Haut gegenüber normaler und atopischer Haut aufgezeigt werden (Molès et al., 2000). Zudem charakterisierten Molès et al. eine neue Variante der ERV-9/HERV-W-Familie, die eine deutlich stärkere Expression in läsionaler psoriatischer Haut gegenüber nicht-läsionaler psoriatischer oder atopischer Haut zeigt. Der Nachweis von ERV-9 im Blut gelang nicht (Molès et al., 2005).

5.4.4 Beeinflussende Faktoren der HERV-Expression bei der Psoriasis

Bei allen pathogenetischen Vorgängen ist eine In-situ-Aktivierung von ERV durch transaktivierende Faktoren, Bestrahlung, Chemikalien, Hormone oder Infektionen möglich, wodurch die Auswirkungen einer exogenen Infektion mit Retroviren imitiert würden (Walchner et al., 1996; Balada et al., 2009). So wird die Expression von HERV-K durch weibliche Steroidhormone stimuliert, da retrovirale LTRs Glukokortikoid- und Progesteron-stimulierbare Elemente enthalten (Ono et al., 1987). Ein anderes ubiquitäres Steuerungselement der ERV-LTRs ist die DNA-Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der durch UV-Strahlung aktivierbar ist (Walchner et al., 1996). Für Herpesviren und Epstein Barr-Viren wurde bereits der Beweis erbracht, die

HERV-Expression zu reaktivieren (Sutkowski et al., 2001; Brudek et al., 2004). Gleiches wird den humanen Papilloma Viren unterstellt, die in über 80 % der Psoriasis-Patienten nachweisbar sind (Majewski et al., 2001). Eine EBV-Infektion kann den HERV-K18 zur Produktion eines Superantigens anregen (Sutkowski et al., 2001). Bei MS-Patienten konnte eine verstärkte zelluläre Immunantwort bei einer simultan vorliegenden Infektion von ERV und HSV beobachtet werden (Brudek et al., 2004). Auch das HI-Virus 1 ist in der Lage, die HERV-Expression zu reaktivieren und eine Antikörperantwort gegen HERVs zu induzieren (Lawoko et al., 2000). Dies könnte die Schwere einer Psoriasis bei HIV-Erkrankten erklären. Möglich wäre auch, dass die HERV-Expression auf einem Trans-Komplementierungs-Prozess zwischen verschiedenen HERV-Familien beruht (Molès et al., 2005). Eine weitere beeinflussende Komponente stellen proinflammatorische Zytokine dar, welche die HERV-K-Expression regulieren (Katsumata et al., 1999). So könnte auch die Expression der in dieser Arbeit identifizierten HERV-K-dUTPase durch die bei der Psoriasis vorhandenen Zytokinkaskade stimuliert werden.

5.4.5 Könnte die HERV-K-dUTPase aktiv sein?

Noch immer werden Integrationsereignisse einiger Mitglieder der HERV-K(HML-2)-Familie beobachtet. Ferner findet man in der menschlichen Bevölkerung diverse polymorphe humane HERV-K-Loci (Moyes et al., 2007; Belshaw et al., 2005). Dies deutet eine aktive Amplifikation von proviralen Sequenzen während der humanen Evolution an. Solche Elemente könnten als intrazelluläre Retrotransposons aktiv sein (Medstrand et Mager, 1998; Mayer et al., 1999). In vitro Studien haben gezeigt, dass DNA-Proviren noch immer über eine Kodierungsfähigkeit verfügen und in der Lage sind, virale Partikel zu bilden. Für den HERV-H, der eine Assoziation mit der Multiplen Sklerose aufweist, wurde die Übertragbarkeit solcher Partikel dargelegt (Christensen et al., 2002). HERV-ORFs können auch bei physiologischen Zellfunktionen mitwirken. So vermittelt Syncytin, ein envelope-Protein von HERV-W, in fetalem Gewebe die Zellfusion und ist an der Kontrolle der plazentaren Morphogenese beteiligt (Mi et al., 2000; Blond et al., 2000). Kürzlich wurde die verstärkte Expression eines funktionstüchtigen endogenen retroviralen reverse Transkriptase (RT)-Proteins in der Epidermis und Dermis von läsionaler psoriatischer Haut gegenüber normaler Haut aufgezeigt. Dies könnte partiell noch der abnormalen Keratinozytendifferenzierung und den kutan migrierenden Granulozyten angeschuldet werden. Es offenbarte sich jedoch

auch eine höhere Aktivität der reversen Transkriptase in den psoriatischen Proteinextrakten gegenüber denen in normaler Haut (Molès et al., 2007). Da bis dato kein infektiöses Retrovirus angeschuldigt wurde, an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt bzw. in gesunder Haut präsent zu sein, vermuten Molès et al. den Ursprung der funktionalen RT-Proteine in aktiv produzierenden endogenen Retroelementen. Im Einklang damit ist das Molekulargewicht des identifizierten RT-Proteins vergleichbar mit bereits beschriebenen retroviralen reversen Transkriptasen (Molès et al., 2007; di Marzo Veronese et al., 1986). So wäre eine geringe Aktivität endogener retroviraler Elemente in normaler Haut denkbar, die durch eine Keratinozytenhyperproliferation und -inflammation im Rahmen der Psoriasis gesteigert wird (Molès et al., 2007).

5.5 Das Enzym dUTPase

5.5.1 Vorkommen und Funktion der dUTPase

Die dUTPase katalysiert die Hydrolyse von dUTP zu dUMP und Pyrophosphat. Damit stellt sie einerseits dUMP als Vorläufer für die TTP-Synthese bereit. Andererseits eliminiert sie dUTP als Substrat der DNA-Polymerase (Harris et al., 1997). Bei einem Mangel an dUTPase erhöht sich die Menge von dUTP innerhalb einer Zelle erheblich und Uracil, eine RNA-Base, wird anstelle von Thymin durch die DNA-Polymerase während der Replikation fälschlicherweise in neu synthetisierte DNA eingebaut. Stark mit Uracil substituierte DNA induziert eine Exzisionsreparatur durch die Uracil-Glykosylase (Krokan et al., 2002). Damit wird indirekt die Vervollendung der DNA-Synthese verhindert. Der Zelltod tritt durch Doppelstrangbrüche und DNA-Fragmentierung – thyminloser Zelltod genannt – ein (Harris et al., 1997; Goulian et al., 1986; Canman et al., 1993; 1994). Der Nachweis von Genen für eine dUTPase in Zellen von Prokaryonten bis höher entwickelten Eukaryonten lässt vermuten, dass die dUTPase für alle Zellen unerlässlich sein könnte (McIntosh et Haynes, 1997). Eine in *E. coli*-Bakterien durchgeführte Studie weist der dUTPase eine essentielle Rolle in der Lebensfähigkeit von Zellen zu (El-Hajj et al., 1988). Auch bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Gadsden et al., 1993) und bei der *Drosophila melanogaster* (Békési et al., 2004) scheint dies zuzutreffen. Neben zellulären Organismen kodieren auch verschiedene Viren wie z. B. Bakteriophagen, Pockenviren, Herpesviren und Retroviren für eine dUTPase (Preston et Fisher, 1984; Elder JH et al., 1992; Chen et al., 2002). Im Falle der Lenti- und Onkoviren, die den Retroviren angehören, konnte gezeigt werden,

dass ein Defekt der dUTPase zu einer Uracilinkorporation in die cDNA führt (Steagall et al., 1995; Turelli et al., 1996). Auch hier verhindert die dUTPase die Synthese von Uracil-substituierter DNA während der Virusreplikation und wendet damit eine DNA-Degradierung durch zelluläre Reparaturmechanismen ab (Harris, 1997; Turelli et al., 1996; Oliveros et al., 1999). Mutante Stämme des Herpes simplex Virus (HSV)-1 und auch verschiedene mutante Lentiviren wie das Feline Immundefizienz-Virus (FIV) und *equine infectious anemia virus* (EIAV), die mit einer fehlerhaften dUTPase konstruiert waren, wiesen eine normale Replikation in proliferierenden Zellen auf. In ruhenden Wirtszellen zeigten sie jedoch durch den Einbau von Uracil in die cDNA eine stark reduzierte Replikationskinetik (Lichtenstein et al., 1995; Steagall et al., 1995; Turelli et al., 1996). Auch beim African Swine Virus scheint die dUTPase-Aktivität entbehrlich für eine Virusreplikation in sich teilenden Zellen, jedoch erforderlich für eine produktive Infektion in ruhenden Wirtszellen zu sein (Oliveros et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass virale dUTPasen die Virusreplikation in ruhenden Zellen, die keine zelluläre dUTPase exprimieren, ermöglichen. In proliferierenden Zellen hingegen ersetzt die Expression der zellulären dUTPase die fehlende virale dUTPase (Fleischmann et al., 2002). Für dUTPase-defiziente HSV-Mutanten wurde belegt, dass die zelluläre dUTPase die Funktion der viralen dUTPase während der Replikation substituiert (Williams, 1988). Es wird angenommen, dass Viren durch ein dUTPase-Gen ihre Virusreplikation in differenzierten, sich nicht teilenden Zellen ohne endogene zelluläre dUTPase erleichtern (Fleischmann et al., 2002). Die Erforderlichkeit einer dUTPase-Aktivität deutet die potentiell tragende Rolle dieses Enzyms bei der Virulenz von Viren an. Trotz des offensichtlichen Bedarfs einer dUTPase gibt es eine überraschende Lücke in der phylogenetischen Verteilung dieser innerhalb der Lentiviren. So exprimieren ausschließlich die non-primaten Lentiviren wie z. B. das Feline Immundefizienz-Virus (FIV) und das infektiöse Anämie-Virus eine dUTPase. Die primaten Lentiviren, einschließlich HIV und Simianes Immundefizienz-Virus (SIV) besitzen hingegen keine dUTPase (Elder JH et al., 1992). Humane dUTPasen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen charakterisiert (McIntosh et al., 1992; Ladner et al., 1996). Die Abstammung einiger humaner dUTPase-Motive konnte den humanen endogenen Retroviren der HERV-L- und HERV-K-Familie zugeordnet werden.

