

Aus dem Institut für Pathologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. Steffen Hauptmann

Methoden zum Nachweis aktiver L1- Retrotransposons

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Stephan Ruhla
geboren am 25.06.1976 in Lauchhammer

Gutachter: 1. Prof. Dr. S. Hauptmann
2. Frau Prof. Dr. M. Hatzfeld
3. Prof. Dr. C. J. Kirkpatrick (Mainz)

eingereicht am: 16.05.2006
verteidigt am: 22.02.2007

Referat

Transponierbare Elemente sind mobile DNA-Elemente und werden deshalb auch als „Jumping Genes“ bezeichnet. Nahezu die Hälfte des humanen Genoms besteht aus transponierbaren Elementen. Von besonderer Bedeutung beim Menschen ist die Gruppe der L1-Retrotransposons, da sie die einzigen selbständig aktiven mobilen genetischen Elemente sind und etwa 17% des humanen Genoms ausmachen. Jedoch ist nur ein kleiner Teil der L1-Elemente vollständig und damit zu Retrotranspositionen in der Lage. Eine Aktivität (Mobilität) der L1-Elemente in der Evolution des Genoms kann konstruktiven Charakter haben, vermag aber auch die Stabilität des Genoms in erheblichem Maße zu beeinträchtigen. Auf genetischer Ebene können Transpositionen von L1-Elementen z.B. zu Rekombinationen, Deletionen, chromosomalen Inversionen sowie Insertionen führen. Deshalb muss die Aktivität von L1-Elementen strengen Regulationsmechanismen unterliegen, über deren Natur aber erst wenig bekannt ist. Von verschiedenen Spezies weiß man, dass mobile genetische Elemente im Rahmen von Adaptationsvorgängen aktiviert werden können. Die resultierenden genomischen Rearrangements bieten den Zellen eine stochastische Chance, sich ausufernden Stressfaktoren anzupassen. Diese Prozesse könnten auch bei der Karzinogenese von Bedeutung sein. Bemerkenswerterweise zeigen maligne Tumoren sowohl L1-Aktivität als auch massive genomische Alterationen.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden zum Nachweis aktiver L1-Elemente etabliert und evaluiert. Dies geschah *in vitro* anhand von humanen Zelllinien (Tumorzelllinien und nicht transformierten Zelllinien) sowie *in vivo* an humanen Gewebeproben. Dabei erwiesen sich der Proteinnachweis des vom L1-Element kodierten Proteins p40 (ORF1-Protein) mit einem neu entwickelten polyklonalen Antikörper, sowie ein Zellkultur-basierter Retrotranspositionsassay als geeignete Verfahren. p40 wird von aktiven L1-Elementen exprimiert. Es konnte immunhistologisch in Keimzellen des Hodens, in den Keimzentren von Lymphfollikeln und in Präkanzerosen von Mamma und Prostata (DCIS und PIN) nachgewiesen werden. Mittels Western Blot wurde in vier Tumorzelllinien (OVCAR-3, MCF-7, SK-MEL-13, HT-29) eine p40-Expression detektiert. Es wurden drei nicht transformierte Zelllinien (HOSE, HaCaT, MCF-10A) untersucht. MCF-10A und HOSE zeigten keine Expression des ORF1-Proteins. Im Retrotranspositionsassay, mit dem vollständige Retrotranspositionen erfasst werden, war in sechs der sieben untersuchten Zelllinien eine L1-Aktivität nachzuweisen. Die nicht transformierte Mamma-Epithel-Zelllinie MCF-10A zeigte weder eine ORF1-Protein-Expression noch eine Aktivität im Retrotranspositionsassay.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden zur Detektion der Aktivität von L1-Retrotransposons etabliert. Es zeigte sich, dass sowohl in Tumorgewebe als auch in Tumorzellen L1-Elemente aktiv sind. Zur weiteren Untersuchung einer Rolle der L1-Retrotransposons für die Karzinogenese stellt MCF-10A eine geeignete Modelllinie dar.

Ruhla, Stephan: Methoden zum Nachweis aktiver L1-Retrotransposons.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 67 Seiten, 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
2.1	Transponierbare Elemente.....	3
2.1.1	Arten transponierbarer Elemente	3
2.2	L1-Retrotransposons	6
2.2.1	Mechanismus der Retrotransposition	6
2.2.2	Konsequenzen der Aktivität von L1-Retrotransposons	9
2.2.3	Regulation der Aktivität von L1 Retrotransposons.....	11
2.2.4	Eine mögliche Rolle von L1-Elementen bei der Entstehung maligner Tumoren	11
2.2.5	Nachweis aktiver L1-Retrotransposons	12
2.3	Zielstellung	13
3	Material und Methoden	14
3.1	Material	14
3.1.1	Biologisches Material.....	14
3.1.2	Chemikalien und Enzyme	15
3.1.3	Kits	16
3.1.4	Oligonukleotide	16
3.1.5	Kulturmedien, Lösungen	17
3.1.6	Verbrauchsmaterial	18
3.1.7	Geräte	18
3.2	Methoden.....	19
3.2.1	Zellkultur	19
3.2.2	Antikörperentwicklung.....	20
3.2.3	Western Blot.....	22
3.2.4	Immunhistochemie	23
3.2.5	RT-PCR	24

Inhaltsverzeichnis

3.2.6	L1-Retrotranspositionsassay	26
4	Ergebnisse	32
4.1	Nachweis des ORF1-Proteins p40.....	32
4.1.1	Affinitätsreinigung des Antikörpers.....	32
4.1.2	Immunhistochmie.....	33
4.1.3	Western Blot.....	36
4.2	Nachweis vollständiger L1-Transpositionen.....	36
4.2.1	Transfektion	37
4.2.2	Fluoreszenzmikroskopie und FACS.....	38
4.3	Nachweis von L1-Aktivität mit RT-PCR.....	43
4.3.1	Sequenzierung des 220bp-PCR-Produktes.....	44
5	Diskussion	45
5.1	Nachweis des ORF1-Proteins.....	45
5.1.1	Tumor- und Normalgewebe unterscheiden sich hinsichtlich der Expression des ORF1-Proteins	46
5.1.2	Verschiedene Tumorzelllinien exprimieren das ORF1-Protein.....	47
5.2	RT-PCR zum Nachweis von L1-Aktivität	47
5.2.1	Sequenzierung des kleineren PCR-Produktes	48
5.3	Bestimmung der L1-Aktivität mittels Retrotranspositionsassay.....	49
5.3.1	MCF-10A-Zellen zeigten keine Aktivität im Retrotranspositionsassay	49
5.3.2	Zeitliche Unterschiede im Beginn der L1-Aktivität.....	49
5.3.3	Der Retrotranspositionsassay- ein artifizielles System	50
5.4	L1-Retrotransposons und Karzinogenese.....	50
6	Zusammenfassung	52
7	Literaturverzeichnis	54
8	Thesen	58
9	Selbständigkeitserklärung	60
10	Erklärung über frühere Promotionsversuche	60

Inhaltsverzeichnis

11	Tabellarischer Lebenslauf	61
12	Publikationen	62
12.1	Zeitschriftenbeiträge	62
12.2	Kongressbeiträge	62
13	Danksagung	63

1 Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EN	Endonuklease
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FSC	forward scatter
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KLH	keyhole limpet hemozyanin
L1	L1-Retrotransposon
LINE	long interspersed nucleotide element
LTR	long terminal repeat
M	Molar
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PIN	prostatistische intraepitheliale Neoplasie
RNA	Ribonukleinsäure

RNP	Ribonukleoprotein- Partikel
RT	Reverse Transkription/ Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	side scatter
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TPRT	target primed reverse transcription
TSD	target site duplication
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated region (nicht translatierte Region)
V	Volt
Vol%	Volumen-Prozent

2 Einleitung

2.1 Transponierbare Elemente

Transponierbare Elemente, engl. transposable elements (to transpose: versetzen, umsetzen), sind bewegliche DNA-Elemente (sogenannte „Jumping Genes“). Als Transposition wird der Vorgang bezeichnet, bei dem ein im Genom vorhandenes DNA-Element an eine andere Stelle des Genoms versetzt (transponiert) wird.² Das humane Genom besteht zu etwa 45% aus transponierbaren Elementen.³⁹

Erstmals beschrieben wurden solche mobilen genetischen Elemente von Barbara McClintock (1916-1992), während ihrer Untersuchungen zur Genetik von Maispflanzen in den Jahren 1940-1955. Sie wurde für ihre Leistungen 1983 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt.

Lange Zeit galten diese DNA-Elemente als funktionslos und wurden deshalb als „Junk-DNA“ bezeichnet. Mittlerweile werden sie mehr und mehr als Bestandteil evolutionärer Notwendigkeiten genomischer Flexibilität gesehen. Diese Sichtweise wird sehr eindrucksvoll von Shapiro beschrieben: Transponible Elemente sind Teil eines „natural genetic engineering“-Systems, eines gezielten Prozesses genomischer Umstrukturierungen im Rahmen der Evolution.^{44,45} Diese DNA-Elemente können chromosomale Rearrangements wie Duplikation, Inversion, Deletion und Translokation verursachen und vermögen auch die Genexpression in erheblichem Ausmaß zu beeinflussen.^{22,25,39}

2.1.1 Arten transponierbarer Elemente

2.1.1.1 DNA-Transposons

Grundsätzlich wird zwischen DNA-Transposons und Retrotransposons unterschieden. Bei DNA-Transposons wird der sich bewegende Abschnitt an einer Stelle im Genom ausgeschnitten und an einer anderen wieder eingefügt („cut and paste“). Es wird nicht angenommen, dass DNA-Transposons im humanen Genom mehr aktiv sind. Sie werden als evolutionsgeschichtliche Überreste angesehen.^{16,39} Das humane Genom besteht zu etwa 3% aus DNA-Transposons.²⁹



Abbildung 1: DNA-Transposons enthalten invertierte Sequenzwiederholungen, sog. inverted terminal repeats (ITR) und ein offenes Leseraster, das für die Transposase kodiert. Dieses Enzym ist für das Herausschneiden und Wiedereinfügen des Elementes verantwortlich. Die Elemente werden von kurzen sich wiederholenden Sequenzen- direct repeats (DR)- flankiert. Modifiziert nach Ostertag et al.³⁹

2.1.1.2 Retrotransposons

Bei Retrotransposons (Retroposons) erfolgt im Unterschied zu den DNA-Transposons der Informationsfluss für die Transposition (=Retrotransposition) wie bei den Retroviren, durch reverse Transkription ihrer RNA-Moleküle. Dabei verbleibt das Element an seiner ursprünglichen Position und nur die Kopie wird an einer anderen Stelle eingefügt („copy and paste“).

Zu annähernd 42% besteht das humane Genom aus Retrotransposons.²⁹ Allerdings sind bei weitem nicht alle Retrotransposons aus eigener Kraft zu Retrotranspositionen in der Lage.⁴³ Demzufolge werden sie weiter in autonome und nicht autonome Retrotransposons unterteilt.

Autonome Retrotransposons: Diese DNA-Elemente kodieren selbst für die Proteine, die für ihre Mobilität verantwortlich sind. Hingegen können nicht autonome Retrotransposons sich nur mit Hilfe der Proteine der autonomen Elemente bewegen.

Es werden wiederum zwei Klassen von autonomen Retrotransposons unterschieden. Das sind auf der einen Seite die LTR-Retrotransposons mit langen terminalen Sequenzwiederholungen (long terminal repeats, LTRs). LTRs entstehen bei der reversen Transkription und sind funktionell von großer Bedeutung, da sie unter anderem Sequenzelemente für Promotoren, Polyadenylierungssignale und Primerbindungsstellen enthalten.¹⁴ LTR-Retrotransposons sind strukturell eng mit den Retroviren verwandt, es fehlt ihnen jedoch ein funktionsfähiges Envelope-Gen und somit eine Proteinhülle. Zu dieser Gruppe gehören die humanen endogenen Retroviren (HERV). Beim Menschen sind die LTR-Retrotransposons defekt, können sich also nicht weiter im humanen Genom ausbreiten.³⁹ Das humane Genom besteht zu etwa 8% aus LTR-Retrotransposons.²⁹

Die zweite Gruppe sind die Non-LTR-Retrotransposons. Hierzu zählen die LINEs (long interspersed nucleotide elements). Die LINE-1- oder L1-Retrotransposons sind die einzigen selbständig aktiven mobilen genetischen Elemente im humanen Genom. Sie vermögen sich selbst auszubreiten und sind auch an der Expansion nicht autonomer Retrotransposons beteiligt.^{16,29,39} Das humane Genom besteht zu etwa 21% aus Non-LTR-Retrotransposons.²⁹

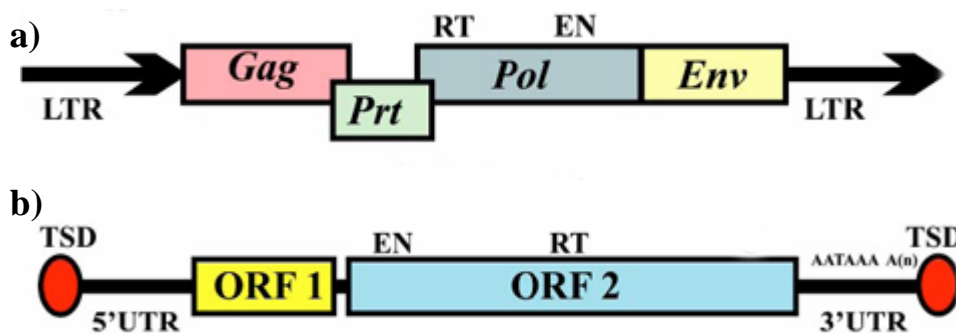


Abbildung 2: Autonome Retrotransposons. Modifiziert nach Ostertag et al.³⁹

a) LTR-Retrotransposons haben überlappende offene Leseraster für ein Gruppen-spezifisches Antigen (*Gag*)-, ein Protease (*Prt*)-, ein Polymerase (*Pol*)- und ein Envelope (*Env*)-Gen. Reverse Transkriptase (*RT*)- und Endonuklease (*EN*)-Domäne sind bezeichnet.

b) LINE1 (L1)-Retrotransposons besitzen zwei offene Leseraster (*ORF1* und *ORF2*), die für die Proteine kodieren, die für eine Retrotransposition erforderlich sind.