5.5.2 Die Expression der humanen dUTPase

Aufgrund ihrer Funktion ist die Expression der dUTPase größtenteils auf sich replizierende Zellen beschränkt. Die Expression von zellulärer dUTPase wird durch den Zellzyklus reguliert, das heißt, sie ist hoch in sich teilenden undifferenzierten Zellen und niedrig in terminal differenzierten Zellen. Dennoch kann die dUTPase nicht als Proliferationsmarker dienen, wurde ihre Expression doch auch in ruhenden Zellen wie im Thymusgewebe nachgewiesen (Strahler et al., 1993). In einigen Eukaryonten existieren zwei verschiedene Isoenzyme, die durch alternatives mRNA-Splicing oder durch alternative Promotoren entstehen. Sowohl in normalem Gewebe als auch in neoplastischem Gewebe gelang es, die Expression einer nukleären und mitochondrialen Isoform der humanen dUTPase nachzuweisen (Ladner et Caradonna, 1997). Das Zytosol humaner Zellen weist keine dUTPase auf. Es ist damit anfällig für eine Akkumulation von dUTP (Ladner et al., 1996). In normalem Gewebe wurde die nukleäre Isoform ausschließlich in replizierenden Zellen angefundenes. Diese Erkenntnis geht mit Zellkultur-Studien einher, bei denen die nukleäre Isoform proliferationsabhängig exprimiert wird. Die mitochondriale Isoform der humanen dUTPase wird dagegen unabhängig vom Proliferations-Status angetroffen (Ladner et al., 2000). Darüber hinaus zeigt die Expression der dUTPase in diversen humanen Gewebearten unterschiedliche Level. Dies deutet die Möglichkeit einer zellspezifischen Regulation der dUTPase an (Fleischmann et al., 1999). So stellte die Arbeitsgruppe um Fleischmann fest, dass die dUTPase-Expression in Lymphozyten höher war als die in epithelialen Zellen (Fleischmann et al., 1999). Dies lässt vermuten, dass verschiedene dUTPase-Formen existieren, deren Expression gewebespezifisch ist (Strahler et al., 1993). Anderenfalls könnten unterschiedlich lange Transkripte durch alternative Splice-Varianten entstehen oder verschiedenartige Promotoren für differenzierungs- und gewebespezifische Kontrollen bzw. unterschiedliche Isoformen der dUTPase verantwortlich sein, aber doch für das gleiche Protein kodieren (Ladner et al., 1997; Wildin et al., 1991). Auch in der vorliegenden Arbeit weisen verschiedene Patienten unterschiedlich stark ausgeprägte dUTPase-Expressionsbanden in der PCR auf, die Hinweis für eine divergierende Expression sein könnten. Demgegenüber exprimiert der Typ 1-Psoriasis-Patient 6 weder die Expression des 56-60- noch des 60-64-PCR-Fragmentes des dUTPase-ORF 23048 auf. Eine nähere Untersuchung alternativer Splicevarianten der mRNA für die HERV-K-dUTPase könnte Aufschluss geben. Ein anderer Aspekt ist die posttranskriptionelle Regulation der dUTPase-Expression. Bei

der *Drosophila melanogaster* differiert das Level des dUTPase-Proteins und das der mRNA erheblich. In den meisten Larvenstadien ist das Protein unterhalb der Detektionsgrenze, während die mRNA beständig nachweisbar bleibt (Békési et al., 2004). Diese Daten deuten auf eine mRNA-Prozessierung oder schnelle Proteindegradierung hin.

5.5.3 Expression der dUTPase in HERV-K

Die HERV-K(HML-2)-dUTPase wird heutzutage zu der sogenannten MMTV-assoziierten Gruppierung gezählt, der das Mason Pfizer Monkey Virus (MPMV), das Maus-Mamma-Tumor-Virus (MMTV) und das Jaggsiekte Schafsvirus (JSRV) angehören. Die sogenannte non-primate Lentivirus-dUTPase, zu denen die des felines Immundefizienz-Virus (FIV) gehört, stellen die engsten Verwandten dieser Gruppe dar (Baldo et McClure, 1999). Es gelang bereits, die HERV-K-dUTPase zu klonieren und zu exprimieren. Weiterhin wurde dargelegt, dass eine von genomischer HERV-K-dUTPase stammende Consensus-Sequenz biologisch aktiv ist (Harris et al., 1997). In der Vergangenheit wurden bereits die Expression und biologische Aktivität der HERV-K-Enzyme reverse Transkriptase, Protease und Integrase nachgewiesen (Kitamura et al., 1996; Mueller-Lantzsch et al., 1993; Patience et al., 1996). Die HERV-K(HML-2)-Familie exprimiert ihr dUTPase-Motiv N-terminal zur Proteasedomäne (Harris et al., 1997). Verschiedene HERV-Familien unterlagen im Zuge der kontinuierlichen Aktivität und Amplifikation der Proviren im Wirtsgenom Sequenzveränderungen. Dies gilt auch für die HERV-K(HML-2)-Familie, der die in dieser Arbeit diskutierte HERV-K-dUTPase angehört (Mayer et Meese, 2003). Bei dieser Familie präsentiert das konservierte Motiv 5 eine Mutation, die eventuell in einem Verlust der enzymatischen Aktivität resultiert. Diese könnte jedoch wiederhergestellt werden, würde die essentielle Aminosäure-Position korrigiert werden (Harris et al., 1997). Die meisten nicht-HERV-K-dUTPasen werden für aktive Enzyme gehalten. Es gibt diverse Hinweise, die dafür sprechen, dass exogene Vorfahren von verschiedenen HERV-K-Familien tatsächlich für funktionale dUTPasen kodieren, wenn man einerseits die hohe Sequenz-Konservierung im Vergleich zu aktiven dUTPasen und andererseits die hohe Mutationsrate von Retroviren einbezieht, die wahrscheinlich innerhalb kürzester Zeit zu einer Verdrängung von nichtfunktionalen dUTPasen aus dem retroviralen Genom geführt hätte (Mayer et Meese, 2003).

5.5.4 Struktur der dUTPasen und mögliche Funktion der PSORS1-dUTPase

Die meisten dUTPasen so auch die humane dUTPase formen in der Quartärstruktur Homotrimere, wobei die Untereinheiten jeweils ein Bisquit-Rollen- β -Faltblatt bilden (Dauter et al., 1999; Mol et al., 1996; Persson et al., 2001). Jede der drei aktiven Seiten des Enzyms, die jeweils Substrat binden, setzt sich aus erhaltenen Motiven von jeder der drei Monomer-Untereinheiten zusammen (Mol et al., 1996; Vértessy et Tóth, 2009). Die dUTPase enthält typischerweise fünf verschiedene Aminosäure-Motive (McGeoch et al., 1990; Persson et al., 2001). Die Feline Immundefizienzvirus (FIV)-dUTPase zeigt den größten Grad an Sequenzidentität mit der HERV-K-dUTPase, die als Suszeptibilitätsgen der vorliegenden Arbeit postuliert wird. Erstere besteht aus drei Untereinheiten und bildet ein Homotrimer und dreidimensionale Kristallstruktur aus (Prasad et al., 1996; Barabas et al., 2003). Die β -Retroviren kodieren an der Verbindung zwischen dem Gag- und Pro-ORF für das dUTPase-Gen (Bergman et al., 1994; Barabas et al., 2003). Eine ribosomale Leseraster-Verschiebung resultiert in der Translation des Gag-Pro-Polyproteins, das durch die retrovirale Protease in das reife virale Protein zerschnitten wird. Dabei wird ein bifunktionales Protein kreiert. Das retrovirale Nukleokapsid-Protein ist mit dem N-Terminus der dUTPase fusioniert. Das Alignment der vorhergesagten Proteinsequenz der identifizierten HERV-K-dUTPase mit anderen dUTPasen zeigte, dass das C-terminal lokalisierte, von insgesamt fünf bei dUTPasen konservierten Motiven bei der PSORS1-dUTPase verloren gegangen ist. Dieser Verlust ist auf einen frameshift C-terminal zur Aminosäure V183 zurückzuführen. Daher ist ungewiss, ob das vorhergesagte Protein überhaupt enzymatisch aktiv ist. Die Möglichkeit kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Kristallstruktur des PSORS1-homologen Enzyms aus dem feline Immundefizienzvirus (Abbildung 5.1) zeigt, dass das Motiv fünf nur lose die Substratbindungsstelle überdeckt (Barabas et al., 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass die FIV-dUTPase, wenn rekombinant am N-Terminus mit dem Nukleokapsid-Protein fusioniert, einen verlängerten Abstand zwischen Motiv vier und fünf hat. Dementsprechend kann die abdeckende Funktion des Motivs fünf über der Substratbindungsstelle nicht gewährleistet werden. Trotzdem ist dieses Enzym aktiv. Entsprechend ist Motiv fünf am wenigsten konserviert. Mol et al. schlugen 1996 vor, dass das Motiv fünf posthydrolytisch agiert, nämlich die Reaktionsprodukte vom katalytischen Zentrum entfernt (Mol et al., 1996). Wäre das tatsächlich der Fall, so wäre das Motiv fünf nicht an der Substratbindung beteiligt. In

diesem Fall wäre zumindest eine intakte UTP-Bindung des PSORS1-kodierten dUTPase-Fragmentes möglich.

5.5.5 Bedeutung der PSORS1-dUTPase bei inflammatorischen Prozessen

Für die EBV-kodierte dUTPase wurde bewiesen, dass sie eine Dysregulation des Immunsystems *in vivo* und *in vitro* verursacht. So induziert die EBV-kodierte dUTPase eine vermehrte Produktion von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 in unstimulierten Monozyten (Glaser et al., 2006), von denen einige auch bei den pathophysiologischen Prozessen der Psoriasis eine entscheidende Rolle einnehmen. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit belegt, dass die EBV-kodierte dUTPase in Monozyten und Macrophagen über den NF- κ B-Mechanismus eine verstärkte Expression von $\text{TNF}\alpha$ hervorruft. In der Folge wurden vermehrt entzündungsassoziierte endotheliale Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und ICAM-1 sowie IL-6 exprimiert (Waldman et al., 2008). $\text{TNF}\alpha$ und endotheliale Adhäsionsmoleküle nehmen auch bei der Bildung des Entzündungsinfiltrats der Psoriasis eine tragende Rolle ein. Dieselbe Eigenschaft wurde kürzlich für die rekombinant exprimierte, in dieser Arbeit identifizierte PSORS1-dUTPase dargestellt. Dabei korrelierte die NF- κ B-Aktivierung mit dem Grad der Expression der HERV-K-dUTPase. Diese proinflammatorische Wirkung ist nicht an eine enzymatische Aktivität geknüpft (Ariza et Williams, 2011). Darüber hinaus weist die in der vorliegenden Arbeit charakterisierte HERV-K-dUTPase im 5'-Bereich bei nt22279 eine sogenannte c-Rel site auf, die eine putative Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie darstellt. Auch wenn die PSORS1-HERV-K-dUTPase keinerlei enzymatische Aktivität besitzen sollte, könnte sie somit zur Pathogenese der Psoriasis beitragen. Überdies können die hier beschriebenen, aber auch andere regulatorisch wirksame Polymorphismen eine jeweils unterschiedlich starke Expression, mRNA-Stabilität oder proinflammatorische Wirkung induzieren, die jeweils das Auftreten der Psoriasis differentiell begünstigen. Schließlich ist auch denkbar, dass nicht-transkribierte RNA-Fragmente der PSORS1-dUTPase im Sinne von micro-RNAs die Translation der humanen dUTPase und/oder der HERV-kodierten *pro*-Gene von anderen genomischen Loci negativ regulatorisch beeinflussen und damit ebenfalls Psoriasis-relevante Prozesse beeinflussen.