Nicht autonome Retrotransposons: Hierbei handelt es sich um Retrotransposons, die für keinerlei Proteine kodieren.^{16,39} Am häufigsten sind die SINEs (short interspersed nucleotide elements). Aus dieser Gruppe ist die ALU-Familie (nach dem Restriktionsenzym ALU I benannte repetitive DNA) besonders bekannt. 11% des humanen Genoms besteht aus ALU-Elementen.²⁹ SINEs und LINEs bilden zusammen die Gruppe der Non-LTR-Retrotransposons.



Abbildung 3: Nicht autonome Retrotransposons enthalten zwei gleiche Monomere, das Linke (L) und das Rechte (R) und ein Poly-A-Ende, A(n). Sie werden von target side duplications (TSD) flankiert. Modifiziert nach Ostertag et al.³⁹

2.2 L1-Retrotransposons

LINE1-Retrotransposons haben eine lange evolutionäre Geschichte, die bis zur Entstehung eukaryoter Organismen zurückreicht.³⁹ Das humane Genom besteht zu 17% aus L1-Retrotransposons. Hier ist der Großteil der rund 520.000 L1-Elemente jedoch inaktiv, da sie am 5'-Ende unvollständig (trunkiert) sind. Nur vollständige L1 sind zur Retrotransposition in der Lage. Es gibt 3000- 5000 solcher vollständigen L1- Retrotransposons beim Menschen.²⁹



Abbildung 4: Vollständiges, 6 kb langes L1-Retrotransposon. UTR- nicht translatierte Region, ORF- offenes Leseraster, EN- Endonuklease, RT- reverse Transkriptase, TSD- target site duplication, Poly-A-Region. Modifiziert nach Ostertag et al.³⁹

Am 5'-Ende befindet sich eine nicht translatierte Region (untranslated region, 5'UTR). Hier ist der Promotor des Elementes lokalisiert. Daran schließen sich zwei offene Leseraster (open reading frame, ORF) an. Die nicht translatierte Region am 3'-Ende (3'UTR) endet mit einem Polyadenylierungssignal. Flankiert wird ein L1-Element von Sequenzduplikationen, sogenannten target site duplications (TSD).

2.2.1 Mechanismus der Retrotransposition

Die Retrotransposition eines L1-Elements umfasst folgende Schritte: Transkription, RNA-Prozessierung, mRNA-Export, Translation, posttranslationale Modifikationen, RNP (Ribonukleoprotein-Partikel)-Formation, Eintritt in den Zellkern, reverse Transkription und Integration in das Genom. Die Details zu den einzelnen Schritten sind nachfolgend beschrieben.

Transkription: Welche Faktoren im Einzelnen für die Transkription benötigt werden und welche RNA-Polymerase zum Einsatz kommt, ist für humane Zellen noch nicht vollständig geklärt. Für das Retrotransposon „jockey“ in *Drosophila melanogaster* wurde eine Polymerase II-vermittelte Transkription gezeigt.³⁵ Es gilt als gesichert, dass die Transkriptionsfaktoren YY1 und RUNX3 im humanen Genom beteiligt sind.⁵¹ Im 5'UTR befindet sich die Promotorregion. Die Transkription endet an der Poly-A-Sequenz, mitunter auch erst an einem stärkeren, weiter

stromabwärts gelegenen Polyadenylierungssignal. Dadurch kann es bei der Retrotransposition zum Mitführen benachbarter Sequenzen (Transduktion) kommen. Durch diesen Mechanismus könnten evolutionsbiologisch wichtige Sequenzen verschoben worden sein.²⁵

RNA-Prozessierung und nukleärer Export: Über Modifikationen Export der L1-mRNA ist wenig bekannt. Da L1-Transkripte keine Introns enthalten, ist kein Splicing erforderlich. Bis auf wenige Ausnahmen enthalten alle humanen mRNAs Introns.³⁹ Ungespleißte mRNA wird normalerweise am Export aus dem Nukleus durch Bindung sogenannter committend factors, die an Splicing-Stellen binden, gehindert.¹⁵

Translation: Das erste offene Leseraster (ORF1) kodiert für ein 40 kD Protein (p40-Protein). Es handelt sich um ein nukleinsäurebindendes Protein, das eine Chaperone-Funktion für die L1-RNA hat und für die Retrotransposition essenziell ist.³²

ORF2 kodiert für ein 150 kD Protein, das eine Endonuklease-Domäne, eine Reverse-Transkriptase-Domäne sowie eine Zinkfinger-Domäne enthält.³⁹ Das ORF2-Protein ist für die reverse Transkription und für das Einfügen des transponierten Elementes in das Genom verantwortlich.

Posttranslationale Modifikationen und Ribonukleoprotein Formation: Posttranslationale Modifikationen sind bisher nicht bekannt. Es wird angenommen, dass ORF1-Protein, ORF2-Protein und L1-RNA assoziieren und Ribonukleoprotein-Partikel (RNP) bilden.³⁹

Eintritt in den Nukleus: Auch wie die ORF2-Proteine, bzw. die Ribonukleoprotein-Partikel in den Zellkern gelangen ist noch Gegenstand der Diskussion, da Proteine, die schwerer als etwa 60 kD sind, nicht durch passive Diffusion durch Kernporen in den Nukleus eintreten können.³⁹ Ein Erklärungsmodell ist, dass das ORF2-Protein, bzw. der gesamte RNP-Komplex, nur während einer Mitose bzw. Meiose, also beim Verlust der Integrität der Kernmembran, in den Nukleus gelangt.³⁹

Reverse Transkription und Integration: Nach der gegenwärtigen Vorstellung wird nach Durchtrennung eines DNA-Stranges durch die Endonuklease das 3'-OH-Ende der genomischen DNA als Primer für die reverse Transkription verwendet. Der Vorgang wird deshalb auch als target primed reverse transcription (TPRT) bezeichnet.³⁹ Durch die TPRT entsteht eine Sequenzduplikation an der Stelle der Integration des Elementes (target site duplication, TSD). Schließlich wird durch DNA-Synthese der zweite DNA-Strang aufgefüllt.

Die meisten L1-Elemente sind am 5'-Ende unvollständig (trunkiert). Dies lässt sich durch eine vorzeitige Dissoziation der reversen Transkriptase von der RNA erklären. Denkbar ist auch teilweiser Abbau der L1-RNA durch RNAsen bevor die reverse Transkription abgeschlossen ist.³⁹

Des Weiteren wird ein als Twin Priming bezeichnet Prozess diskutiert. Hierbei wird während der Integration auch der zweite DNA-Strang gespalten und das 3'-OH-Ende fungiert als zweiter Primer für eine reverse Transkription. Dabei bliebe das integrierte Element am 5'-Ende unvollständig.^{39,40}

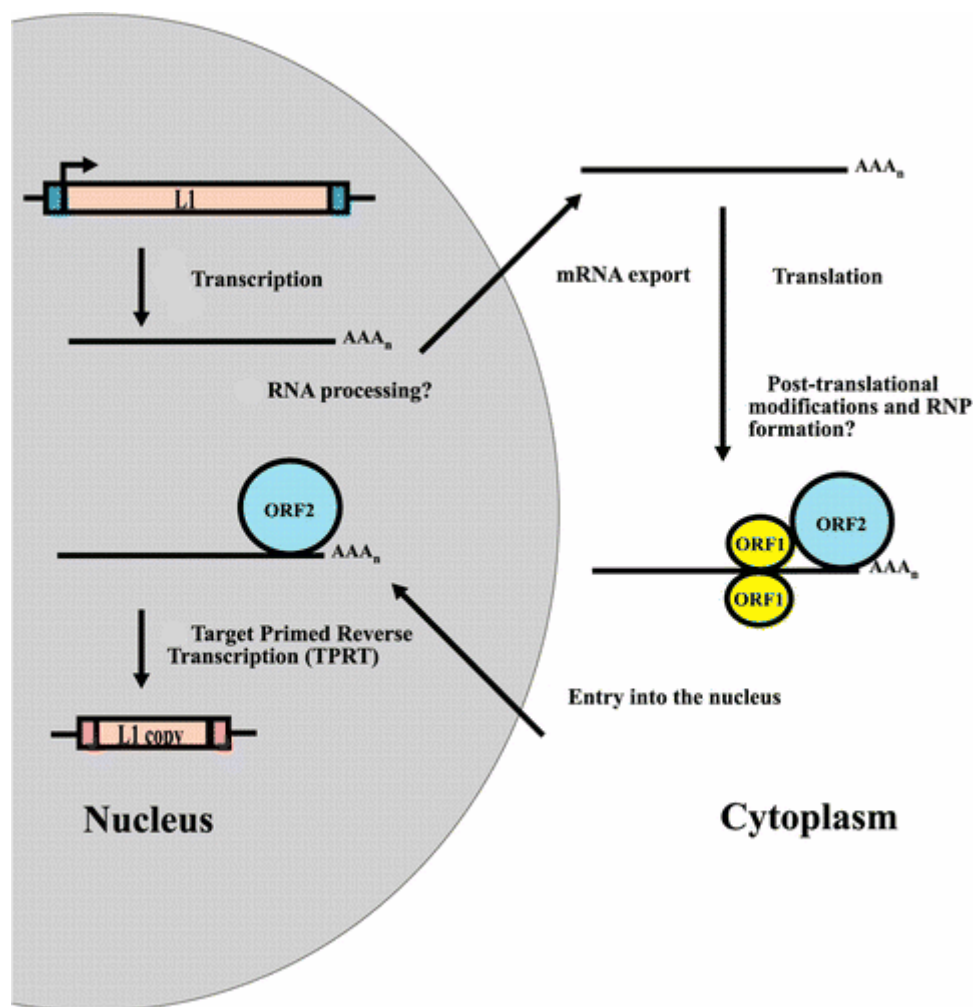


Abbildung 5: Ablauf einer Retrotransposition, nach Ostertag et al.³⁹

2.2.2 Konsequenzen der Aktivität von L1-Retrotransposons

Die Aktivität von L1-Elementen, d.h. das Stattfinden von Retrotranspositionen, kann sowohl destruktive als auch konstruktive Effekte auf das Genom der entsprechenden Zellen haben.²⁵ Zu den destruktiven Prozessen gehören die homologe Rekombination und die Insertion (sogenannte Insertions-Mutagenese durch Integration eines LINE1 in kodierende Bereiche eines Gens). So ist z.B. eine Insertions-Mutagenese für das Faktor VIII-Gen beschrieben, aus der eine Hämophilie A resultierte.¹⁷ Die von L1-Elementen kodierten Proteine interagieren nicht nur mit ihrer eigenen RNA (cis), sondern sind auch für die Mobilisierung nicht autonomer Retroposons, z.B. von Alu-Elementen, verantwortlich (trans).²⁶ Homologe Rekombination zwischen L1- bzw. Alu-Elementen kann zu Deletionen oder Duplikationen von DNA-Abschnitten führen.²⁵ Auch umfassendere genomische Rearrangements wie große Deletionen und chromosomale Inversionen sind beschrieben.^{26,47} Diese Prozesse können die Stabilität des Genoms in erheblichem Maße beeinträchtigen.

Andere Effekte der L1-Aktivität werden als konstruktiv angesehen. So können zusammen mit dem L1-Element am 3'-Ende benachbarte Sequenzen bei der Retrotransposition mitübertragen werden (Transduktion). Auf diese Weise können Exons (Exon shuffling) und regulatorische Sequenzen an andere Stellen im Genom verbracht werden.²⁵ L1-Elemente können die Expression benachbarter Gene über einen Antisense-Promotor im 5'UTR-Bereich beeinflussen.^{25,37} Auch proteinkodierende Sequenzen könnten ihren Ursprung in Retroposons gehabt haben. Das ist z.B. für die Telomerase beschrieben, das Enzym, welches die Länge der Telomere, der Enden der Chromosomen, aufrecht erhält. Die Telomerase ist strukturell eng mit der Reversen Transkriptase der L1-Elemente verwandt. Diesen konstruktiven Mechanismen wird ein evolutionärer Benefit zugeschrieben.

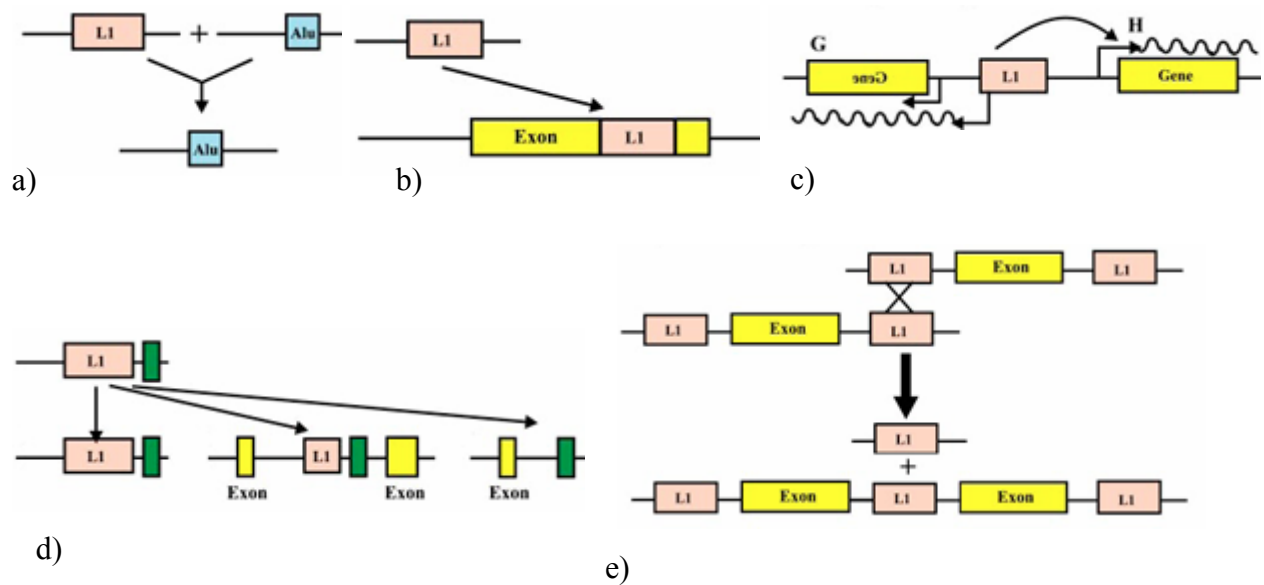


Abbildung 6: Auswirkungen von L1-Aktivität auf das Genom. a) Neben der Retrotransposition von L1-Elementen (cis), können auch nicht autonome Retrotransposons (z.B. Alu-Elemente) verbreitet werden (trans). b) Insertions-Mutagenese. c) L1-Effekte auf die Expression benachbarter Gene. d) Transduktion benachbarter Sequenzen von L1. e) ungleiche Rekombination zwischen L1-Elementen. Modifiziert nach Ostertag et al.³⁹