6 Zusammenfassung

Die Psoriasis vulgaris ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei deren Pathogenese multiplen Genen ein krankheitsinduzierender Effekt zugeschrieben wird. Seit vier Jahrzehnten ist der HLA-Klasse I-Locus auf dem Chromosom 6p21 - PSORS1 - bekannt, der eine starke genetische Assoziation mit der Psoriasis zeigt und sich durch ein hohes Maß an Linkage disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht) auszeichnet. Nair et al. datierten PSORS1 in einer etwa 190-kb-umfassenden Region nahe HLA-C (Nair et al., 2000). In Vorarbeiten konnte die Lokalisation von PSORS1 auf einen Bereich um den Marker M6S168 eingegrenzt werden (Foerster et al., 2005). Innerhalb dieser definierten Zielregion lokalisieren sich Fragmente eines humanen endogenen Retrovirus der Familie HERV-K. Darunter befindet sich das Fragment des viralen dUTPase-Enzyms (open reading frame, ORF 23048). Ziel dieser Arbeit war es, zu klären, ob dieses dUTPase-Fragment *in vivo* exprimiert wird, um dessen pathogenetische Relevanz bei der Psoriasis beurteilen zu können. Dazu wurde ein RT-PCR-Assay zum Nachweis PSORS1-assoziiierter dUTPase-Fragmente etabliert. Es zeigte sich, dass der ORF 23048 und ein C-terminales Transkript in Vollblut von Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden exprimiert werden. Ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Typ 1- und Typ 2-Psoriasis-Patienten konnte nicht festgestellt werden. Nach Isolierung von PolyA⁺-mRNA, die anschließend als Matrize in der cDNA-Synthese verwendet wurde, konnte die Expression des ORF 23048 sowie des C-terminalen Transkriptes bei gesunden Probanden bestätigt werden. Weiterhin ließ sich die Expression des ORF 23048 sowohl in der Haut einer gesunden Probandin als auch in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Psoriasis-Patienten nachweisen. Mittels einer weiteren unabhängigen Polymerasekettenreaktion konnte schließlich die Expression des gesamten putativen 1400-bp-Transkriptes in Vollblut bei zwei Psoriasis-Patienten bestätigt werden. Somit wird die HERV-K-PSORS1-dUTPase sowohl im Blut als auch in der Haut *in vivo* exprimiert. In Zusammenschau mit publizierten Daten, welche eine proinflammatorische Rolle des PSORS1-dUTPase-Fragmentes zeigen, deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass dieses Transkript ein plausibles Kandidatengen für die Psoriasis in der PSORS1-Region darstellt.

7 Abkürzungsverzeichnis

BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (komplementäre DNA)
CDSN	Corneodesmosin
CIP	Calf Intestinale Phosphatase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dUTPase	Desoxyuridintriphosphat-Pyrophosphatase
E. coli	Escherichia coli
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
env/Env	Envelope-Gen (Hüllenprotein-Gen)/Envelope-Protein
ERV	endogenes Retrovirus
FCS	fetales Kälberserum
FIV	Felines Immundefizienz-Virus
gag/Gag	gruppenspezifisches Antigen (Gen)/ ~ (Protein)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GSP	genspezifischer Primer
HCR	α -helix coiled-coil rod homolog
HERV	humanes endogenes Retrovirus
HLA	humanes Leukozytenantigen
HR	High risk (Hochrisiko)
HTDV	human teratocarcinoma-derived virus particle
HSS	Haplotype-Sharing-Statistics
HSV	Herpes simplex Virus
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie-Virus
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactose
IRF3	Interferonregulationsfaktor 3
kb	Kilobasen
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptors
LB	Luria-Bertani-Medium
LD	Linkage disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
LR	Low risk (Niedrigrisiko)

Abkürzungsverzeichnis

LTR	long terminal repeats (lange terminal wiederholte Sequenzen)
MA	Matrix-Protein
MB	Megabase
MHC	major histocompatibility complex
MICA	major histocompatibility complex class I chain-related gene A
MLV	murines Leukämievirus
MMTV	mouse mammary tumor virus
mRNA	Messenger-RNA (Boten-RNA)
NC	Nucleocapsid-Protein
NF κ B	nuclear factor kappa-B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
POU5F1 (= OTF3)	POU class 5 homeobox 1 (= octamer transcription factor 3)
PBMC(s)	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chaine reaction (Polymerasekettenreaktion)
pol/Pol	Polymerase-Gen/Polymerase-Protein
pro/prt	Protease-Gen
Pro	Protease-Protein
PSORS1	Psoriasis-Suszeptibilitätslocus 1
PSORS1C1	psoriasis susceptibility 1 candidate 1 (= SEEK1)
PSORS1C2	psoriasis susceptibility 1 candidate 2 (= SPR1)
RACE	rapid amplification of cDNA-ends-PCR
rec	regulator of expression encoded by corf (Gen)
rev	regulator of expression of virion proteins (Gen, HIV)
RH	Risikohaplotyp
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAsen	Ribonukleasen
rpm	rounds per minute
RT	reverse Transkriptase
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
C6orf15 (= STG)	chromosome 6 open reading frame 15
TCF 19	transcription factor 19.
TDT	Transmission-Disequilibrium-Test
TGF	transforming growth factor
Th1/2	T-Helferzelle Typ1/2
TNF	Tumornekrose-Faktor
U	Units
UDP	Uridindiphosphat
UPM	Universal Primer Mix
UTP	Uridintriphosphat
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
X-Gal	5-Bromo-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

8 Glossar

Allel: Variationen eines Gens, die sich auf identischen Abschnitten (Genloci) homologer Chromosomen befinden. Allele können zu einer unterschiedlichen Ausprägung des dazugehörigen Merkmals führen und sind für die verschiedenen Phänotypen innerhalb einer Art verantwortlich. Von einem Allelenpaar eines Elternteils wird immer nur ein Allel an das gleiche Kind weitergegeben.

Annealingtemperatur: auch Primeranlagerungstemperatur genannt; beschreibt die Temperatur, bei der sich eine Polynukleotidsequenz an ihren komplementären DNA-Strang bindet.

Antigen: Substanz, die von einem lebenden Organismus als fremd erkannt wird und dadurch eine spezifische Immunantwort auslöst.

cDNA (komplementäre DNA): DNA, die durch das Enzym Reverse Transkriptase anhand einer mRNA-Matrize synthetisiert wird.

Cluster: Block

Codon: drei Basen einer mRNA, die im Rahmen der Translation für eine bestimmte Aminosäure kodieren.

dUTPase: essentielles Enzym, das dUTP zu dUMP und Pyrophosphat hydrolysiert und somit dUMP für die dTTP-Synthese bereitstellt.

endogene Retroviren, ERV: Retroviren, die durch den Einbau in das Genom von Keimbahnzellen auf die Nachkommen des Wirts vererbt werden.

Epistasis (Epistasie, griechisch): Form der gegenseitigen Beeinflussung von Genen, bei der ein Gen die Ausprägung der äußeren Erscheinung eines anderen Gens beeinflusst, das einem fremden Chromosomenpaar angehört.

Exon: Bereich eines eukaryotischen Gens, der nach dem Spleißen über die mRNA exprimiert wird.

forward Primer: derjenige Primer, der an den die genetische Information enthaltenden Strangteil der DNA-Doppelhelix, den kodogenen oder Sinn-Strang, bindet.

Genetisches Linkage: die Tendenz von kurzen chromosomalen Segmenten, vollständig von einem Elternteil auf das Kind vererbt zu werden. So werden einige Kombinationen von Allelen (Haplotypen) auf diesen Segmenten über viele Generationen konserviert und häufen sich in einer Population.

Haplotyp: Reihe von Allelen, die sich auf miteinander gekoppelten Loci eines einzelnen (väterlichen oder mütterlichen) Chromosoms befinden.

humane endogene Retroviren, HERV: Retroviren innerhalb des menschlichen Genoms, die durch den Einbau in das Genom von Keimbahnzellen auf die Nachkommen des Wirts vererbt werden.

Intron: nichtkodierende DNA, die in einem Gen benachbarte Exons voneinander trennt. Bei der Genexpression werden die Introns transkribiert, jedoch durch den Spleißvorgang aus der prä-mRNA herausgeschnitten und nicht exprimiert.

Klon: Gruppe von genetisch identischen Zellen oder Organismen, die durch Teilung aus einer einzigen Zelle oder einem einzelnen Organismus hervorgegangen sind.

Klonieren: das Erzeugen von identischen Kopien einer DNA bzw. eines DNA-Fragmentes in Wirtszellen.

Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht): die nicht zufällige Assoziation von Allelen zweier getrennter, aber gekoppelter Loci infolge ihrer physikalischen Nähe und dem Fehlen von Rekombination zwischen ihnen.

Locus: Position eines Gens innerhalb des Chromosoms.

long terminal repeats, LTR: Basensequenzen der DNA, die zum Teil auf die Genome von integrierten Retroviren zurückgehen. Sie sind in der Lage, die gewebespezifische Aktivität von Wirtsgenen zu steuern. LTRs können die Transkription initiieren, verstärken, steuern und terminieren.

Mikrosatelliten-DNA: kurze Folge von tandemartigen Wiederholungen einer sehr einfachen DNA-Sequenz, meistens ein bis vier Basenpaare, die zur genetischen Kartierung benutzt werden.

Open reading frame (ORF, offenes Leseraster): DNA-Sequenz mit Start- und Terminationskodon. In einem DNA-Doppelstrang sind sechs verschiedene Leseraster möglich, da jeder Strang drei Leseraster enthalten kann. Der ORF kodiert in einem Gen die Aminosäuresequenz für ein Protein. Er wird umgeben von nicht-codierenden Bereichen eines Gens, der 5' untranslatierten Region (UTR) und der 3' UTR. In diesen Bereichen liegen wichtige Informationen für die Translation des offenen Leseraster.

PBMCs: periphere mononukleäre Zellen des Blutes wie Monozyten, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen.

Plasmid: zirkuläre extrachromosomale DNA-Moleküle, die sich in der Zelle unabhängig vom Wirtsgenom vermehren können.