2.2.3 Regulation der Aktivität von L1 Retrotransposons

Nur vollständige, 6 kB lange, L1-Elemente sind zur Retrotransposition fähig.³⁹ Im humanen Genom gibt es schätzungsweise zwischen 80 und 100 aktiver L1-Elemente.¹² Eine Aktivität von L1 (d.h. Stattfinden von Retrotranspositionen) kann gravierende Auswirkungen auf die Stabilität des Genoms haben.²⁶ Deshalb muss es wirksame Regulationsmechanismen geben. Dafür spricht auch, dass nur in wenigen Geweben aktive L1-Retrotransposons gefunden wurden.^{4,19}

Bei *C. elegans* wird die Aktivität von Retrotransposons durch RNA-Interferenz unterdrückt.²⁵ Wahrscheinlich ist dieser Mechanismus auch im humanen Genom für die Kontrolle der Ausbreitung von L1-Elemente von Bedeutung.⁴⁶

DNA-Methylierung ist ein weiterer wahrscheinlicher Regulationsmechanismus. So wurden in Keimzellen von Säugetieren hypomethylierte Retrotransposons gefunden, in somatischen Zellen

sind sie hypermethyliert.²⁵ Auch für Tumorgewebe sind hypomethylierte L1-Elemente beschrieben, so z.B. im hepatozellulären Karzinom und im Urothelkarzinom.^{20,48}

2.2.4 Eine mögliche Rolle von L1-Elementen bei der Entstehung maligner Tumoren

Die Entstehung bösartiger Tumoren wird gegenwärtig als eine Art „genetischer Unfall“ angesehen, wobei es durch äußere Einwirkungen zur direkten DNA-Schädigung kommt. So entstandene Mutationen führen zu einer Aktivierung von Onkogenen und einer Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen. Die resultierende Störung der Genexpression führt zu multiplen Veränderungen wie einer abnormalen Zellproliferation, einer Resistenz der Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli, Induktion von Neovaskularisation und Metastasierung.⁵ Dieses Modell wird auch als Somatische Mutationshypothese bezeichnet.²³

An dieser Theorie gibt es aber eine Reihe von Kritikpunkten. So würde man erwarten, dass eine Mutation sich unmittelbar phänotypisch auswirkt. Die Tumorentstehung ist jedoch sowohl experimentell als auch im Leben eines Menschen ein lange dauernder Prozess. Ferner wird angenommen, dass mehrere Mutationen zur Tumorinduktion erforderlich sind.⁶ Allerdings ist die Spontanmutationsrate einer normalen Zelle relativ niedrig, und dass ein und dieselbe Zelle viele Male von Mutationen getroffen wird, ist extrem unwahrscheinlich.²³ Deshalb wurde die Existenz eines Mutatorphänotyps für von einer Mutation getroffene Zellen angenommen. Es wird beschrieben, dass solche Mutatorphänotypen durch Defekte des DNA-Reparatursystems und des Systems der Zellzyklus-Kontrolle, wie z.B. des p53-Gens, welches die Proliferation von Zellen mit einem abnormalen DNA-Gehalt hemmt, entstehen sollen.³¹ Aber weder führt der Verlust von p53 zwangsläufig zur Entstehung von Krebs noch schützt ein funktionsfähiges p53 sicher davor.²³ Ein weiterer Kritikpunkt an der Somatischen Mutationshypothese ist, dass keine eindeutige Korrelation zwischen Mutagenität und Karzinogenität bestimmter Agenzien nachgewiesen werden konnte.¹⁸ Auch gibt es keine Tumor-spezifischen Mutationen.^{18,23} Genomische Instabilität ist bei malignen Neoplasien häufig und es wird vermutet, dass dies ein früher Schritt in der Karzinogenese ist.^{23,42} Der komplexe Phänotyp des Genoms einer Krebszelle kann nicht durch Mutationen allein erklärt werden.

Eine andere Vorstellung zur Entstehung von Malignomen sieht die Karzinogenese als

evolutionären Prozess im Sinne einer fehlgeleiteten Adaptation.^{23,33,49} Eine Aktivierung transponierbarer Elemente im Rahmen adaptiver Reaktionen auf zellulären Stress ist für verschiedene Organismen beschrieben.^{24,27,28,34} Shapiro bezeichnet die aus dieser Aktivierung resultierenden genomischen Veränderungen als aktives DNA-Engineering.^{44,45} Im humanen Genom sind dabei die L1-Retrotransposons von besonderer Bedeutung, da sie hier die einzigen selbständig aktiven mobilen genetischen Elemente sind. Eine Aktivierung der L1-Elemente im Rahmen der Kanzerogenese wäre somit anzunehmen. Auch die Entstehung des instabilen Karyotyps von Tumorzellen ließe sich hiermit erklären.²³

2.2.5 Nachweis aktiver L1-Retrotransposons

Aktive L1-Retrotransposons sind bisher nur in wenigen Geweben gefunden worden. Die Aktivität der L1-Elemente unterliegt aufgrund der gravierenden Auswirkungen, die eine L1-Aktivierung auf die Stabilität des Genoms einer Zelle hat, strikten Regulationsmechanismen. Welche Mechanismen daran im Einzelnen beteiligt sind, ist noch Gegenstand der Diskussion. Deshalb ist es sinnvoll, die Aktivität auf verschiedenen „Ebenen“ (z.B. RNA, Proteine, Insertion) zu untersuchen.

Untersuchungen zum Methylierungsstatus von L1-Elementen sind ein indirekter und nicht ganz unproblematischer Nachweis der Aktivität von L1-Elementen, da der Einfluss der Methylierung auf die L1-Expression bisher nicht vollständig geklärt ist.^{20,25,48} Der Nachweis hypomethylierter LINE1 ergibt lediglich Indizien für eine L1-Aktivität.

Der Nachweis der L1-mRNA ist aufgrund des vielfachen Vorkommens der L1-Elemente schwierig und bisher noch nicht etabliert. Deshalb ist es auch nicht möglich mittels PCR nach Neuinsertionen zu screenen.

Das am längsten bekannte Nachweisverfahren ist der Proteinnachweis. So ist eine Expression des ORF1-Proteins (p40) in humanem und murinem Hodengewebe beschrieben.^{8,19} Auch in einigen humanen Tumoren wurde p40 nachgewiesen, so von Bratthauer et al. im Mammakarzinom und einigen Keimzelltumoren.⁹⁻¹¹ Die p40-Expression ist eine Voraussetzung für das Stattfinden von L1-Retrotranspositionen, da p40 als Nukleinsäure-Chaperone fungiert und für die Retrotransposition der L1-Elemente essenziell ist.³² Ein geeigneter Antikörper gegen das ORF2-Protein wurde erst vor kurzem von Ergun et al. etabliert.¹⁹

Ein Verfahren zum Nachweis vollständiger Retrotranspositionsereignisse ist ein Zellkultur-basierter Retrotranspositionsassay, bei dem ein Vektor, der ein L1-Element trägt, in Zellen eingebracht wird. Innerhalb des L1-Elementes befindet sich ein Markergen (bzw. ein Resistenzgen), das nur exprimiert wird, wenn es zu einer Retrotransposition des im Vektor enthaltenen L1-Elementes gekommen ist.^{36,41} Mit Hilfe dieses Retrotranspositionsassays konnten wesentliche Erkenntnisse über die Biologie der L1-Elemente gewonnen werden.^{36,39}

2.3 Zielstellung

Aus der Annahme, dass L1-Retrotransposons an der Karzinogenese beim Menschen ursächlich beteiligt sind, ergibt sich die Notwendigkeit deren Aktivität nachzuweisen.

Ziel dieser Arbeit war es, hierfür geeignete Methoden zu evaluieren und zu etablieren. Dies geschah anhand von Tumorgewebe und entsprechendem Normalgewebe sowie anhand von Tumorzelllinien und Zelllinien, die aus nicht entarteten Geweben etabliert worden waren. Hierbei waren Unterschiede in der L1-Aktivität zu erwarten.

Es wurden folgende Ziele verfolgt:

- Nachweis der Aktivität von L1-Retrotransposons auf RNA-Ebene mittels PCR
- Nachweis der Aktivität von L1-Retrotransposons auf Proteinebene mittels Western Blot
- die dazu erforderliche Entwicklung eines geeigneten Antikörpers
- Nachweis der Aktivität von L1-Retrotransposons mittels eines Zellkultur-basierten Retrotranspositionsassays (erfasst vollständige Transpositionen)
- Anwendung der Methoden zur Suche nach Unterschieden zwischen Tumorzelllinien und nicht transformierten Zelllinien
- Etablierung eines Immunhistologie-Protokolls zum Nachweis des ORF1-Proteins in Geweben

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Biologisches Material

3.1.1.1 *Humane Zelllinien*

OVCAR-3	Seröses Karzinom des Ovars	Cell Lines Service, Heidelberg
HOSE	Oberflächenepithel des Ovars, durch HPV-Transfektion immortalisiert	Dr. S.W. Tsao, Hong Kong, VR China ⁵⁰
MCF-7	Duktales Karzinom der Mamma	The American Type Culture Collection (ATCC), LGC Promochem, Wesel
MCF-10A	Epithelzellen der Mamma, spontan immortalisiert	The American Type Culture Collection (ATCC), LGC Promochem, Wesel
SK-MEL-13	Malignes Melanom	Dr. L. J. Old, New York, USA ³⁰
HT-29	Adenokarzinom des Kolons	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK
HaCaT	Keratinocyten, spontan immortalisiert	Prof. Dr. N.E. Fusenig, Heidelberg ⁷

3.1.1.2 *Kompetente Zellen*

E. coli Stamm DH5α MAX Efficiency	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
-----------------------------------	----------------------------

3.1.1.3 *Plasmide in E. coli*

pEGFP-N1 und L1_{RP} sind pCEP4 (Invitrogen) basiert. pCEP4 ist ein eukaryoter Expressionsvektor. Das Plasmid L1_{RP} wurden uns freundlicherweise von H.H. Kazazian, Philadelphia zur Verfügung gestellt.⁴¹ PEGFP-N1 war bei Clontech, Mountain View, USA erhältlich.

3.1.2 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid	Appligene, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
AmpliTaq DNA Polymerase 5U/μl, cat# N801-0060	Perkin Elmer, Branchburg, USA
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, USA
Beta Aktin antibody- Loading control	Abcam Ltd, Cambridge, UK
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
CNBr activated Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Desoxyribonucleosid- Triphosphate (dNTP's), je 2,5mM	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DNA-Längenstandard 100bp, cat# 15628-050	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), cat# BE12-707F	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
ECL western blotting detection and analysis system	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Essigsäure	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethidumbromid	ICN Biomedicals Inc, Aurora, USA
Ethylendiamintetraessigsäure- di- Natriumsalz (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS), cat# 3402-P992203	PAN Biotech, Aidenbach
Glycin	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Größenmarker Standard See Blue Plus2	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Immuno Pure Goat- anti rabbit IgG (H+L)	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
L-Glutamin	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
Low-Melting-Agarose	FMC Bioproducts, Maine, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ • 6 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
MCDB 105 Medium, cat# M-6395	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Medium 199, cat# M-2154	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
MMLV Reverse Transkriptase, 200 U/μl	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NuPage Antioxidans	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPage LDS Probenpuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPage MES SDS Laufpuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPage Transfer- Puffer 20x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPageSample Reducing Agent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PCR- Master Mix	Promega, Madison, USA
PCR-Puffer, 10 x, 15mM MgCl ₂ , cat# N808-0006	Perkin Elmer, Branchburg, USA
Peroxidase Horseradish (HRP)	Sigma- Aldrich Chemie, Steinheim
Random Hexamere, cat# C1181	Promega, Madison, USA
RNAsin 40 U/μl	Promega, Madison, USA
Rotiblock	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Salzsäure	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tetramethylbenzidin (TMB)	Seramun Diagnostica GmbH, Berlin
Thiopropyl- Sepharose 6B	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Transfektionskit Nucleofector Cell Line Optimization Kit	Amaxa, Köln
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)- aminomethan (Tris-Base)	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck, Darmstadt
Trypsin / EDTA – Lösung 0,5% / 0,2% (w/v) in PBS (10-fach konzentriert)	Biochrom KG, Berlin
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tween 20	Serva, Heidelberg
Western Blot Recycling Kit	Alpha Diagnostic International, San Antonio, USA
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

3.1.3 Kits

Big Dye Terminator-Sequenzierkit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Maxi Prep Kit	Qiagen, Hilden
Mini Prep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick- Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Western Blot Recycling Kit	Alpha Diagnostic International, San Antonio, USA

3.1.4 Oligonukleotide

Primer lt. Tabelle 1 Biotez, Berlin

Tabelle 1: Primer

Bezeichnung	Sequenz	Länge des PCR-Produktes
GAPDH fwd	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	452 bp
GAPDH rev	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	
L1 5'end fwd	5'- CTC CGG TCT ACA GCT CCC AGC G-3'	436 bp
L1 5'end rev	5'- ACC TAA GCA AGC CTG GGC AAT G-3'	

Die L1 5'end Primer wurden von T.G. Fanning erstmals beschrieben.³ Die Auswahl der GAPDH-Primersequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Primer Designer V 3.0 (Scientific &

Educational Software).

3.1.5 Kulturmedien, Lösungen

DMEM, serumhaltig:	500 ml DMEM 10 ml L-Glutamin 50 ml FCS	DMEM, serumfrei:	500 ml DMEM 10 ml L-Glutamin
LB-Medium:	10 g Bacto Trypton 5 ml Bacto Hefe Extrakt 10 g Natriumchlorid pH 7,0 einstellen ad 1000 ml H ₂ O	LB-Medium mit Agar:	1000 ml LB-Medium 15 g Bacto Agar
10 x PBS:	82,3 g Di-Natriumhydrogenphosphat 23,5 g Natriumdihydrogenphosphat 40,0 g Natriumchlorid ad 1000 ml H ₂ O pH 7,2 einstellen		
WB-Blocking-Puffer:	100 ml 1 x PBS 100 µl Tween 20 5 g Magermilchpulver	WB-Transferpuffer: (nach Verdünnung 20 Vol% Methanol frisch zugeben)	25 ml NuPage Transferpuffer (20x) 250 µl NuPage Antioxidant ad 500 ml H ₂ O
50 x TAE:	242,0 g Tris-Base 57,1 ml Essigsäure 100,0 ml EDTA 0,5M ad 1000 ml H ₂ O pH 7,5 – 7,8 einstellen autoklavieren	RLN- Puffer:	50 mM Tris HCl 140 mM NaCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,5 % Nonidet P 40 pH 8.0 einstellen
Immunhistologie – Citratpuffer:	3,78 g Zitronensäure 24,21 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ad 1000 ml H ₂ O pH 6,0 einstellen	DNA-Auftragspuffer:	4,0 g Sucrose 2,5 mg Bromphenolblau 10 ml TE
Bindungspuffer:	0,5 M NaCl 0,1 M Tris-Base 1,0 mM EDTA pH 7.5 einstellen	Glycinpuffer:	0,1 mM Glycin pH 2,7 einstellen

Kopplungspuffer:	0,1	M	NaHCO ₃	Blockingpuffer:	1	M	Etahanolamin
	0.5	M	NaCl				pH 8,0 einstellen
			pH 8.3 einstellen				

5x SDS-

Auftragspuffer:	2,5	ml	1M Tris HCl, pH 8.0	Coating- Puffer	1,50	g	Na ₂ CO ₃
(reduzierend)*	750	mg	SDS		2,93	g	NaHCO ₃
	1,25	ml	Bromphenolblau 2%	ad 1000	ml	H ₂ O	pH 9.5 einstellen
	1,25	ml	2-Mercaptoethanol				
	2,5	ml	Glycerol				
	ad 10	ml	H ₂ O				

* Für nicht reduzierende Auftragspuffer ohne 2-Mercaptoethanol angesetzt.

TE- Puffer	1,21	g	Tris-Base
	0,372	g	EDTA
	ad 1000	ml	H ₂ O
			pH 8.0 einstellen
			autoklavieren

3.1.6 Verbrauchsmaterial

5 ml Polystyrene Tubes mit Zellsieb	Becton Dickinson Labware Europe, Aristide Berges, Frankreich
6-well Zellkulturplatten	Falcon-Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Chromatographiepapier, 3MM CHR	Whatman, Maidstone, England
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Microtest Zellkulturplatten 96-well	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Nu Page Bis Tris Gel 10%	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Objektträger SuperFrostPlus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Menasha, USA
Petrischalen für Bakterien	Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Petrischalen für Zellkultur	Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Protein-Transfermembran, Nitro-cellulose 0,2 µm	Bio- Rad Laboratories, Hercules, USA
RNA-Transfermembran Hybond N+	Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, England
Röntgenfilme Biomax MS	Eastman Kodak, Rochester, USA
Serologische Pipetten	Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Zellschaber	Costar, Corning, USA

3.1.7 Geräte

Abzug	Trox Technik, Neukirchen-Vluyn
Autoklav	Systec, Wettenberg
Digitalkamera Coolpix 990	Nikon GmbH, Düsseldorf
Elektrophoresekammern (Agarosegele)	Bio-Rad, Hercules, USA
Cell Gt	
Elektrophoresenetzgerät Power Pac HC	Bio-Rad, Hercules, USA
ELISA-Reader	Bio-Tek Instruments, Winooski, USA
FACS Gerät FACSCalibur	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA

Geldokumentationsanlage Gene Genius	Syngene, Frederick, USA
Heizblock 100°C	Roth, Karlsruhe
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments, Schwabach
pH-Meter ph211	Hanna Instruments Deutschland, Kehl am Rhein
Photometer Smart Spec 3000	Bio-Rad, Hercules, USA
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelinkubator Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttler KL2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Spektrophotometer UV160A	Shimadzu Deutschland, Duisburg
Thermocycler, Mastercycler- Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Transblot Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Transfektionssystem Nucleofactor	Amaxa GmbH, Köln
Ultrazentrifuge Optima L90K	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
UV-Transilluminatoren	MWG Biotech, Ebersberg
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Zellkulturbrutschrank BB16	Heraeus, Hanau
Zellkulturwerkbank	Kojair, Vilppula, Finland
Zellkulturmikroskop Eclipse TS100F mit Epifluoreszenzeinrichtung	Nikon GmbH, Geschäftsbereich Mikroskope, Düsseldorf
Zellzählkammer Fuchs-Rosenthal	LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien MCF-7, OVCAR-3, SK-MEL-13 und HaCaT wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% FCS kultiviert. Für die Oberflächenepithelzelllinie HOSE wurde MCDB 105 Medium und Medium 199 zu gleichen Teilen mit 15%igem FCS-Zusatz verwendet. Die Kultivierung der Zelllinie MCF-10A erfolgte in Mammary Epithelium Growth Medium (MEGM), die der Zelllinie HT-29 in RPMI-Medium, 10% FCS. Die Inkubation im Zellkulturschrank erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und einem 5%igen Volumenanteil CO₂.

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Materialien und Lösungen. Die Trypsin-Lösung wurde zusätzlich bei der Zugabe filtriert.

Der Austausch des Kulturmediums erfolgte alle 3-4 Tage. Bei ca. 80%iger Konfluenz (bei HaCaT-Zellen nach mehrtägiger Konfluenz) wurden die Zellen wie folgt passagiert: Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin gespült. Nach erneuter Absaugung wurde 1 ml frisches Trypsin über den gesamten Flaschenboden verteilt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 37°C, bis sich unter mikroskopischer Kontrolle alle Zellen

vom Untergrund gelöst und vereinzelt hatten. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 9 ml Medium gestoppt. Bei MCF-10A-Zellen wurden stattdessen 3 ml Trypsininhibitor zugegeben, da MEGM-Medium kein Trypsin-inaktivierendes FCS enthält. Von der resultierenden Zellsuspension wurden abhängig von der Zelllinie 0,25 ml bis 5 ml in der Kulturflasche belassen und diese mit Medium auf 10 ml aufgefüllt.

Zum Auszählen von Zellen wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte unter Einbeziehung der Verdünnung und ausgezählter Zellen pro Flächeneinheit der Kammer.

3.2.2 Antikörperentwicklung

3.2.2.1 Herstellung der Antiseren

Zwei Kaninchen wurden von der Firma Eurogentec S.A. (Herstal, Belgien) mit jeweils einem Peptid immunisiert. Die Peptide wiesen folgende Sequenzen auf: Peptid 1: H₂N- GKK QNR KTG NSK TQS C- CONH₂, Peptid 2: H₂N- EIQ RTP QRY SSR RAT P- CONH₂. Sie wurden an KLH (keyhole limpet hemozyanin), das als Träger für Antigene dient, gekoppelt. Die gewonnenen Antiseren und jeweils ein Präimmuserum standen uns für die folgenden Aufreinigungen und Versuche zur Verfügung.

3.2.2.2 Affinitätsreinigung der Antikörper

Peptid 1 wurde an Thiopropyl-Sepharose und Peptid 2 wurde an Bromcyan-Sepharose (CNBr-activated Sepharose) gekoppelt. Sepharose ist ein Agarose-Derivat in Form kleiner Kügelchen mit definierter Porengröße und wird bei der Affinitätschromatographie als Matrix verwendet. Thiopropyl-Sepharose enthält eine Thiolgruppe, die eine kovalente Bindung an das Cystein von Peptid 1 ermöglicht. Bei Bromcyan-Sepharose erfolgt die Bindung an die Matrix über eine primäre Aminogruppe des Liganden. Hierzu wurde Bromcyan-Sepharose erneut mit 1 mM Salzsäure gewaschen und über Nacht mit Kopplungspuffer und dem Peptid 2 inkubiert, gewaschen (2-mal mit Kopplungspuffer und 1-mal mit 0.1 M Acetat, 0.5 M NaCl, pH 4) und anschließend mit Blocking-Puffer über Nacht geblockt. Die Thiopropyl-Sepharose wurde mit destilliertem Wasser gewaschen, danach mit Bindungspuffer und Peptid 1 über Nacht inkubiert und anschließend mehrfach mit Bindungspuffer gewaschen.

Die Affinitätsreinigung wurde in Falcon-Röhrchen im Batch-Verfahren durchgeführt, d.h. alle Schritte erfolgten im selben Reaktionsgefäß. Dazu wurden die Peptid 1- bzw. Peptid 2-Sepharose in Bindungspuffer suspendiert. Äquilibration, Waschschritte und Elution wurden mittels Zentrifugation (1 min bei 2000x g) durchgeführt, wobei die Sepharose im Falcon-Röhrchen sedimentiert. Das Äquilibrieren der Sepharose erfolgte in Bindungspuffer, anschließend Inkubation mit Serum, Waschen mit Bindungspuffer, und Elution mit Glycin-Puffer. Die Proteine in den Eluaten wurden mittels Spektroskopie vermessen. Auf der Basis eines allgemeinen Extinktionskoeffizienten für Antikörper und der Extinktion bei 280 nm konnte die Konzentration berechnet werden. Von dem über Peptid 1-Sepharose eluierten Antikörper wurde später eine größere Menge hergestellt.

3.2.2.3 *Elektrophorese der Eluate*

Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Polyacrylamidgelen (17% Acrylamid) bei 20 mA. Vier Volumen Probe wurden mit einem Volumen SDS-Auftragspuffer (jeweils reduzierender und nicht reduzierender Puffer) vermischt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Unter reduzierenden Bedingungen kommt es zur Trennung der leichten und der schweren Ketten des Antikörpermoleküls, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

3.2.2.4 *ELISA*

KLH-gekoppeltes Peptid 1 (KLH, keyhole limpet hemozyanin) wurde zu einer Konzentration von 2 µg/ml in Coating-Puffer verdünnt. Davon wurden 50 µl je Well einer 96-well-Mikrotiterplatte, in jeweils 24 Wells für die beiden Antikörper und zusätzlich in 5 Wells für den Leerwert gegeben. Zur Anhaftung erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde 3-mal mit 1x PBS, 0,1% Tween 20 gewaschen. In jedes Well einer Reihe wurden 50 µl Rotiblock vorgelegt und die eluierten Antikörper mit Rotiblock zu einer Konzentration von 20 µg/ml verdünnt. Hiervon wurden 100 µl in das erste Well einer Reihe auf der Mikrotiterplatte gegeben, davon wiederum 50 µl in das nächste Well überführt mit dem vorgelegten Rotiblock vermischt und hiervon erneut 50 µl in das übernächste Well überführt, vermischt usw. Nach einer Inkubationszeit von 1½ Stunden bei Raumtemperatur und 3-maligem Waschen wurde der Sekundärantikörper (Anti-Rabbit, Meerrettichperoxidase-markiert), 1: 500 in Rotiblock verdünnt, zugegeben. Nach 1-stündiger Inkubation und erneutem 3-maligen Waschen konnte das Substrat (Trimethylbenzidin) hinzugefügt werden, nach 10-minütiger Inkubation wurde mit 1 M Schwefelsäure die Reaktion gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen.

3.2.3 Western Blot

3.2.3.1 *Protein-Isolierung*

Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, die Trypsinwirkung mit frischem Medium bzw. mit Trypsinhibitor gestoppt. Das durch 7-minütige Zentrifugation bei 300x g gewonnene Zellpellet wurde je nach Größe in 100 bis 200 µl Laemmli-Puffer (zzgl. 5% β-Mercaptoethanol) inkubiert, mit Hilfe einer Insulinspritze homogenisiert und für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.2.3.2 *Protein-Konzentrationsbestimmung*

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem Bradford-Verfahren. Durch die Bindung von Coomassie brilliant blue G 250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs (465 nm ohne Protein, 595 nm nach Proteinbindung). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Es wurde der Protein-Assay der Firma Bio-Rad verwendet, die Durchführung folgte der entsprechenden Anleitung.

3.2.3.3 *Elektrophorese und Transfer*

Die Elektrophorese wurde in SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt unter Verwendung 1 mm starker, 10%-Acrylamid-Gele (NuPage, Invitrogen). Die Proben wurden in folgender Weise vorbereitet:

50 µg Protein
5 µl LDS Sample Buffer
2 µl Sample Reducing Agent
ad 20 µl H₂O

Im Ansatz herrschten reduzierende Bedingungen, wodurch es zur Trennung von Disulfidbrücken innerhalb der Proteine kommt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt und gemeinsam mit dem Größenmarker Standard See Blue Plus2 (Invitrogen) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V.

Vor dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden Gel, Membran und Whatman-Papier für 30 Minuten in Transferpuffer gelegt. Der Transfer erfolgte im Semi-Dry-Verfahren bei 18 V. Durch Inkubation der Membran über Nacht in Blocking-Puffer wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert.

3.2.3.4 *Antikörperbindung und Belichtung*

Der p40-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt und dazu entsprechend mit Blocking-Puffer verdünnt. Beim Aktin-Antikörper betrug die Verdünnung 1:1000 (in Blocking-Puffer). Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über 2 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde 2-mal mit Aqua dest. und 1-mal mit PBS, 0,1% Tween 20 für jeweils 5 Minuten gewaschen. Der Sekundärantikörper, Meerrettichperoxidase-gebunden und 1:5000 in Blocking-Puffer verdünnt, wurde 90 Minuten mit der Membran inkubiert. Dann wurde wieder wie oben beschrieben gewaschen. Die Chemolumineszenzreaktion erfolgte mit dem ECL Western blotting detection reagent and analysis system von Amersham Biosciences entsprechend den Angaben des Herstellers. Anschließend konnten hierdurch ECL-Hyperfilme belichtet werden.

Da das Molekulargewicht von β -Aktin bei 42 kD liegt, mussten für die Auftragskontrolle die gebundenen Antikörper von den Membranen gewaschen werden, da sich sonst die Aktin- und die p40-Bande überlagern würden. Hierzu wurde der Western Blot Recycling Kit der Firma Alpha Diagnostic International verwendet.