PolyA⁺-Sequenz: Die PolyA⁺-Sequenz ist eine Kette von Adenin-Nukleotiden, welche an den Endpunkt eukaryotischer mRNA-Moleküle geknüpft wird. Sie wird nicht durch die DNA kodiert, sondern von dem Enzym Poly(A)-Polymerase während der Prozessierung der prä-mRNA im Zellkern an das 3'-Ende der mRNA angeheftet. Die Länge der PolyA⁺-Sequenz variiert dabei von Gen zu Gen, üblich sind etwa 150 bis 200 Nukleotide. Die PolyA⁺-Sequenz wird vom PolyA⁺-Bindeprotein besetzt und ist notwendig für die Initiation der Translation. Bei Eukaryoten schützt sie zusätzlich vor dem Abbau von mRNA.

Primer: kurzes Oligonukleotid, das sich an eine einzelsträngige DNA-Zielsequenz anlagert und so einen Startpunkt für die DNA-Replikation bildet.

Provirus: die DNA-Kopie eines Retrovirusgenoms, die sich in die chromosomale Wirts-DNA integriert hat.

Rekombination: physikalischer Vorgang, der den Austausch von Polynukleotidabschnitten zwischen zwei DNA-Molekülen bewirkt und damit bei einer Kreuzung zu Nachkommen führen kann, die andere Allelkombinationen als die Elternteile besitzen.

Rekombinante DNA: eine künstlich erzeugte Hybrid-DNA, die kovalent verknüpfte Sequenzen aus verschiedenen Ursprüngen enthält; beispielsweise ein Vektor mit einem Insertionsfragment.

Retrotransposition: Variante der Vermehrung integrierter Virus-DNA. Das Provirus wird aus der DNA herausgeschnitten, vermehrt und an verschiedenen Stellen des Genoms wieder integriert.

Retrovirus: RNA-Virus mit einer reversen Transkriptasefunktion, die es ermöglicht, das RNA-Genom in eine cDNA umzuschreiben, die dann in das Wirtszellengenom integriert wird.

reverser Primer: derjenige Primer, der an den nicht-kodogenen Strang, den Anti-Sinn-Strang, bindet.

reverse Transkriptase (RT): Enzym, das anhand einer RNA-Matrize eine DNA-Kopie synthetisiert.

Restriktionsendonuklease: Bakterien-Restriktionsenzym, das DNA an bestimmten Positionen schneidet.

single nucleotide polymorphism, SNP (Einzelnukleotidpolymorphismus): jede polymorphe Variabilität eines einzelnen Nucleotids.

Spleißen: Dabei werden RNA-Sequenzen, die von Introns transkribiert werden, aus dem Primärtranskript herausgeschnitten und verworfen. Die von Exons transkribierten Sequenzen werden folgend in derselben linearen Anordnung wie die Exons in der DNA miteinander verknüpft.

TATA-Box: ein Bereich in vielen Promotoren eukaryontischer Gene mit der Konsensussequenz TATAAA. Diese Sequenz befindet sich meist 25 bis 30-bp vor dem Startkodon. An diese Sequenz bindet das sog. TATA-Box-Bindeprotein, dies ist wichtig für die Ausbildung des Transkriptionsinitiationskomplexes.

Transformation: Aufnahme exogener DNA-Moleküle in eine Wirtszelle.

Vektor: eine Nukleinsäure, die eigenständig repliziert wird und in einer Wirtszelle erhalten bleibt und so diese Eigenschaft jeder DNA-Sequenz verleiht, mit der diese Nukleinsäure verknüpft ist.

9 Literaturverzeichnis

1. **Allen M**, Ishida-Yamamoto A, McGrath J et al. Corneodesmosin expression in psoriasis vulgaris differs from normal skin and other inflammatory skin disorders. *Lab Invest*. 2001 Jul;81(7):969-76.
2. **Allen MH**, Ameen H, Veal C et al. The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2005 Jan;124(1):103-6.
3. **Altschul SF**, Gish W, Miller W et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403-10.
4. **Ameen M**, Allen MH, Fisher SA et al. Corneodesmosin (CDSN) gene association with psoriasis vulgaris in Caucasian but not in Japanese populations. *Clin Exp Dermatol*. 2005 Jul;30(4):414-8.
5. **Andersson ML**, Lindeskog M, Medstrand P et al. Diversity of human endogenous retrovirus class II-like sequences. *J Gen Virol* 1999;80:255-60.
6. **Antony JM**, Deslauriers AM, Bhat RK et al. Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants? *Biochim Biophys Acta*. 2011 Feb;1812(2):162-76. Epub 2010 Aug 6.
7. **Ariza M**, Williams MV. A human endogenous retrovirus K dUTPase triggers a TH1, TH17 cytokine response: does it have a role in psoriasis? *J Invest Dermatol*. 2011 Dec;131(12):2419-27. doi: 10.1038/jid.2011.217. Epub 2011 Jul 21.
8. **Asadullah K**, Sterry W, Stephanek K et al. IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J Clin Invest*. 1998 Feb 15;101(4):783-94.
9. **Asbakk K**, Bergh K, Iversen OJ. The psoriasis-associated antigen, pso p27, participates in the formation of complement activating immune-complexes in psoriatic scale. *APMIS*. 1990 Feb;98(2):143-9.
10. **Asumalahti K**, Laitinen T, Itkonen-Vatjus R et al. A candidate gene for psoriasis near HLA-C, HCR (Pg8), is highly polymorphic with a disease-associated susceptibility allele. *Hum Mol Genet*. 2000 Jun 12;9(10):1533-42. Erratum in: *Hum Mol Genet* 2001 Feb 1;10(3):301.
11. **Asumalahti K**, Veal C, Laitinen T et al., Psoriasis Consortium. Coding haplotype analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus. *Hum Mol Genet*. 2002 Mar 1;11(5):589-97.
12. **Asumalahti K**, Ameen M, Suomela S et al. Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol*. 2003 Apr;120(4):627-32.
13. **Balada E**, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarrés M. Molecular mechanisms mediated by human endogenous retroviruses (HERVs) in autoimmunity. *Rev Med Virol*. 2009 Sep;19(5):273-86. Review.
14. **Baldo AM**, McClure MA. Evolution and horizontal transfer of dUTPase-encoding genes in viruses and their hosts. *J Virol*. 1999 Sep;73(9):7710-21.
15. **Balendran N**, Clough RL, Arguello JR et al. Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. *J Invest Dermatol*. 1999 Sep;113(3):322-8.
16. **Barabas O**, Rumlova M, Erdei A et al. dUTPase and nucleocapsid polypeptides of the Mason-Pfizer monkey virus form a fusion protein in the virion with homotrimeric organization and low catalytic efficiency. *J Biol Chem*. 2003 Oct 3;278(40):38803-12. Epub 2003 Jul 16.
17. **Barbulescu M**, Turner G, Seaman MI et al. Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr Biol*. 1999 Aug 26;9(16):861-8

18. **Bari R**, Leung M, Turner VE et al. Molecular determinant-based typing of KIR alleles and KIR ligands. *Clin Immunol.* 2011 Mar;138(3):274-81. Epub 2011 Jan 15.
19. **Barker JN**. The pathophysiology of psoriasis. *Lancet.* 1991 Jul 27;338(8761):227-30. Review.
20. **Barker JN**. Genetic aspects of psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 2001 Jun;26(4):321-5. Review.
21. **Bata-Csorgo Z**, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD. Intralesional T-lymphocyte activation as a mediator of psoriatic epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol* 1995;105: 89–94S.
22. **Baust C**, Seifarth W, Germaier H et al. HERV-K-T47D-Related long terminal repeats mediate polyadenylation of cellular transcripts. *Genomics.* 2000 May 15;66(1):98-103.
23. **Beckmann L**, Fischer C, Deck KG et al. Exploring haplotype sharing methods in general and isolated populations to detect gene(s) of a complex genetic trait. *Genet Epidemiol.* 2001;21 Suppl 1:S554-9.
24. **Békési A**, Zagyva I, Hunyadi-Gulyás E et al. Developmental regulation of dUTPase in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.* 2004 May 21;279(21):22362-70. Epub 2004 Mar 2.
25. **Belshaw R**, Dawson AL, Woolven-Allen J et al. Genomewide screening reveals high levels of insertional polymorphism in the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML2): implications for present-day activity. *J Virol.* 2005 Oct;79(19):12507-14.
26. **Bengtsson A**, Blomberg J, Nived O et al. Selective antibody reactivity with peptides from human endogenous retroviruses and nonviral poly(amino acids) in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996 Oct;39(10):1654-63.
27. **Bergman AC**, Björnberg O, Nord J et al. The protein p30, encoded at the gag-pro junction of mouse mammary tumor virus, is a dUTPase fused with a nucleocapsid protein. *Virology.* 1994 Oct;204(1):420-4.
28. **Bessis D**, Molès JP, Basset-Séguin N et al. Differential expression of a human endogenous retrovirus E transmembrane envelope glycoprotein in normal, psoriatic and atopic dermatitis human skin. *Br J Dermatol.* 2004 Oct;151(4):737-45.
29. **Bjerke JR**, Krogh HK, Matre R. Characterization of mononuclear cell infiltrates in psoriatic lesions. *J Invest Dermatol.* 1978 Nov;71(5):340-3.
30. **Blomberg J**, Nived O, Pipkorn R et al. Increased antiretroviral antibody reactivity in sera from a defined population of patients with systemic lupus erythematosus. Correlation with autoantibodies and clinical manifestations. *Arthritis Rheum.* 1994 Jan;37(1):57-66.
31. **Blond JL**, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B et al. 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. *J Virol.* 2000 Apr;74(7):3321-9.
32. **Boehncke WH**, Sterry W. Psoriasis - a systemic inflammatory disorder: clinic, pathogenesis and therapeutic perspectives. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2009 Apr 1.
33. **Boller K**, König H, Sauter M, Mueller-Lantzsch N, Löwer R, Löwer J, Kurth R. Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology.* 1993 Sep;196(1):349-53.
34. **Bos JD**, Hagenshaars C, Das PK, Krieg SR, Voorn WJ, Kapsenberg ML. Predominance of "memory" T cells (CD4+, CDw29+) over "naive" T cells (CD4+, CD45R+) in both normal and diseased human skin. *Arch Dermatol Res.* 1989;281(1):24-30.
35. **Botstein D**, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:228–237.
36. **Bowcock AM**, Cookson WO. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum*

Mol Genet. 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R43-55. Review.

37. Bowcock AM, Krueger JG. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol*. 2005 Sep; 5(9):699-711.

38. Boyington JC, Sun PD. A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol*. 2002 May; 38(14):1007-21.

39. Boyman O, Conrad C, Tonel G et al. The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends Immunol*. 2007 Feb;28(2):51-7. Epub 2007 Jan 2.

40. Brandrup F, Holm N, Grunnet N et al. Psoriasis in monozygotic twins: variations in expression in individuals with identical genetic constitution. *Acta Derm Venereol*. 1982;62(3):229-36.