3.2.4 *Immunhistochemie*

Die immunhistochemische Analyse erfolgte an Proben der Routinediagnostik, bei denen das Einverständnis zur Verwendung für wissenschaftliche Untersuchungen vorlag. Die ca. 5 µm dicken Schnitte wurden zunächst in Xylol entparaffiniert, anschließend folgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe. Eine 5-minütige Erhitzung unter Überdruck in Zitratpuffer ging der Antikörper-Färbung voraus, die bei 4°C mit dem 1:1000 verdünnten, polyklonalen p40-Antikörper über Nacht erfolgte. Die Inkubation mit dem biotinyliertem anti-rabbit-Zweitantikörper sowie dem multilink biotin-streptavidin-amplified detection system erfolgte über jeweils 20 Minuten bei Raumtemperatur, die Anfärbung schließlich durch das fast-red chromogen system.

3.2.5 RT-PCR

3.2.5.1 *Isolierung von zytoplasmatischer RNA*

Die Zellen wurden trypsiniert, gewaschen und pelletiert, anschließend in 175 µl RLN-Puffer (Qiagen) aufgenommen und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Auf diese Weise kommt es zur Lyse der Zellmembranen. Anschließend wurden die Zellkerne 2 Minuten bei 300x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) aus dem Überstand gemäß den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser aus den Säulen eluiert, vermessen und bei -80 °C gelagert.

3.2.5.2 *Ultrazentrifugation des Zelllysates*

Die Ultrazentrifugation wird sowohl zur Isolierung von Ribosomen² als auch zur Fraktionierung von mRNA¹³ verwendet. Die Lyse der Zellen erfolgte wie oben, die Kerne wurden abzentrifugiert. Dann wurde das Zelllysat auf einen kontinuierlichen Sucrose-Gradienten (5%-40%) aufgetragen und für 4 Stunden bei 285000x g in einem SW40 Ausschwingrotor einer Optima L-Ultrazentrifuge (Beckman) zentrifugiert. Zur RNA-Isolierung erfolgte die Bildung fünf gleichgroßer Fraktionen des Röhrcheninhalts und somit entlang des Gradienten. Die Isolierung folgte der Gebrauchsanleitung des RNeasy Kit, wobei entsprechend dem Volumen der einzelnen Fraktionen größere Mengen an RLN-Puffer und Ethanol eingesetzt wurden.

3.2.5.3 *Herstellung des Sucrosegradienten*

In ein 10 ml-Ultrazentrifugationsgefäß wurden jeweils 2ml 40%ige, 31,25%ige, 22,5%ige, 13,75%ige sowie 5%ige Sucrose vorsichtig geschichtet (Protokoll unter <http://www.bio.com>). Die Sucrose wurde zuvor in TE-Puffer gelöst. Nach 16-stündiger Inkubation bei 4°C bildet sich ein kontinuierlicher Gradient.

3.2.5.4 *RNA-Konzentrationsbestimmung*

Die Bestimmung der RNA-Konzentration beruht auf dem UV-Absorptionsmaximum von RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Von jeder Probe wurden zur Doppelbestimmung zwei 1:50 Verdünnungen hergestellt, und deren optische Dichte im UV-Spektrometer vermessen. Aus dem Mittelwert ergibt sich unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors und eines weiteren, für

einzelsträngige Nukleinsäuren geltenden Faktors von 40 µg/µl die Probenkonzentration.

3.2.5.5 Reverse Transkription

Mittels Reverser Transkription wird die isolierte RNA mit Hilfe von Random Primern (Hexamere) in cDNA umgeschrieben, die als Basis für die folgende PCR dient. Der gesamte Ansatz hierzu war folgendermaßen zusammengesetzt:

- 1 µg RNA
- 2 µl Hexamere
- 5 µl MMLV-Puffer
- 1 µl MMLV (200 U)
- 0,625 µl RNAsin (25 U)
- 1,25 µl dNTP
- ad 10,75 µl H₂O

RNA und Hexamere wurden zunächst auf 70°C erhitzt. Hierbei kommt es zur Trennung der Doppelstränge. Danach konnten die anderen Substanzen dem Ansatz zugegeben werden. Beim Abkühlen kommt es zur Anlagerung der Hexamere. Die Synthese der cDNA erfolgte bei der anschließenden einstündigen Inkubation bei 37 °C im Thermocycler.

3.2.5.6 Polymerase Ketten-Reaktion

Als Template wurden je Probe 5 µl aus der Reversen Transkription vorgelegt und um 20 µl Mix ergänzt. Der Mix hatte folgende Zusammensetzung:

- 12,5 µl PCR-Master Mix
- 1,0 µl forward Primer (10 µM)
- 1,0 µl reverse Primer (10 µM)
- 5,5 µl H₂O

Die Ansätze durchliefen im Thermocycler folgendes Programm:

- a) 1 min 94°C (initiale Denaturierung)
- b) 1 min 94°C (Denaturierung)
- c) 1 min 55/59°C* (Annealing der Primer)
- d) 1 min 72°C (Elongation durch Polymerase)
- e) 10 min 72°C (finale Elongation)
- f) ∞ 4°C

*Für die L1 5' end Primer wurde als Annealing-Temperatur 59 °C eingestellt, für die GAPDH-Primer 55 °C .

Die Schritte b) bis d) durchliefen 35 Zyklen für die L1-5' end Primer, für die GAPDH 30 Zyklen.

3.2.5.7 Auftrennung der PCR-Produkte

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 1%igem Agarose-Gel, das mit 1x TAE-Elektrophoresepuffer unter Zusatz von 0,1% Ethidiumbromid gegossen wurde. Nach Zugabe von 10 Vol% DNA-Ladepuffer wurden von jeder Probe 10 µl, sowie zur Bestimmung der Fragmentlängen eine 100 bp-Standard-Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 30 Minuten bei 100 V in 1x TAE-Elektrophoresepuffer; die Banden wurden anschließend bei 254 nm auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.2.5.8 Sequenzierung

Das entsprechende PCR-Produkt wurde auf einem Gelbetrachter aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die anschließende DNA-Isolation erfolgte mit dem Qia-quick-Gelextraktionskit der Firma Qiagen nach Anleitung. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration wurde der Sequenzieransatz mit dem Big Dye Sequenzierkit (Applied Biosystems) folgendermaßen vorbereitet:

- 2 µl Big Dye Mix
- 8 µl Big Dye Puffer
- 6 µl DNA (40 ng/µl)
- 2 µl Primer (3,2 µM)

Es erfolgten zwei Ansätze, einmal mit dem L1-5' end forward-Primer, zum anderen mit dem reversen Primer. Anschließend wurden dem Ansatz 2 µl 125 mM EDTA und 2 µl 3 M Natrium-Acetat sowie 50 µl Ethanol zugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation wurde für 30 Minuten bei 4°C und 4600x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit Ethanol 70% gewaschen. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation (wie oben) erfolgte die Eintrocknung des Pellets. Die Sequenz wurde im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit einem ABI 3100 Genetic Analyzer ermittelt.

3.2.6 L1-Retrotranspositionsassay

Der Retrotranspositionsassay ist eine Methode zum Nachweis von Retrotranspositionsereignissen in der Zellkultur. Hierzu werden Zellen mit einem Vektor, der ein Puromycin-Resistenzgen enthält, transfiziert. Das ermöglicht eine Selektion der transfizierten Zellen. Außerdem befindet sich auf dem Vektor ein Resistenzgen (Ampicillin- bzw. Kanamycin-

Resistenz) zur Vermehrung in *E. coli*. Auf dem Vektor befindet sich weiterhin ein vollständiges L1-Element mit einem Markergen (EGFP). EGFP (enhanced green fluorescent protein) wird erst nach erfolgter Retrotransposition des L1-Elementes gebildet. EGFP ist ein Protein, das zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS können Zellen, in denen Retrotranspositionsereignisse stattgefunden haben und die somit EGFP exprimieren, erfasst werden.⁴¹

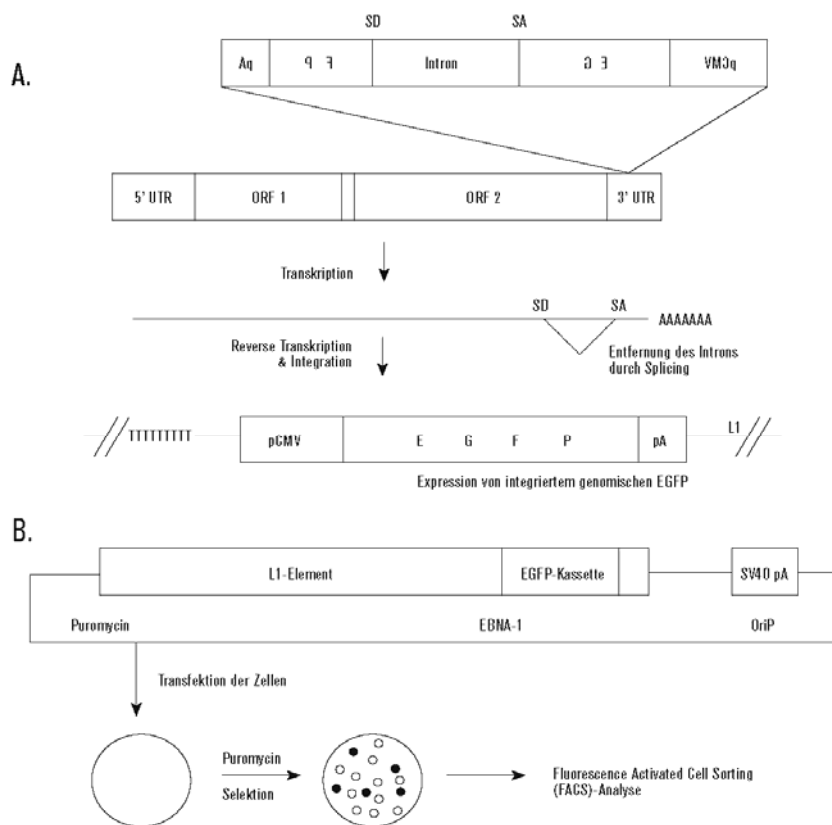


Abbildung 7: Modell des Zellkultur-basierten Retrotranspositionsassays. Modifiziert nach Ostertag et al.³⁹

A: Eine EGFP-Kassette ist in den 3' UTR eines L1-Elementes in Antisense-Richtung (durch spiegelbildliche Schrift verdeutlicht) kloniert. Die Kassette enthält einen CMV-Promotor (pCMV) und ein EGFP-Gen, welches durch ein Intron unterbrochen ist und ein poly-A-Signal(pA). Splice-Donor- und Splice-Acceptor-Stelle (SD und SA) sind gekennzeichnet. EGFP wird erst nach Spleißen, reverser Transkription und Integration (in das zelluläre Genom) des L1-Elementes exprimiert.

B: Das L1-Element mit der EGFP-Kassette ist in einen pCEP4-basierten Expressionsvektor kloniert. Dahinter („stromabwärts“) befindet sich ein poly-A-Signal (SV40pA). Der Vektor kann in eukaryoten Zellen über OriP/EBNA1 (origin of replication) als Episom repliziert werden. Der Vektor enthält außerdem ein Puromycin-Resistenzgen zur Selektion der transfizierten Zellen.

3.2.6.1 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurden verdünnte Plasmid-DNA (40 ng) und 50 µl *E. coli*-DH5alpha (Invitrogen) für 30 Minuten auf Eis inkubiert, danach für 45 Sekunden auf 42°C erwärmt und anschließend wiederum für 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 200 µl SOC Medium (Invitrogen) und einstündiger Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler erfolgte das Austreichen auf einer Agarplatte. Der Agar enthielt 50 µg/ml Ampicillin (Reporterplasmid) bzw. Kanamycin (pEGFP-N1). Die Platte wurde dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.6.2 Bakterienkultur

Die Grundlage der Bakterienkultur waren die mit den Plasmiden transformierten *E. coli*-Bakterien. Das L1_{RP}-Plasmid enthält ein Ampicillin-Resistenz-Gen, das pEGFP-N1-Plasmid ein Kanamycin-Resistenz-Gen, wodurch die Bakterien selektierbar waren. Daher wurde für alle hier beschriebenen Schritte das LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin versetzt. Zunächst wurde eine Kolonie „gepickt“ und mit 2 ml LB-Medium für 8 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert (Starter-Kultur). Danach wurde die Starter-Kultur in 500 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

3.2.6.3 Plasmid-Isolierung

Die Bakterienkultur wurde bei 6000x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Qiagen Maxi Prep Kits und folgte den Anweisungen des Herstellers. Die gewonnene DNA wurde zur Weiterverwendung auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.2.6.4 Transfektion und Selektion

Die Transfektion von SK-MEL-13-, MCF-7- und OVCAR-3-Zellen erfolgte unter Verwendung des liposomalen Transfektionssystems Fugene (Roche) und folgte dem Protokoll des Herstellers. Es wurden 2 µg DNA (L1_{RP}- bzw. pEGFP-N1-Plasmid) und 4 µl Fugene (in 96 µl OptiMem-Medium) je Well einer 6-well-Platte eingesetzt. Die Transfektion der Zellen mit pEGFP-N1

diente der Kontrolle der Transfektionseffizienz. Die Zelllinien HOSE, MCF-10A, HaCaT und HT-29 ließen sich nur unzureichend mit herkömmlichen Transfektionsmethoden transfizieren. Deshalb wurde das Nucleofector-System von Amaxa verwendet. Die Nucleofector-Technologie basiert auf einer Kombination elektrischer Parameter und spezieller Lösungen.¹ 24 Stunden nach der Transfektion wurde mit der Puromycin-Selektion begonnen. Die optimale Konzentration des Antibiotikums für eine Zelllinie wurde jeweils über Konzentrationsreihen ermittelt. Hierfür wurden L1_{RP}-transfizierte und nicht transfizierte Zellen verschiedenen Puromycin-Konzentrationen ausgesetzt. Bei der zur Selektion optimalen Konzentration sind die nicht transfizierten Zellen alle abgestorben.

3.2.6.5 Optimierung der Transfektion

Die Optimierung der Transfektion erfolgte durch Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels FACS. Hierzu wurden die Zellen entsprechend den Optimierungsprotokollen der Hersteller mit pEGFPN1 transfiziert. Transfizierte Zellen exprimieren CMV-Promotor-gesteuert EGFP und können anhand ihrer Fluoreszenz eindeutig identifiziert werden. Das ermöglichte eine Abschätzung der Transfektionseffizienz. Die FACS-Messung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion.

3.2.6.6 Fluoreszenzmikroskopie und FACS- Auswertung

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte unter Verwendung eines Nikon Eclipse TS100-Phasenkontrastmikroskops mit Epifluoreszenzeinrichtung und Kameraausgang. Mit Fluoreszenzmikroskopie wurde täglich überprüft, wann erste Retrotranspositionereignisse auftraten.

Die FACS-Messungen erfolgten an einem FACSCalibur der Firma Becton Dickinson. In FACS (fluorescence activated cell sorting)-Geräten kommt die Technik der Durchflusszytometrie zur Anwendung. Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Im Gerät befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit, in welche die zu messende Zellsuspension eingebracht wird. Durch die höhere Geschwindigkeit der Trägerflüssigkeit vereinzeln die Zellen und werden auf diese Weise fixiert an einem Laser vorbeigeführt. Der Laser führt zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. EGFP, welche wiederum Licht emittieren. Die Zellen können aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften, aber auch nach morphologischen

Zellparametern unterschieden werden. Die Vorwärtsstreuung (FSC= forward scatter) wird von der Größe der Zelle, die Seitwärtsstreuung (SCC = side scatter) von der Granularität der Zelle bestimmt. Die Signale werden mittels Photomultiplier verstärkt, von Detektoren gemessen und zur Auswertung auf einen Computer übertragen. Die Ausgabe der Daten geschah in Form eines Dot Plots in dem die Seitwärtsstreuung gegen die Granularität aufgetragen ist und als Histogramm der Fluoreszenzintensität.

Die FACS-Auswertung der L1_{RP}-transfizierten Zellen erfolgte 16 Tage nach der Transfektion. Für die FACS-Messung wurden die Zellen folgendermaßen vorbereitet: 1-1.5 ml 1x PBS, 10 mM EDTA wurde je Well einer 6-well-Platte auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation bei 37°C kommt es zur Ablösung und weitgehenden Vereinzelung der Zellen. Im Brutschrank wurde so lange inkubiert bis alle Zellen sich abgelöst hatten. Unmittelbar vor der FACS-Messung erfolgte die Überführung der Zellen in 5 ml-Tubes (mit Zellsieb zur Entfernung von verklumpten Zellen). Es wurden die mit L1_{RP}- und mit pEGFP-N1-transfizierten sowie nicht transfizierte Zellen als Kontrolle vermessen.

Am Dot Plot wurde die Einstellung der Quadranten nach den Parametern FSC und SCC so vorgenommen, dass tote Zellen und Zelltrümmer nicht mit in die Auswertung eingingen. Anhand des Histogramms (Häufigkeit als Funktion der Fluoreszenzintensität FL1-H) wurde ein Bereich definiert (Gating). Die Ereignisse in diesem Bereich wurden als Anteil der Gesamt Ereignisse berechnet (prozentualer Wert). Die Grenze des Gates wurde am Fuß des Autofluoreszenzberges gesetzt. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zelllinien, konnte anhand des optischen Eindrucks im Histogramm (erkennbare Ereignisse innerhalb des Gates) in Kombination mit dem ermittelten Prozentwert, bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte mit dem FACS-Datenbearbeitungsprogramm FCS3 Express von De Novo Software, Thornhill, Kanada. Das Fehlerbalkendiagramm wurde mit SPSS12.0 erstellt.

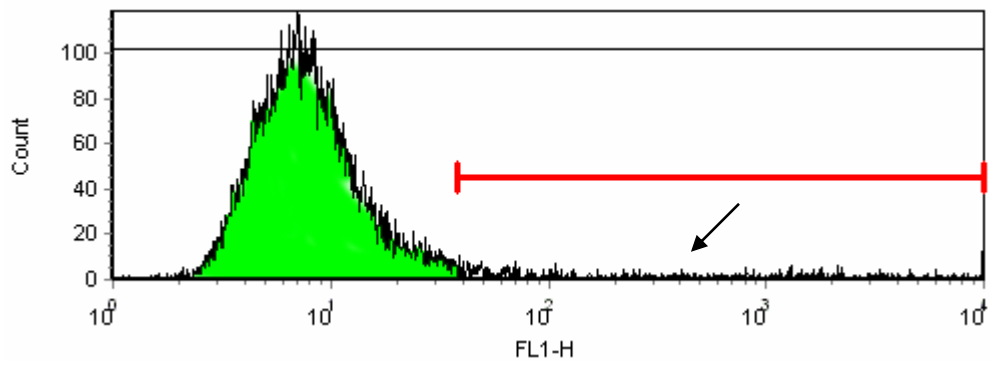


Abbildung 8: Histogramm der Fluoreszenzintensität. Der rot markierte Bereich stellt das Gate dar. Die so erfassten Zellen gehen in die Auswertung ein und werden als prozentualer Wert (von allen Zellen angegeben). Die Grenze des Gates wurde an den Fuß des Autofluoreszenzberges gesetzt. Zu erkennen sind fluoreszierende Zellen innerhalb des Gates (Pfeil).

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis des ORF1-Proteins p40

Das erste offene Leseraster (ORF1) eines L1-Retrotransposons kodiert für ein 40 kD Protein (p40-Protein). Dieses Protein hat eine Chaperone-Funktion für die L1-RNA. Eine Expression deutet auf L1-Transpositionen hin.

Da es bisher keinen kommerziell verfügbaren p40-Antikörper gibt, wurden von Eurogentec S.A. (Herstal, Belgien) 2 Kaninchen mit immunogenen Peptiden immunisiert. Die gewonnenen Antiseren und jeweils ein Präimmunsereum standen uns für die folgenden Aufreinigungen und Versuche zur Verfügung.

4.1.1 Affinitätsreinigung des Antikörpers

Zwei Immunsereen wurden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierfür wurden die zur Immunisierung verwendeten Peptide an Thiopropyl-Sepharose (Peptid 1-Sepharose) bzw. Bromzyan-Sepharose (Peptid 2-Sepharose) gekoppelt.

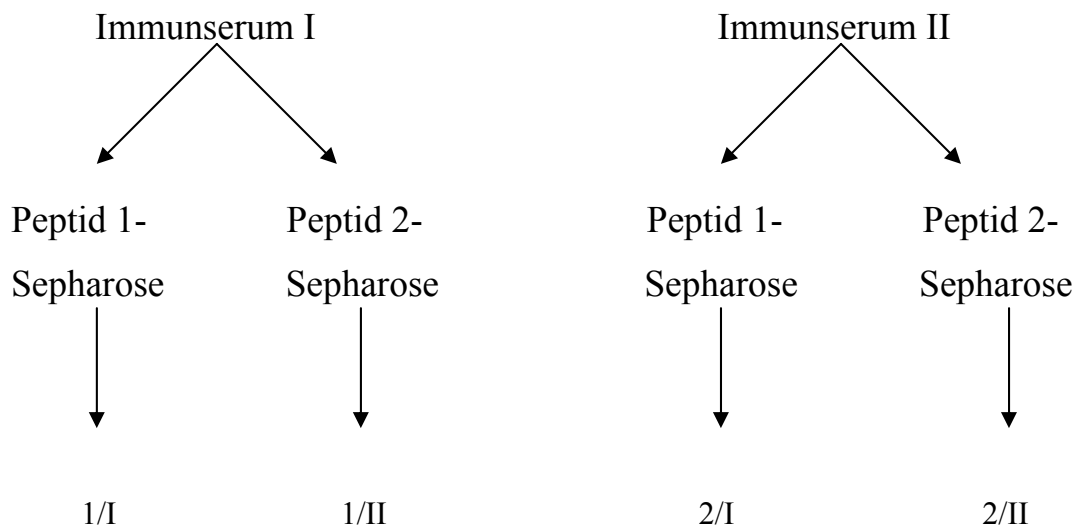


Abbildung 9: Schema zur Vorgehensweise bei der Affinitätsreinigung. Mit 1/I, 1/II, 2/I, 2/II sind die jeweiligen Eluate bezeichnet.

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurde mittels Elektrophorese überprüft, dass

Antikörper eluiert worden waren. Die Ermittlung der Antikörperkonzentration erfolgte spektrometrisch.

Nur der mit 1/I bezeichnete Antikörper lieferte in ersten Anwendungen im Western Blot zufrieden stellende Ergebnisse. Mit diesem Antikörper wurde ein ELISA zur Ermittlung einer Bindungskurve an das KLH-gekoppelte Peptid (KLH= keyhole limpet hemozyanin, dient als Träger für Antigene) durchgeführt. Die KLH-gekoppelten Peptide waren zur Immunisierung eingesetzt worden. Die Extinktion zeigt die Antikörperbindung in Beziehung zur Konzentration des Antikörpers an.

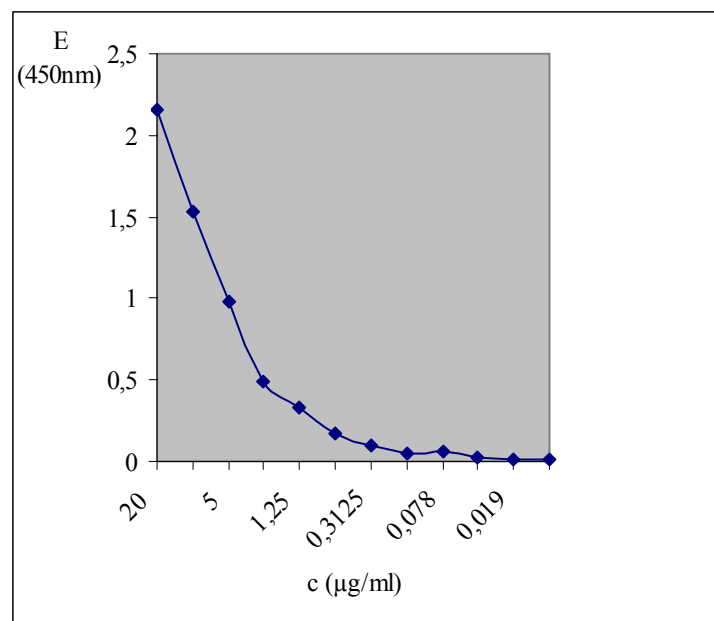


Abbildung 10: Bindungskurve des Antikörpers 1/I. Dargestellt ist die Anbindung bei verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers an das Antigen.

4.1.2 Immunhistochmie

Zur immunhistologischen Untersuchung wurden mit Hoden und Lymphknoten zwei Gewebe ausgewählt, für die in der Literatur eine p40-Expression beschrieben ist. Außerdem erfolgte die Färbung von zwei Geweben mit neoplastischen intraepithelialen Läsionen (PIN und DCIS).

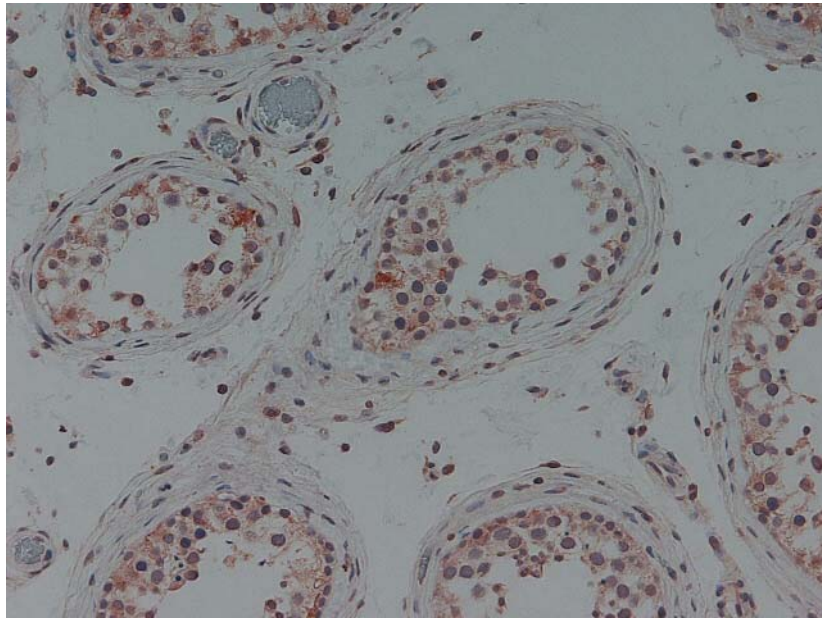
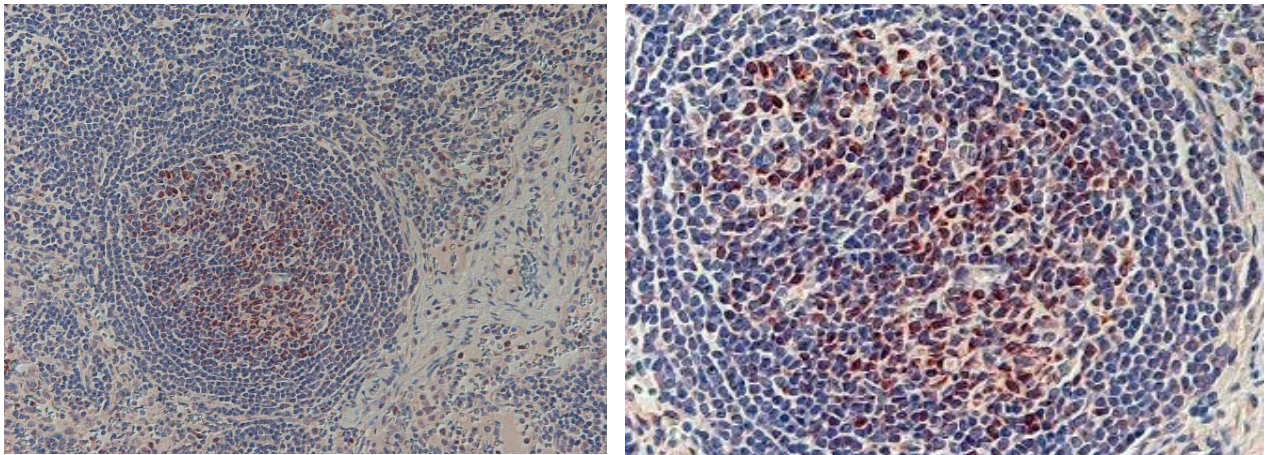


Abbildung 11: Hodengewebe mit p40 Expression in den Keimzellen.



a

b

Abbildung 12: a) Ausschnitt aus einem Lymphknoten mit einem Lymphfollikel. b) Der Lymphfollikel vergrößert. Insbesondere im Keimzentrum findet sich Expression des ORF1-Proteins p40.