41. Brenner W, Gschnait F, Mayr WR. HLA B13, B17, B37 and Cw6 in psoriasis vulgaris: association with the age of onset. *Arch Dermatol Res*. 1978 Aug 28;262(3):337-9.

42. Brudek T, Christensen T, Hansen HJ et al. Simultaneous presence of endogenous retrovirus and herpes virus antigens has profound effect on cell-mediated immune responses: implications for multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004 Apr; 20(4):415-23.

43. Brudek T, Christensen T, Aagaard L et al. B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity. *Retrovirology*. 2009 Nov 16;6:104.

44. Büscher K, Trefzer U, Hofmann M et al. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):4172-80.

45. Burden AD, Javed S, Bailey M et al. Genetics of psoriasis: paternal inheritance and a locus on chromosome 6p. *J Invest Dermatol*. 1998 Jun;110(6):958-60.

46. Burden AD. Identifying a gene for psoriasis on chromosome 6 (Psors1). *Br J Dermatol*. 2000 Aug;143(2):238-41.

47. Canman CE, Lawrence TS, Shewach DS et al. Resistance to fluorodeoxyuridine-induced DNA damage and cytotoxicity correlates with an elevation of deoxyuridine triphosphatase activity and failure to accumulate deoxyuridine triphosphate. *Cancer Res*. 1993 Nov 1;53(21):5219-24.

48. Canman CE, Radany EH, Parsels LA et al. Induction of resistance to fluorodeoxyuridine cytotoxicity and DNA damage in human tumor cells by expression of Escherichia coli deoxyuridinetriphosphatase. *Cancer Res*. 1994 May 1;54(9):2296-8.

49. Capon F, Novelli G, Semprini S et al. Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. *J Invest Dermatol*. 1999 Jan; 112(1):32-5.

50. Capon F, Dallapiccola B, Novelli G. Advances in the search for psoriasis susceptibility genes. *Mol Genet Metab*. 2000 Sep-Oct;71(1-2):250-5. Review.

51. Capon F, Munro M, Barker J, Trembath R. Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene. *J Invest Dermatol*. 2002 May;118(5):745-51. Review.

52. Capon F, Toal IK, Evans JC et al. Haplotype analysis of distantly related populations implicates corneodesmosin in psoriasis susceptibility. *J Med Genet*. 2003 Jun;40(6):447-52.

53. Capon F, Di Meglio P, Szaub J et al. Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum Genet*. 2007 Sep;122(2):201-6. Epub 2007 Jun 22.

54. Caradonna S, Muller-Weeks S. The nature of enzymes involved in uracil-DNA repair: isoform characteristics of proteins responsible for nuclear and mitochondrial genomic integrity. *Curr Protein Pept Sci*. 2001 Dec; 2(4):335-47.

- 55. Cargill M**, Schrodli SJ, Chang M et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet.* 2007 Feb;80(2):273-90. Epub 2006 Dec 21.
- 56. Carlén L**, Sakuraba K, Ståhle M, Sánchez F. HLA-C expression pattern is spatially different between psoriasis and eczema skin lesions. *J Invest Dermatol.* 2007 Feb;127(2):342-8. Epub 2006 Sep 28.
- 57. Chang JC**, Smith LR, Froning KJ et al. CD8+ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V beta 3 and/or V beta 13.1 genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 Sep 27;91(20):9282-6.
- 58. Chang YT**, Tsai SF, Lee DD et al. A study of candidate genes for psoriasis near HLA-C in Chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2003(a) Mar;148(3):418-23.
- 59. Chang YT**, Tsai SF, Lin MW et al. SPR1 gene near HLA-C is unlikely to be a psoriasis susceptibility gene. *Exp Dermatol.* 2003(b) Jun;12(3):307-14.
- 60. Chang YT**, Shiao YM, Chin PJ et al. Genetic polymorphisms of the HCR gene and a genomic segment in close proximity to HLA-C are associated with patients with psoriasis in Taiwan. *Br J Dermatol.* 2004 Jun;150(6):1104-11.
- 61. Chang YT**, Liu HN, Shiao YM et al. A study of PSORS1C1 gene polymorphisms in Chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2005 Jul;153(1):90-6.
- 62. Chang YT**, Chou CT, Shiao YM et al. Psoriasis vulgaris in Chinese individuals is associated with PSORS1C3 and CDSN genes. *Br J Dermatol.* 2006 Oct;155(4):663-9.
- 63. Chang YT**, Chou CT, Yu CW et al. Cytokine gene polymorphisms in Chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2007(a) May;156(5):899-905. Epub 2007 Mar 28.
- 64. Chang YT**, Hsu CY, Chou CT et al. The genetic polymorphisms of POU5F1 gene are associated with psoriasis vulgaris in Chinese. *J Dermatol Sci.* 2007(b) May;46(2):153-6. Epub 2007 Feb 20.
- 65. Chelly J**, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Apr;86(8):2617-21.
- 66. Chen R**, Wang H, Mansky LM. Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication. *J Gen Virol.* 2002 Oct;83(Pt 10):2339-45.
- 67. Chia NV**, Stuart P, Nair RP et al. Variations in the HCR (Pg8) gene are unlikely to be causal for familial psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2001 May;116(5):823-4.
- 68. Christensen T**, Pedersen L, Sørensen PD, Møller-Larsen A. A transmissible human endogenous retrovirus. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002 Aug 10;18(12):861-6.
- 69. Coffin JM** (1992). *Strukture and classification of retroviruses. Vol.1*", Levy, J.A. (ed), Plenum Press, New York, pp. 19-50.
- 70. Conrad B**, Weissmahr RN, Böni J et al. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell.* 1997 Jul 25;90(2):303-13.
- 71. Dalen AB**, Hellgren L, Iversen OJ, Vincent J. A virus-like particle associated with psoriasis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B.* 1983 Aug;91(4):221-9.
- 72. Dauter Z**, Persson R, Rosengren AM et al. Crystal structure of dUTPase from equine infectious anaemia virus; active site metal binding in a substrate analogue complex. *J Mol Biol.* 1999 Jan 15;285(2):655-73.
- 73. Degli-Esposti MA**, Leaver AL, Christiansen FT et al. Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes. *Hum Immunol.* 1992 Aug;34(4):242-52.

- 74. de Parseval N**, Heidmann T. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet Genome Res.* 2005;110(1-4):318-32. Review.
- 75. di Marzo Veronese F**, Copeland TD, DeVico AL et al. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science.* 1986 Mar 14;231(4743):1289-91.
- 76. Duffy DL**, Spelman LS, Martin NG. Psoriasis in Australian twins. *J Am Acad Dermatol.* 1993 Sep;29(3):428-34.
- 77. Elder JH**, Lerner DL, Hasselkus-Light CS et al. Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase. *J Virol.* 1992 Mar;66(3):1791-4.
- 78. Elder JT**, Nair RP, Guo SW et al. The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol.* 1994 Feb;130(2):216-24. Review.
- 79. Elder JT**, Nair RP, Henseler T et al. The genetics of psoriasis 2001: the odyssey continues. *Arch Dermatol.* 2001 Nov;137(11):1447-54. Review.
- 80. Elder JT**. Genome-wide association scan yields new insights into the immunopathogenesis of psoriasis. *Genes Immun.* 2009 Apr;10(3):201-9. Epub 2009 Mar 5.
- 81. Elder JT**, Bruce AT, Gudjonsson JE et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol.* 2010 May;130(5):1213-26. Epub 2009 Oct 8. Review.
- 82. el-Hajj HH**, Zhang H, Weiss B. Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1988 Mar;170(3):1069-75.
- 83. Ellis CN**, Gorsulowsky DC, Hamilton TA et al. Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. *JAMA.* 1986 Dec 12;256(22):3110-6.
- 84. Elomaa O**, Majuri I, Suomela S et al. Transgenic mouse models support HCR as an effector gene in the PSORS1 locus. *Hum Mol Genet.* 2004 Aug 1;13(15):1551-61. Epub 2004 Jun 9.
- 85. Enerbäck C**, Martinsson T, Inerot A et al. Evidence that HLA-Cw6 determines early onset of psoriasis, obtained using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Acta Derm Venereol.* 1997(a) Jul;77(4):273-6.
- 86. Enerbäck C**, Martinsson T, Inerot A et al. Significantly earlier age at onset for the HLA-Cw6-positive than for the Cw6-negative psoriatic sibling. *J Invest Dermatol.* 1997(b) Nov;109(5):695-6.
- 87. Enerbäck C**, Nilsson S, Enlund F et al. Stronger association with HLA-Cw6 than with corneodesmosin (S-gene) polymorphisms in Swedish psoriasis patients. *Arch Dermatol Res.* 2000 Nov;292(11):525-30.
- 88. Enlund F**, Samuelsson L, Enerbäck C et al. Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. *Eur J Hum Genet.* 1999 Oct-Nov;7(7):783-90.
- 89. Fan X**, Yang S, Huang W et al. Fine mapping of the psoriasis susceptibility locus PSORS1 supports HLA-C as the susceptibility gene in the Han Chinese population. *PLoS Genet.* 2008 Mar 21;4(3):e1000038. Epub 2008 Mar 21.
- 90. Farber EM**, Nall ML, Watson W. Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Arch Dermatol.* 1974 Feb;109(2):207-11.
- 91. Farber EM**, Nall ML (1974). The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica* 148:1-18.
- 92. Feng BJ**, Sun LD, Soltani-Arabshahi R et al. Multiple Loci within the major histocompatibility complex confer risk of psoriasis. *PLoS Genet.* 2009 Aug;5(8):e1000606. Epub 2009 Aug 14.