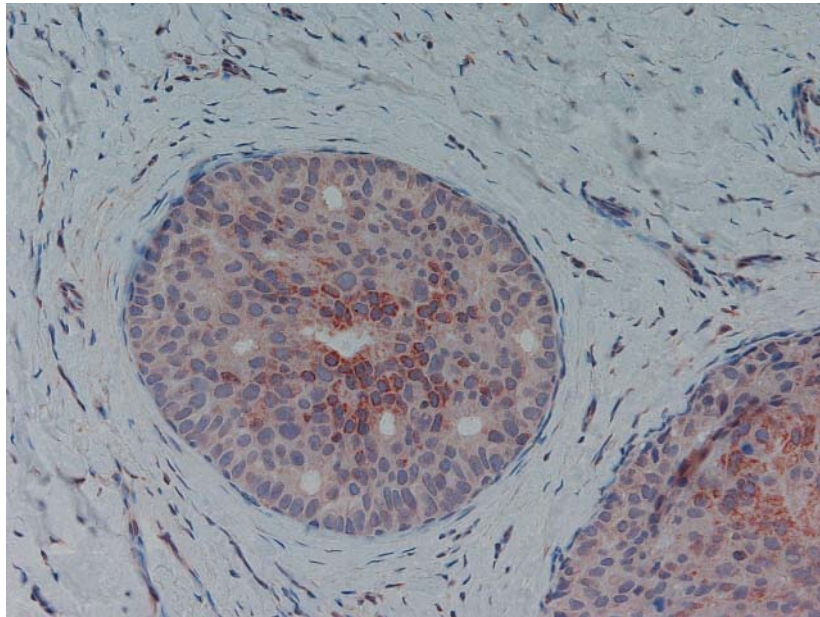


Abbildung 13: Duktales Carcinoma in situ der Mamma (DCIS) mit p40-Expression in den neoplastischen Anteilen.

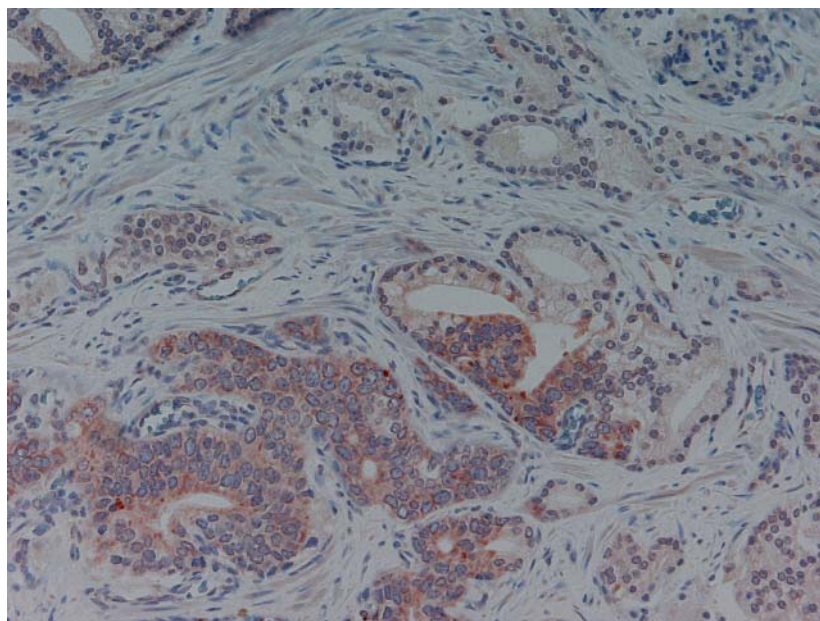


Abbildung 14: Prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN), p40-Expression nur in den maligne veränderten Drüsenanteilen und nicht im Normalgewebe.

Es zeigte sich eine deutliche Expression des ORF1-Proteins p40 in Keimzellen im Hoden (Abbildung 12) sowie in Lymphfollikeln (Abbildung 13). Hier ist die p40-Expression

insbesondere im Keimzentrum zu finden. Die Präneoplasien DCIS und PIN zeigen im Unterschied zum umgebenden nicht maligne veränderten Gewebe eine deutliche Expression des ORF1-Proteins.

4.1.3 Western Blot

Zum p40-Proteinnachweis in Zellkulturen wurde der Nachweis mittels Western Blot etabliert. Hierzu wurden die Menge an eingesetztem Antikörper, an eingesetztem Protein und die Bedingungen, unter denen die Membranen geblockt wurden (dient dem Absättigen von Proteinbindungsstellen vor der Antikörperreaktion), optimiert.

Anschließend wurden sieben Zelllinien auf eine Expression des ORF1-Proteins untersucht: vier Tumorzelllinien (Ovarialkarzinom: OVCAR-3, malignes Melanom: SK-MEL-13, Kolonkarzinom: HT-29, Mammakarzinom: MCF-7) und drei Zelllinien, die aus normalen Epithelien etabliert worden waren (Keratinozyten: HaCaT, Mamma: MCF-10A, Ovar: HOSE).

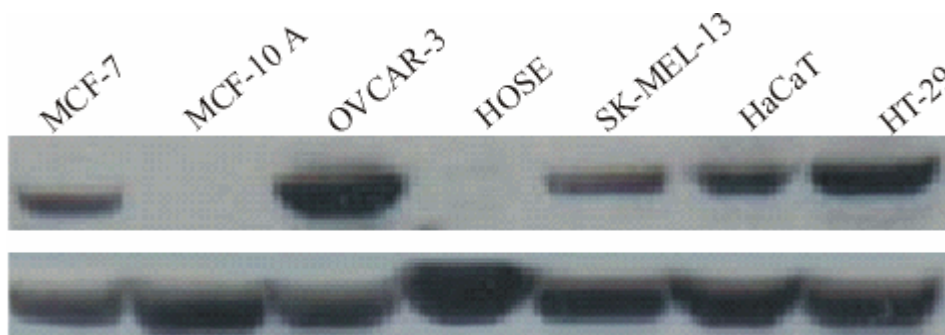


Abbildung 15: Western Blot. Oben: ORF1 (p40)-Protein, unten: Ladungskontrolle mit β -Aktin.

Alle Tumorzelllinien sowie die Zelllinie HaCaT exprimieren das p40-Protein. In MCF-10A- und HOSE-Zellen war keine p40-Expression nachweisbar.

4.2 Nachweis vollständiger L1-Transpositionen

Mittels eines Zellkultur-basierten Retrotranspositionsassays können Retrotranspositionen eines in Zellen eingebrachten, markierten L1-Elementes ($L1_{RP}$) erfasst werden. Zellen, in denen

Retrotranspositionen stattgefunden haben, exprimieren EGFP (enhanced green fluorescent protein). EGFP ist ein Protein, das zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS kann die L1-Aktivität erfasst werden.

4.2.1 Transfektion

Die Transfektion der Zellen erfolgte mit den Transfektionssystemen Fugene (Roche) und Nucleofector (Amaxa). Bei der Transfektion mit dem Amaxa-System mussten fertige Nucleofector-Lösungen und voreingestellte Programme des Transfektions-Gerätes aufeinander abgestimmt werden.

Wie effektiv die Transfektionsmethoden waren, wurde mittels FACS nach Transfektion der Zellen mit einem pCEP4-EGFP-Vektor (pEGFP-N1) bestimmt. Die transfizierten Zellen beginnen etwa nach 12 Stunden EGFP zu exprimieren, was mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden kann. Die FACS-Auswertung erfolgte anhand des Histogramms der Floreszenz, was in Abbildung 16 beispielhaft für die Zelllinie SK-MEL-13 dargestellt ist. Die Ergebnisse der Transfektionsoptimierung sind in Tabelle 2 dargestellt, die Messungen erfolgten jeweils 48 Stunden nach der Transfektion.

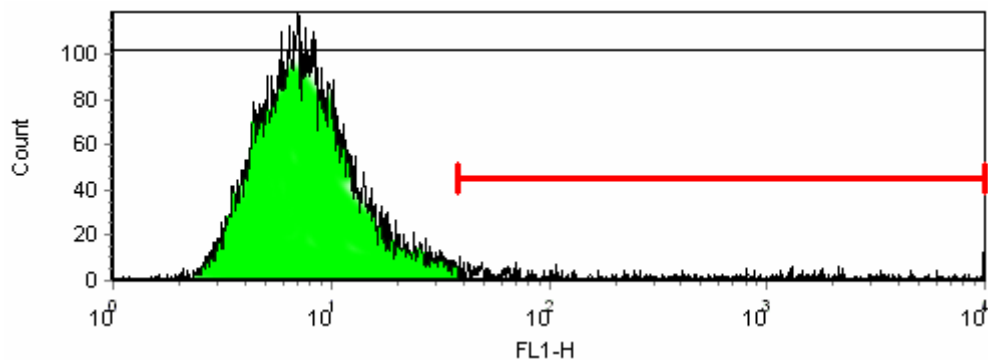


Abbildung 16: Histogramm der Fluoreszenz von SK-MEL-13-Zellen, die mit pEGFP-N1 transfiziert wurden. Der rot markierte Bereich stellt das Gate dar. Die hier erfassten Zellen werden als prozentualer Wert (auf alle Zellen bezogen) angegeben. Dieser Wert entspricht der Transfektionseffizienz für die entsprechende Zelllinie (7% bei SK-MEL-13).

Tabelle 2: Zelllinie, zugehöriges Transfektionssystem und entsprechende FACS-Auswertung der Transfektionseffizienz (Anteil der fluoreszierenden Zellen an allen Zellen in Prozent). Die Nucleofector-Technologie (Amaxa) basiert auf einer Kombination elektrischer Parameter (Programme) und spezieller Lösungen. Die besten Ergebnisse konnten mit den hier gezeigten Kombinationen erreicht werden.

Zelllinie	Transfektionsmethode	Amaxa- Nucleofector		Transfektionseffizienz im FACS (in %)
		Lösung	Programm	
OVCAR-3	Fugene	-	-	60,7
HOSE	Amaxa-Nucleofector	R	G 28	40,6
MCF-7	Fugene	-	-	8,8
MCF-10A	Amaxa-Nucleofector	T	T 24	40,1
SK-MEL-13	Fugene	-	-	7,0
HaCaT	Amaxa-Nucleofector	V	U 20	11,1
HT-29	Amaxa-Nucleofector	V	T 20	36,1

Es konnten bei allen sieben Zelllinien ausreichende Ergebnisse erreicht werden. Allerdings unterschieden sich die Transfektionseffizienzen in erheblichem Maße.

Die Bedingungen, die hier zu den besten Ergebnissen geführt hatten, wurden der Transfektion mit L1_{RP} zugrunde gelegt. L1_{RP} ist ebenfalls pCEP4-basiert.

4.2.2 Fluoreszenzmikroskopie und FACS

Der L1_{RP} -Vektor enthält außerdem ein Puromycin-Resistenzgen zur Selektion der transfizierten Zellen. 24 Stunden nach Transfektion mit L1_{RP} wurde mit der Puromycinselektion begonnen. Die einzelnen Zelllinien unterschieden sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum. Die für die Selektion optimalen Konzentrationen mussten zunächst in Konzentrationsreihen für jede Zelllinie ermittelt werden.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie kann bereits eine qualitative Aussage zur L1-Aktivität gemacht werden. So wurde täglich überprüft, wann erste Retrotranspositions-Ereignisse auftraten.

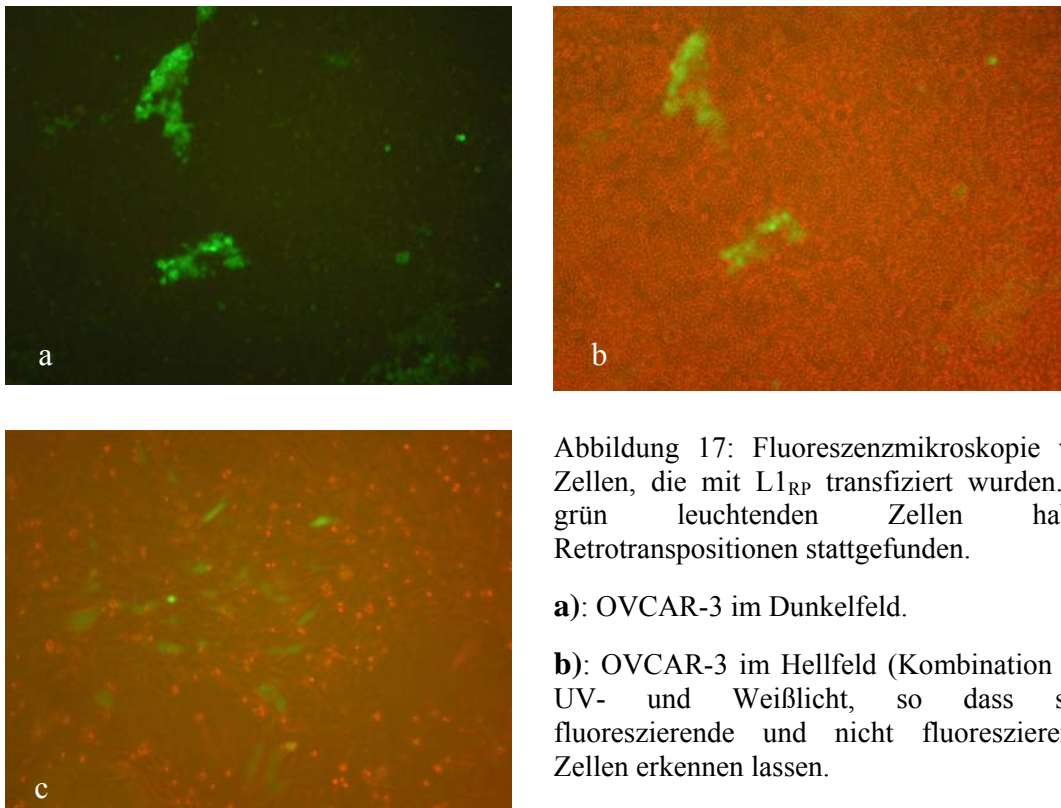


Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopie von Zellen, die mit L1_{RP} transfiziert wurden. In grün leuchtenden Zellen haben Retrotranspositionen stattgefunden.

a): OVCAR-3 im Dunkelfeld.

b): OVCAR-3 im Hellfeld (Kombination aus UV- und Weißlicht, so dass sich fluoreszierende und nicht fluoreszierende Zellen erkennen lassen).

c): SK-MEL-13 im Hellfeld.