- 93. Fleischmann J**, Kremmer E, Müller S et al. Expression of deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) in colorectal tumours. *Int J Cancer*. 1999 Dec 22;84(6):614-7.
- 94. Fleischmann J**, Kremmer E, Greenspan JS et al. Expression of viral and human dUTPase in Epstein-Barr virus-associated diseases. *J Med Virol*. 2002 Dec;68(4):568-73.
- 95. Flockerzi A**, Ruggieri A, Frank O et al. Expression patterns of transcribed human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) loci in human tissues and the need for a HERV Transcriptome Project. *BMC Genomics*. 2008 Jul 29;9:354.
- 96. Foerster J**, Nolte I, Junge J et al. Haplotype sharing analysis identifies a retroviral dUTPase as candidate susceptibility gene for psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2005 Jan;124(1):99-102.
- 97. Frohman MA**, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(23):8998-9002.
- 98. Gadsden MH**, McIntosh EM, Game JC et al. dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1993 Nov;12(11):4425-31.
- 99. 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 Apr 28;24(19):3223-8.
- 100. Gaspari AA**. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2006 Mar;54(3 Suppl 2):S67-80. Review.
- 101. Ghoreschi K**, Thomas P, Breit S et al. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med*. 2003 Jan;9(1):40-6. Epub 2002 Dec 2.
- 102. Gladman DD**, Antoni C, Mease P et al. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann Rheum Dis* 2005;64(Suppl 2):ii14–17.
- 103. Glaser R**, Litsky ML, Padgett DA et al. EBV-encoded dUTPase induces immune dysregulation: Implications for the pathophysiology of EBV-associated disease. *Virology*. 2006 Mar 1;346(1):205-18.
- 104. Gonzalez S**, Martinez-Borra J, Del Rio JS et al. The OTF3 gene polymorphism confers susceptibility to psoriasis independent of the association of HLA-Cw*0602. *J Invest Dermatol*. 2000 Nov;115(5):824-8.
- 105. Gottlieb AB**, Krueger JG. HLA region genes and immune activation in the pathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol*. 1990 Aug;126(8):1083-6. Review.
- 106. Gottlieb AB**, Lebwohl M, Shirin S et al. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: results of a pilot, multicenter, multiple-dose, placebo-controlled study. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Oct;43(4):595-604.
- 107. Goulian M**, Bleile BM, Dickey LM et al. Mechanism of thymineless death. *Adv Exp Med Biol*. 1986;195 Pt B:89-95.
- 108. Grafstrom RH**, Tseng BY, Goulian M. The incorporation of uracil into animal cell DNA in vitro. *Cell*. 1978 Sep;15(1):131-40.
- 109. Griffiths CE**, Powles AV, Leonard JN et al. Clearance of psoriasis with low dose cyclosporin. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986 Sep 20;293(6549):731-2.
- 110. Griffiths CE**, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*. 2007 Jul 21; 370 (9583):263–271.

- 111. Griffiths DJ.** Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol.* 2001;2(6):REVIEWS 1017. Epub 2001 Jun 5. Review.
- 112. Gudjonsson JE,** Karason A, Antonsdottir A et al. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *Br J Dermatol.* 2003 Feb;148(2):233-5.
- 113. Gudjonsson JE,** Elder JT (2007) Psoriasis. In: Fitzpatrick's Dermatology in General medicine /WolffK, Goldsmith LA, Katz Si, Gildchrest BA, Paller AM, Leffell DJ, eds). Vol.1, New York: McGraw-Hill, 169-94.
- 114. Gupta MA,** Schork NJ, Gupta AK et al. Suicidal ideation in psoriasis. *Int J Dermatol.* 1993 Mar;32(3):188-90.
- 115. Harris JM,** Haynes RH, McIntosh EM. A consensus sequence for a functional human endogenous retrovirus K (HERV-K) dUTPase. *Biochem Cell Biol.* 1997;75(2):143-51.
- 116. Harris JM,** McIntosh EM, Muscat GE. Structure/function analysis of a dUTPase: catalytic mechanism of a potential chemotherapeutic target. *J Mol Biol.* 1999 Apr 30;288(2):275-87.
- 117. Harris JM,** McIntosh EM, Muscat GE. Expression and cytoplasmic localisation of deoxyuridine triphosphate pyrophosphatase encoded by a human endogenous retrovirus. *Arch Virol.* 2000;145(2):353-63.
- 118. Hartung K,** Baur MP, Coldewey R et al. Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study. *J Clin Invest.* 1992 Oct;90(4):1346-51.
- 119. Henseler T,** Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol.* 1985 Sep;13(3):450-6.
- 120. Herve CA,** Lugli EB, Brand A et al. Autoantibodies to human endogenous retrovirus-K are frequently detected in health and disease and react with multiple epitopes. *Clin Exp Immunol.* 2002 Apr;128(1):75-82.
- 121. Hoede K.** The problem of heredity of psoriasis. *Hautarzt.* 1957 Oct;8(10):433-8. German.
- 122. Hohenadl C,** Germaier H, Walchner M et al. Transcriptional activation of endogenous retroviral sequences in human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 1999;113: 587-94.
- 123. Holm SJ,** Carlén LM, Mallbris L et al. Polymorphisms in the SEEK1 and SPR1 genes on 6p21.3 associate with psoriasis in the Swedish population. *Exp Dermatol.* 2003 Aug;12(4):435-44.
- 124. Holm SJ,** Sánchez F, Carlén LM et al. HLA-Cw*0602 associates more strongly to psoriasis in the Swedish population than variants of the novel 6p21.3 gene PSORS1C3. *Acta Derm Venereol.* 2005;85(1):2-8.
- 125. Hui J,** Oka A, Tamiya G et al. Corneodesmosin DNA polymorphisms in MHC haplotypes and Japanese patients with psoriasis. *Tissue Antigens.* 2002 Jul;60(1):77-83. Erratum in: *Tissue Antigens.* 2003 Feb;61(2):184-5.
- 126. Iversen OJ,** Lysvand H, Bergh K et al. The N-terminal amino acid sequence of the psoriasis-associated antigen, pso p27. *Arch Dermatol Res.* 1995;287(8):761-3.
- 127. Jenisch S,** Henseler T, Nair RP et al. Linkage analysis of human leukocyte antigen (HLA) markers in familial psoriasis: strong disequilibrium effects provide evidence for a major determinant in the HLA-B/-C region. *Am J Hum Genet.* 1998 Jul;63(1):191-9.
- 128. Jenisch S,** Westphal E, Nair RP et al. Linkage disequilibrium analysis of familial psoriasis: identification of multiple disease-associated MHC haplotypes. *Tissue Antigens.* 1999(a) Feb;53(2):135-

46.

129. Jenisch S, Koch S, Henseler T et al. Corneodesmosin gene polymorphism demonstrates strong linkage disequilibrium with HLA and association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens*. 1999(b) Nov;54(5):439-49.

130. Kaiser R, Criswell LA. Genetics research in systemic lupus erythematosus for clinicians: methodology, progress, and controversies. *Curr Opin Rheumatol*. 2010 Mar; 22(2):119-25.

131. Katsumata K, Ikeda H, Sato M et al. Cytokine regulation of env gene expression of human endogenous retrovirus-R in human vascular endothelial cells. *Clin Immunol*. 1999 Oct;93(1):75-80.

132. Kidwell MG, Lisch DR. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution*. 2001 Jan;55(1):1-24. Review.

133. Kitamura Y, Ayukawa T, Ishikawa T et al. Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *J Virol*. 1996 May;70(5):3302-6.

134. Krokkan HE, Drabløs F, Slupphaug G. Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair. *Oncogene*. 2002 Dec 16;21(58):8935-48.

135. Ladner RD, McNulty DE, Carr SA et al. Characterization of distinct nuclear and mitochondrial forms of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase. *J Biol Chem*. 1996 Mar 29;271(13):7745-51.

136. Ladner RD, Caradonna SJ. The human dUTPase gene encodes both nuclear and mitochondrial isoforms. Differential expression of the isoforms and characterization of a cDNA encoding the mitochondrial species. *J Biol Chem*. 1997 Jul 25;272(30):19072-80.

137. Ladner RD, Lynch FJ, Groshen S et al. dUTP nucleotidohydrolase isoform expression in normal and neoplastic tissues: association with survival and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2000 Jul 1; 60(13):3493-503.

138. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*. 1994 Sep 30;265(5181):2037-48. Review. Erratum in: *Science* 1994 Oct 21;266(5184):353.

139. Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921. Erratum in: *Nature* 2001 Aug 2;412(6846):565. *Nature* 2001 Jun 7;411(6838):720. Szustakowki, J [corrected to Szustakowski, J].

140. Lawoko A, Johansson B, Rabinakaran D et al. Increased immunoglobulin G, but not M, binding to endogenous retroviral antigens in HIV-1 infected persons. *J Med Virol*. 2000 Dec;62(4):435-44.

141. Leder RO, Mansbridge JN, Hallmayer J, Hodge SE. Familial psoriasis and HLA-B: unambiguous support for linkage in 97 published families. *Hum Hered*. 1998 Jul-Aug;48(4):198-211. Review.

142. Lee YA, Rüschemdorf F, Windemuth C et al. Genomewide scan in german families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. *Am J Hum Genet*. 2000 Oct;67(4):1020-4. Epub 2000 Sep 13.

143. Leib-Mösch C, Brack-Werner R, Werner T et al. Endogenous retroviral elements in human DNA. *Cancer Res*. 1990 Sep 1;50 17 Suppl): 5636S-5642S.

144. Leib-Mösch C, Haltmeier M, Werner T et al. Genomic distribution and transcription of solitary HERV-K LTRs. *Genomics*. 1993 Nov;18(2):261-9.

145. Leib-Mösch C, Seifarth W, Schon U. Influence of human endogenous retroviruses on cellular gene expression. In: Sverdlov E, editor. *Retroviruses and Primate Genome*. Evolution: Eureka.com;2005. pp. 123-143.

146. Lench N, Iles MM, Mackay I, Patel R et al. Single-point haplotype scores telomeric to human

leukocyte antigen-C give a high susceptibility major histocompatibility complex haplotype for psoriasis in a Caucasian population. *J Invest Dermatol.* 2005 Mar;124(3):545-52.

147. Lichtenstein DL, Rushlow KE, Cook RF et al. Replication in vitro and in vivo of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity. *J Virol.* 1995 May;69(5):2881-8.

148. Liu Y, Krueger JG, Bowcock AM. Psoriasis: genetic associations and immune system changes. *Genes Immun.* 2007 Jan;8(1):1-12. Epub 2006 Nov 9. Review.

149. Liu Y, Helms C, Liao W et al. A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet.* 2008 Mar 28;4(3):e1000041. Epub 2008 Mar 28.

150. Löwer R, Löwer J, Frank H et al. Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J Gen Virol.* 1984 May;65 (Pt 5):887-98.

151. Löwer R, Löwer J, Tondera-Koch C, Kurth R. A general method for the identification of transcribed retrovirus sequences (R-U5 PCR) reveals the expression of the human endogenous retrovirus loci HERV-H and HERV-K in teratocarcinoma cells. *Virology.* 1993 Feb;192(2):501-11.

152. Löwer R, Tönjes RR, Korbmacher C et al. Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J Virol.* 1995 Jan;69(1):141-9.

153. 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 U S A.* 1996 May 28;93(11):5177-84.

154. Löwer R. The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *Trends Microbiol.* 1999 Sep;7(9):350-6. Review.

155. Lomholt G. Psoriasis: Prevalence, Sontaneous Course and Genetics. Copenhagen: GEC GAD, 1963.

156. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature.* 2007 Feb 22;445(7130):866-73. Review.

157. Mager DL, Hunter DG, Schertzer M, Freeman JD. Endogenous retroviruses provide the primary polyadenylation signal for two new human genes (HHLA2 and HHLA3) *Genomics.* 1999;59:255–263.

158. Majewski S, Favre M, Orth G, Jablonska S. Specific human papillomaviruses could participate in epidermal hyperproliferation and autoimmune phenomena in psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 2001 Aug-Sep;81(4):312.

159. Mallon E, Bunce M, Wojnarowska F, Welsh K. HLA-CW*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis, and evidence Ala-73 is increased in male type I psoriatics. *J Invest Dermatol.* 1997 Aug;109(2):183-6.

160. Mallon E, Newson R, Bunker CB. HLA-Cw6 and the genetic predisposition to psoriasis: a meta-analysis of published serologic studies. *J Invest Dermatol.* 1999 Oct;113(4):693-5.

161. Marguerat S, Wang WY, Todd JA, Conrad B. Association of human endogenous retrovirus K-18 polymorphisms with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2004 Mar;53(3):852-4.

162. Martinez-Borra J, Gonzalez S, Santos-Juanes J et al. Psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis share a 100 kb susceptibility region telomeric to HLA-C. *Rheumatology (Oxford).* 2003 Sep;42(9):1089-92. Epub 2003 Apr 30.

163. Martínez-Borra J, Brautbar C, González S et al. The region of 150 kb telomeric to HLA-C is associated with psoriasis in the Jewish population. *J Invest Dermatol.* 2005 Nov;125(5):928-32.

164. Matsumoto M, Zhou Y, Matsuo S et al. Targeted deletion of the murine corneodesmosin gene delineates its essential role in skin and hair physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 May

6;105(18):6720-4. Epub 2008 Apr 24.

165. Matthews D, Fry L, Powles A et al. Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. *Nat Genet.* 1996 Oct; 14(2):231-3.

166. Mayer J, Sauter M, Racz A et al. An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nat Genet.* 1999 Mar;21(3):257-8.

167. Mayer J, Meese EU. Presence of dUTPase in the various human endogenous retrovirus K (HERV-K) families. *J Mol Evol.* 2003 Dec;57(6):642-9.

168. Mayer J, Meese E. Human endogenous retroviruses in the primate lineage and their influence on host genomes. *Cytogenet Genome Res.* 2005;110(1-4):448-56. Review.

169. McGeoch DJ. Protein sequence comparisons show that the 'pseudoproteases' encoded by poxviruses and certain retroviruses belong to the deoxyuridine triphosphatase family. *Nucleic Acids Res.* 1990 Jul 25;18(14):4105-10.

170. McIntosh EM, Ager DD, Gadsden MH, Haynes RH. Human dUTP pyrophosphatase: cDNA sequence and potential biological importance of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Sep 1;89(17):8020-4. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 May 1;90(9):4328.

171. McIntosh EM, Haynes RH. dUTP pyrophosphatase as a potential target for chemotherapeutic drug development. *Acta Biochim Pol.* 1997;44(2):159-71. Review.

172. Medstrand P, Lindeskog M, Blomberg J. Expression of human endogenous retroviral sequences in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals. *J Gen Virol.* 1992 Sep;73 (Pt 9):2463-6.

173. Medstrand P, Blomberg J. Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and B retrovirus: differential transcription in normal human tissues. *J Virol* 1993;67:6778-87.

174. Medstrand P, Mager DL. Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family. *J Virol.* 1998 Dec;72(12):9782-7.

175. Medstrand P, Landry JR, Mager DL. Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. *J Biol Chem.* 2001;276:1896-1903.

176. Mi S, Lee X, Li X et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature.* 2000 Feb 17;403(6771):785-9.

177. Mol CD, Harris JM, McIntosh EM, Tainer JA. Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits. *Structure.* 1996 Sep 15;4(9):1077-92.

178. Molès JP, Tesniere A, Guilhou JJ. Expression of new endogenous retroviral sequences in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2000;115:576 (Abstr.).

179. Molès JP, Hadi JC, Guilhou JJ. High prevalence of an IgG response against murine leukemia virus (MLV) in patients with psoriasis. *Virus Res.* 2003 Aug;94(2):97-101.

180. Molès JP, Tesniere A, Guilhou JJ. A new endogenous retroviral sequence is expressed in skin of patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2005 Jul;153(1):83-9.

181. Molès JP, Tesniere A, Guilhou JJ. Reverse transcriptase activity in human normal and psoriatic skin samples. *Br J Dermatol.* 2007 Sep;157(3):482-6. Epub 2007 Jul 5.

182. Moore R, Dixon M, Smith R et al. 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.* 1987 Feb;61(2):480-90.

183. Morhenn V, Engleman E, Farber EM. Significance of HLA antigens and the mixed lymphocyte

reaction in psoriasis. *Acta Derm Venereol Suppl* (Stockh). 1979;87:12-4.

184. Moyes D, Griffiths DJ, Venables PJ. Insertional polymorphisms: a new lease of life for endogenous retroviruses in human disease. *Trends Genet*. 2007 Jul;23(7):326-33. Epub 2007 May 23. Review.

185. Mueller-Lantzsch N, Sauter M, Weiskircher A et al. Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1993 Apr;9(4):343-50.

186. Mullis K, Faloona F, Scharf S et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.

187. Muradrasoli S, Forsman A, Hu L et al. Development of real-time PCRs for detection and quantitation of human MMTV-like (HML) sequences HML expression in human tissues. *J Virol Methods*. 2006 Sep;136(1-2):83-92. Epub 2006 May 19.

188. Nair RP, Henseler T, Jenisch S et al. Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Mol Genet*. 1997 Aug;6(8):1349-56.

189. Nair RP, Stuart P, Henseler T et al. Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am J Hum Genet*. 2000 Jun;66(6):1833-44. Epub 2000 May 05. Erratum in: *Am J Hum Genet* 2002 Apr;70(4):1074.

190. Nair RP, Stuart PE, Nistor I et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet*. 2006 May;78(5):827-51. Epub 2006 Mar 31.

191. Nair RP, Ruether A, Stuart PE et al. Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2008 Jul;128(7):1653-61. Epub 2008 Jan 24.

192. Nair RP, Duffin KC, Helms C et al. Collaborative Association Study of Psoriasis. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet*. 2009 Feb;41(2):199-204. Epub 2009 Jan 25.

193. Nakagawa K, Harrison LC. The potential roles of endogenous retroviruses in autoimmunity. *Immunol Rev*. 1996 Aug;152:193-236.

194. Nelson PN, Carnegie PR, Martin J et al. (2003). Demystified. Human endogenous retroviruses. *J Clin Pathol:Mol Pathol*:56:11-18.

195. Nickoloff BJ, Wrone-Smith T. Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol*. 1999 Jul;155(1):145-58.

196. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol*. 2008 Nov;159(5):1092-102. Epub 2008 Aug 5.

197. Nolte IM, te Meerman GJ. The probability that similar haplotypes are identical by descent. *Ann Hum Genet*. 2002 May;66(Pt 3):195-209.

198. O'Brien KP, Holm SJ, Nilsson S et al. The HCR gene on 6p21 is unlikely to be a psoriasis susceptibility gene. *J Invest Dermatol*. 2001 May;116(5):750-4.

199. Ockenfels HM. [Triggerfactors for psoriasis]. *Hautarzt*. 2003 Mar; 54(3): 215-23. Epub 2003 Feb 21. German.

200. Oka A, Tamiya G, Tomizawa M et al. Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptibility locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric to the HLA-C gene. *Hum Mol Genet*. 1999 Nov;8(12):2165-70.

201. Oliveros M, Garcia-Escudero R, Alejo A et al. African swine fever virus dUTPase is a highly

specific enzyme required for efficient replication in swine macrophages. *J Virol.* 1999 Nov;73(11):8934-43.

202. Ono M, Kawakami M, Ushikubo H. Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol.* 1987 Jun;61(6):2059-62.

203. Oroszlan S, Luftig RB. Retroviral proteinases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;157:153-85.

204. Orru S, Giuressi E, Casula M et al. Psoriasis is associated with a SNP haplotype of the corneodesmosin gene (CDSN). *Tissue Antigens.* 2002 Oct;60(4):292-8.

205. Orru S, Giuressi E, Carcassi C et al. Mapping of the major psoriasis-susceptibility locus (PSORS1) in a 70-Kb interval around the corneodesmosin gene (CDSN). *Am J Hum Genet.* 2005 Jan;76(1):164-71. Epub 2004 Nov 04.

206. Pasić A, Lipozencić J, Ceović R, Kostović K. The genetics of psoriasis--selected novelties in 2008. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2009;17(3):176-81. Review.

207. Patience C, Simpson GR, Colletta AA et al. Human endogenous retrovirus expression and reverse transcriptase activity in the T47D mammary carcinoma cell line. *J Virol.* 1996 Apr;70(4):2654-7.

208. Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M et al. Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology.* 2001 Sep 1;287(2):321-32.

209. Perron H, Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010 Aug; 39(1):51-61.

210. Persson R, Cedergren-Zeppezauer ES, Wilson KS. Homotrimeric dUTPases; structural solutions for specific recognition and hydrolysis of dUTP. *Curr Protein Pept Sci.* 2001 Dec; 2(4):287-300.

211. Piskin G, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Teunissen MB. In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J Immunol.* 2006 Feb 1;176(3):1908-15.

212. Prasad GS, Stura EA, McRee DE et al. Crystal structure of dUTP pyrophosphatase from feline immunodeficiency virus. *Protein Sci.* 1996 Dec; 5(12):2429-37.

213. Preston VG, Fisher FB. Identification of the herpes simplex virus type 1 gene encoding the dUTPase. *Virology.* 1984 Oct 15; 138(1):58-68.

214. Prinz JC, Gross B, Vollmer S et al. T cell clones from psoriasis skin lesions can promote keratinocyte proliferation in vitro via secreted products. *Eur J Immunol.* 1994 Mar;24(3):593-8.

215. Prinz JC. The role of T cells in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003 May;17(3):257-70. Review.

216. Reich K, Krüger K, Mössner R, Augustin M. Epidemiology and clinical pattern of psoriatic arthritis in Germany: a prospective interdisciplinary epidemiological study of 1511 patients with plaque-type psoriasis. *Br J Dermatol.* 2009 May;160(5):1040-7. Epub 2009 Feb 4.

217. Reus K, Mayer J, Sauter M et al. Genomic organization of the human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2.HOM) (ERVVK6) on chromosome 7. *Genomics.* 2001 Mar 15;72(3):314-20.

218. Romphruk AV, Oka A, Romphruk A et al. Corneodesmosin gene: no evidence for PSORS 1 gene in North-eastern Thai psoriasis patients. *Tissue Antigens.* 2003 Sep; 62(3):217-24.

219. Russell TJ, Schultes LM, Kuban DJ. Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis.

N Engl J Med. 1972 Oct 12;287(15):738-40.

220. Sánchez F, Holm SJ, Mallbris L et al. STG does not associate with psoriasis in the Swedish population. *Exp Dermatol*. 2004 Jul;13(7):413-8.

221. 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 Jan;69(1):414-21.

222. Schmitt-Egenolf M, Boehncke WH, Ständer M et al. Oligonucleotide typing reveals association of type I psoriasis with the HLA-DRB1*0701/2, -DQA1*0201, -DQB1*0303 extended haplotype. *J Invest Dermatol*. 1993 Jun;100(6):749-52.

223. Schmitt-Egenolf M, Eiermann TH, Boehncke WH et al. Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigen (HLA) class I side of the extended haplotype Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303: a population- and family-based study. *J Invest Dermatol*. 1996 Apr;106(4):711-4.

224. Schmitt-Egenolf M, Windemuth C, Hennies HC et al. Comparative association analysis reveals that corneodesmosin is more closely associated with psoriasis than HLA-Cw*0602-B*5701 in German families. *Tissue Antigens*. 2001 May;57(5):440-6.

225. Skov L, Baadsgaard O. Bacterial superantigens and inflammatory skin diseases. *Clin Exp Dermatol*. 2000 Jan;25(1):57-61. Review.

226. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*. 1993 Mar;52(3):506-16.

227. Steagall WK, Robek MD, Perry ST et al. Incorporation of uracil into viral DNA correlates with reduced replication of EIAV in macrophages. *Virology*. 1995 Jul 10;210(2):302-13.

228. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*. 2007 Feb;13(2):139-45. Review. Erratum in: *Nat Med*. 2007 Mar;13(3):385.

229. Strahler JR, Zhu XX, Hora N et al. Maturation stage and proliferation-dependent expression of dUTPase in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 1;90(11):4991-5.

230. Suomela S, Elomaa O, Asumalahti K et al. HCR, a candidate gene for psoriasis, is expressed differently in psoriasis and other hyperproliferative skin disorders and is downregulated by interferon-gamma in keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2003 Dec;121(6):1360-4.

231. Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity*. 2001 Oct; 15(4):579-89.

232. Sverdllov ED. Retroviruses and primate evolution. *Bioessays*. 2000 Feb;22(2):161-71. Review.

233. Szabo SK, Hammerberg C, Yoshida Y et al. Identification and quantitation of interferon-gamma producing T cells in psoriatic lesions: localization to both CD4+ and CD8+ subsets. *J Invest Dermatol*. 1998 Dec;111(6):1072-8.

234. Takahata N, Satta Y. Evolution of the primate lineage leading to modern humans: phylogenetic and demographic inferences from DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 29;94(9):4811-5.

235. te Meerman GJ, van der Meulen MA, Sandkuijl LA. Perspectives of identity by descent (IBD) mapping in founder populations. *Clin Exp Allergy*. 1995 Nov;25 Suppl 2:97-102.

236. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 1970 Jun 27;226(5252):1211-3. No abstract available. Erratum in: *Nature*. 1970 Jul 4;227(5253):102.

237. Teraoka Y, Naruse TK, Oka A et al. Genetic polymorphisms in the cell growth regulated gene, SC1

telomeric of the HLA-C gene and lack of association of psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens*. 2000 Mar;55(3):206-11.

238. The International Psoriasis Genetics Consortium. The international psoriasis genetics study: Assessing linkage to 14 candidate susceptibility loci in a cohort of 942 affected sib pairs. *Am J Hum Genet* 2003 73:430–437,10.1086/377159.

239. The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*. 1999 Oct 28; 401(6756):921-3.

240. Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J et al. Psoriasis and HLA-Cw6. *Br J Dermatol*. 1980 Feb;102(2):179-84.

241. Tönjes RR, Lower R, Boller K et al. HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;13:S261–7.

242. Tönjes RR, Czauderna F, Kurth R. Genome-wide screening, cloning, chromosomal assignment, and expression of full-length human endogenous retrovirus type K. *J Virol*. 1999 Nov;73 (11): 9187-95.

243. Tomfohrde J, Silverman A, Barnes R et al. Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science*. 1994 May 20;264(5162):1141-5.

244. Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL et al. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet*. 1997 May;6(5):813-20.

245. Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD. Map of the human MHC. *Immunol Today*. 1991 Dec;12(12):443-6.

246. Tsuji K, Inouye H, Nose Y Further study on HLA-A, B, C, D, DR and haplotype antigen frequencies in psoriasis vulgaris. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1979;87:107-8.

247. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (1992) HLA 1991: Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference. Vol. 1. Oxford University Press, Oxford, pp 1091–1093.

248. Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K et al. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci*. 2002 Nov;30(2):161-6.

249. Turelli P, Petursson G, Guiguen F et al. Replication properties of dUTPase-deficient mutants of caprine and ovine lentiviruses. *J Virol*. 1996 Feb;70(2):1213-7.

250. Turner G, Barbulescu M, Su M et al. Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol*. 2001 Oct 2;11(19):1531-5.

251. Tye BK, Lehman IR. Excision repair of uracil incorporated in DNA as a result of a defect in dUTPase. *J Mol Biol*. 1977 Dec 5;117(2):293-306.

252. van der Meulen MA, te Meerman GJ. Haplotype sharing analysis in affected individuals from nuclear families with at least one affected offspring. *Genet Epidemiol*. 1997;14(6):915-20.

253. Vértessy BG, Tóth J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res*. 2009 Jan 20; 42(1):97-106.

254. Walchner M, Leib-Mosch C, Messer G, Kind P. [Endogenous retroviral sequences as a factor in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus] *Hautarzt*. 1996 Jul;47(7):502-9. Review. German.

255. Waldman WJ, Williams MV Jr, Lemeshow S et al. Epstein-Barr virus-encoded dUTPase enhances proinflammatory cytokine production by macrophages in contact with endothelial cells: evidence for depression-induced atherosclerotic risk. *Brain Behav Immun*. 2008 Feb;22(2):215-23. Epub 2007 Sep 12.

- 256. Walsh EC**, Mather KA, Schaffner SF et al. An integrated haplotype map of the human major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet.* 2003 Sep;73(3):580-90. Epub 2003 Aug.
- 257. Wang-Johanning F**, Frost AR, Johanning GL et al. Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;7(6):1553-60.
- 258. Wang-Johanning F**, Liu J, Rycaj K et al. Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2007 Jan 1;120(1):81-90.
- 259. Warner HR**, Duncan BK. In vivo synthesis and properties of uracil-containing DNA. *Nature.* 1978 Mar 2;272(5648):32-4.
- 260. Weinshenker BG**, Bass BH, Ebers GC, Rice GP. Remission of psoriatic lesions with muromonab-CD3 (orthoclone OKT3) treatment. *J Am Acad Dermatol.* 1989 Jun;20(6):1132-3.
- 261. Wildin RS**, Garvin AM, Pawar S et al. Developmental regulation of Ick gene expression in T lymphocytes. *J Exp Med.* 1991 Feb 1; 173(2):383-93.
- 262. Wilkinson DA**, Mager DL, Leong JAC. Endogenous human retroviruses. In: Levy JA, ed. *The retroviridae*, Vol. 3. New York: Plenum Press, 1994:465–535.
- 263. Williams MV**. Herpes simplex virus-induced dUTPase: target site for antiviral chemotherapy. *Virology.* 1988 Sep;166(1):262-4.
- 264. Woodland DL**, Blackman MA. Retroviral super-antigens and T cells. *Int Rev Immunol.* 1992; 8(4):311-25.
- 265. Wrone-Smith T**, Nickoloff BJ. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest.* 1996 Oct 15;98(8):1878-87.
- 266. Yip SY**. The prevalence of psoriasis in the Mongoloid race. *J Am Acad Dermatol.* 1984 Jun; 10(6): 965-8.
- 267. York DF**, Vigne R, Verwoerd DW, Querat G. Nucleotide sequence of the jaagsiekte retrovirus, an exogenous and endogenous type D and B retrovirus of sheep and goats. *J Virol.* 1992 Aug;66(8):4930-9.
- 268. Youn JI**, Park BS, Park SB et al. (1999) Characterization of early and late onset psoriasis in the Korean population. *J Dermatol* 26:647–652.

Bücher

Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M. Dermatologie und Venerologie, 5. Auflage 2005.

Knipe DM, Howley PM, Griffin DE et al. Fields Virology, 5th ed., 2007.

Kerl H, Garbe C, Cerroni L, Wolff HH. Histopathologie der Haut, 2003.

Löffler G. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 3. Auflage, 1999.

Mülhardt C. Der Experimentator; Molekularbiologie/Genomics, 6. Auflage, 2009.

Strachan T, Read AP. Molekulare Humangenetik, Heidelberg, 3. Auflage, 2005.

Software/Internetquellen

DNA Star Auswertungsprogramm (DNA Star Incorporation; WI, USA):
EditSeq, PrimerSelect, SeqManII

WinCam 2,2 (Cybertech; Berlin, Deutschland)

NCBI Homepage (Nat. Center for Biot. Inf.; Bethesda, MD, USA):
BLAST, Genbank Datenbank
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research; MA, USA):
http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi

RepeatMasker program (Sanger Centre, MRC; London, England):
NIX
<http://genomic.sanger.ac.uk>

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. John Foerster für die Überlassung des sehr interessanten Themas sowie für die Betreuung und Hilfestellung bei der Erarbeitung und Verfassung dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Sterry, Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, für die Möglichkeit der Promotion unter seiner Leitung bedanken.

Sehr herzlich danke ich außerdem Frau Prof. Dr. med. Susann Schweiger und Frau Dr. rer. nat. Jennifer Winter aus dem Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem für die Möglichkeit und intensive Unterstützung bei der Durchführung von Teilen der experimentellen Arbeit.

Bei Dr. med. Judith Junge, Dr. rer. nat. Nils Rademacher, Dr. rer. nat. Florian Losch und Ulrike Fritz bedanke ich mich für die praktische Hilfestellung und geistigen Anregungen während unserer gemeinsamen Zeit im Labor.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walden danke ich für die zur Verfügung gestellten Laborräume, Laborgeräte und Materialien.

Bei Anne Böttger möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei der Bearbeitung der Bilder und Grafiken bedanken.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in einem Fachaufsatz publiziert:

Foerster J, Nolte I, Junge J, Bruinenberg M, Schweiger S, Spaar K, van der Steege G, Ehlert C, Mulder M, Kalscheuer V, Blumenthal-Barby E, Winter J, Seeman P, Stander M, Sterry W, te Meerman G. „Haplotype Sharing Analysis Identifies a Retroviral dUTPase as Candidate Susceptibility Gene for Psoriasis.“ J Invest Dermatol. 2005 Jan;124(1):99-102.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Elisa Blumenthal-Barby, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Charakterisierung einer humanen endogenen retroviralen dUTPase als Suszeptibilitätsgen für Psoriasis vulgaris“ 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.

Berlin, den 06.06.2011

Elisa Blumenthal-Barby