Nach 16 Tagen erfolgte die FACS-Messung. Bis dahin wurde die Puromycinselektion fortgeführt.

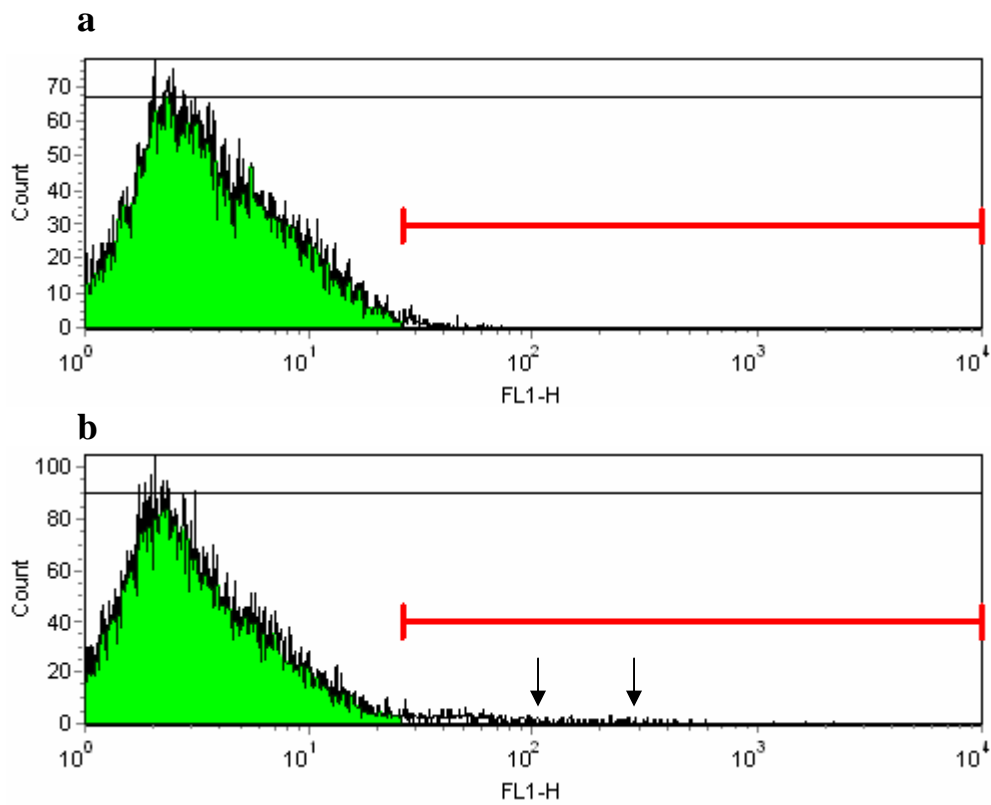


Abbildung 18: Fluoreszenz-Histogramme von OVCAR-3-Zellen. Der rot markierte Bereich stellt das Gate dar.

a) Nicht transfizierte OVCAR-3-Zellen als Leerwert. Beim Setzen des Gates wurden beim Leerwert bis zu 1% positiver Zellen akzeptiert.

b) Mit L1RP transfizierte OVCAR-3-Zellen. Zu erkennen sind mit höherer Intensität fluoreszierende Zellen (Pfeile).

Tabelle 3: Zelllinie, Konzentration des Antibiotikums im Selektionsmedium, qualitative Auswertung im Fluoreszenzmikroskop und quantitative Auswertung im FACS. Der Prozentwert ist das arithmetische Mittel von 4 Messungen und gibt den Anteil der fluoreszierenden Zellen innerhalb der Auswahl (Gate) an allen Zellen an.

Zelllinie	Puromycin- Selektion	Aktivität im Fluoreszenzmikroskop	Aktivität im FACS (in %)
OVCAR-3	10 µg/ml	nach 8 Tagen	2,72
HOSE	0.5 µg/ml	nach 7 Tagen	1,94
MCF-7	0.7 µg/ml	nach 7 Tagen	1,80
MCF-10A	1.0 µg/ml	keine	0,55
SK-MEL-13	1.0 µg/ml	nach 8 Tagen	2,77
HaCaT	1.5 µg/ml	nach 6 Tagen	0,89
HT-29	2.0 µg/ml	nach 9 Tagen	1,93

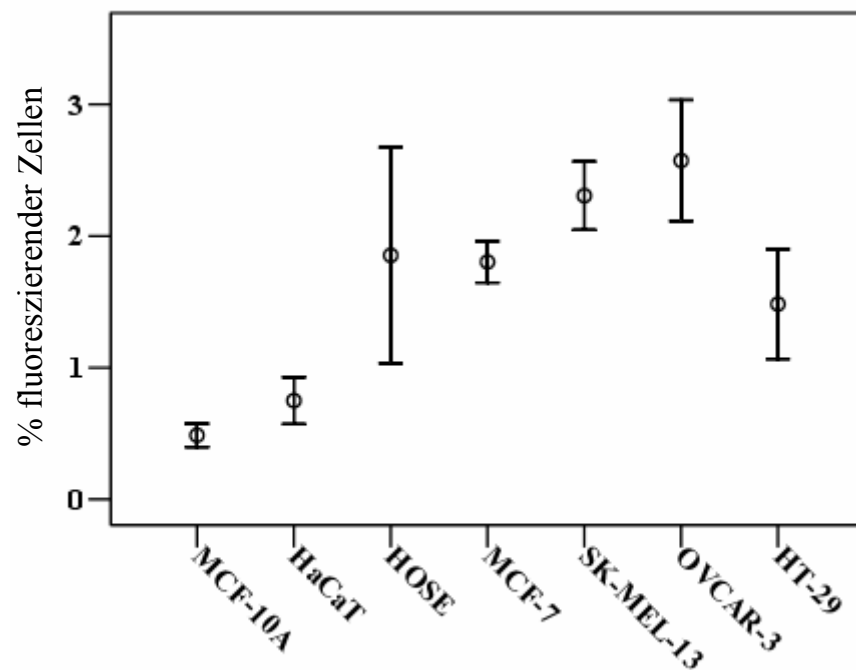


Abbildung 19: Fehlerbalken-Diagramm. Darstellung der Mittelwerte der FACS-Messungen und die doppelten Standardabweichungen der Mittelwerte (Standardfehler x 2).

Von den sieben untersuchten Zelllinien zeigten lediglich MCF-10A-Zellen keine Aktivität im Fluoreszenzmikroskop und eine deutlich niedrigere Aktivität im FACS im Vergleich zu den Tumorzelllinien. Der Wert von 0,55% in der FACS-Auswertung kommt zustande, weil das Gate so gesetzt wurde, dass immer einige Zellen im Autofluoreszenzbereich mit erfasst wurden. Das Histogramm zeigte aber keine Ereignisse im Bereich höherer Fluoreszenzintensität, also rechts des Autofluoreszenzberges. Alle anderen Zelllinien zeigten schon in der Mikroskopie adhärente fluoreszierende Zellen. Diese Befunde konnten durch die FACS-Auswertung bestätigt werden.

Bei den anderen Zelllinien war nach einem Zeitraum von sechs bis neun Tagen fluoreszenzmikroskopisch eine L1-Aktivität nachweisbar. Danach nimmt nach wenigen weiteren Tagen der Anteil an fluoreszierenden Zellen nicht weiter zu und bleibt auf einem stabilen Niveau.

Bei Auswertung der FACS-Daten fanden sich in den Histogrammen häufig Verschiebungen des Autofluoreszenzberges L1_{RP}-transfizierter Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (Leerwert). Dadurch wurde die Auswertung erschwert. In diesen Fällen musste das Gate zur Berechnung des Anteils der fluoreszierenden Zellen jeweils neu gesetzt werden.

4.3 Nachweis von L1-Aktivität mit RT-PCR

Es wurde zunächst versucht, L1-RNA mittels einfacher RT-PCR aus zellulärer gesamt-RNA und aus zytoplasmatischer RNA nachzuweisen. Hierbei konnten aber im Gegensatz zum Western Blot und zum Retrotranspositionsassay nicht die erwarteten Unterschiede zwischen den Tumorzelllinien und den nicht transformierten Zelllinien gefunden werden. Zytoplasmatische RNA wurde verwendet, da nur die mRNA eines vollständigen und somit retrotranspositionskompetenten L1-Elementes ins Zytoplasma gelangt. Die Primer waren so gewählt, dass sie am 5'-Ende des L1-Elementes binden und somit unvollständige (5'-trunkierte L1-Elemente) nicht erfasst werden.

Zur weiteren Auftrennung der zytoplasmatischen Bestandteile wurde das Zellysate ultrazentrifugiert und anschließend RNA entlang dem kontinuierlichen 5-40%igen Sucrose-Gradienten isoliert. m-RNA sollte so von den Ribosomen, die theoretisch auch L1-Sequenzen enthalten können, getrennt werden. Hier konnten zwar Unterschiede gefunden werden. Sie ließen sich aber nicht verlässlich reproduzieren.

Bei der RT-PCR mit den L1 5'end Primern zeigte sich in einigen Zelllinien neben dem 436 bp langen erwarteten PCR-Produkt eine zweite Bande in Höhe von etwa 220 bp.

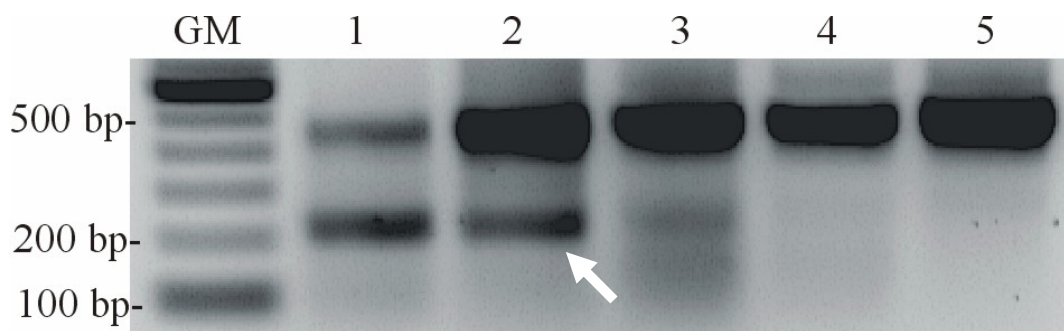


Abbildung 20: RT-PCR mit den L1 5'end Primern aus den 5 Fraktionen, aus denen nach der Ultrazentrifugation RNA (von OVCAR-3-Zellen) isoliert worden war. Mit 1 beginnend sind die Fraktionen von oben nach unten im Zentrifugenröhrchen bezeichnet. In den ersten beiden Fraktionen zeigt sich eine weitere Bande (→) neben dem erwarteten 436 bp-Produkt.

4.3.1

Sequenzierung des 220bp-PCR-Produktes

Die in Abbildung 20 (→) markierte Bande wurde ausgeschnitten, die DNA isoliert, und konnte als ein insgesamt 206 bp langes Fragment sequenziert werden. Das Ergebnis der anschließenden Sequenzierung ist in Abbildung 22 dargestellt.

```
CTCCGGTCTACAGCTCCAGCGTGAGCGATGGAGAAGACGGTGATTTCTGCATTTCCATCTGAGGTACCG
AGTTCATCTCACTGGCTTGGAGAGTCTACGCCACGGAGTCTCACTGATTGCTAGCACAGCAGTCTGAG
ATCAACCTGCAAGGCGGCAGCGAGGCTGCGGGAGGGGCGCCCGCCATTGCCAGGCTTGCTTAGGT
```

Abbildung 21: Amplifizierte 206 bp lange Sequenz. Orange: Primer forward. Blau: Primer reverse. Türkis: ab Base 82 Übereinstimmung mit den bekannten L1-Elementen AF149422 und X58075.

Ab Base 82 fand sich eine Übereinstimmung mit bekannten L1-Elementen. Eine BLAST-Suche ergab eine mehr als 90%ige Übereinstimmung mit den hier aufgeführten Klonen:

- AY139834 Homo sapiens hypothetical protein mRNA
- AK056522 Homo sapiens cDNA FLJ31960 fis, clone NT2RP7007504
- NM_017794 Homo sapiens KIAA1797
- AK024242 Homo sapiens cDNA FLJ14180 fis, clone NT2RP2003799
- AL354879 Human DNA sequence from clone RP11-4E23 on chromosome 9 contains the 5' end of the MLLT3 gene for myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3 (AF9), a novel gene, the 5' end of a novel gene (FLJ2035, KIAA1797) and two CpG islands
- AC116609 Homo sapiens BAC clone RP13-539J13 from 2.

Es finden sich über den amplifizierten Bereich hinaus noch etwa 30 weitere Basen des L1-5'UTR. Dieses Muster ist in allen Klonen identisch.

Offenbar handelt es sich also um eine korrekt amplifizierte Sequenz und nicht um eine falsche Primerbindung.

5 Diskussion

Eine Aktivierung von L1-Retrotransposons könnte an der Entstehung maligner Neoplasien beteiligt sein.²³ Ziel dieser Arbeit war es Methoden zum Nachweis aktiver L1-Retrotransposons zu etablieren und zu validieren. Das geschah anhand von Tumorgewebe und entsprechendem Normalgewebe sowie anhand von Tumorzelllinien und Zelllinien, die aus nicht entarteten Geweben etabliert worden waren. Dabei zeigten sich Unterschiede in der L1-Aktivität.

Aktive L1-Retrotransposons sind bisher nur in wenigen Geweben gefunden worden. Die Aktivität der L1-Elemente ist streng reguliert. In einem von Ostertag et al. entwickelten transgenen Mausmodell mit einem EGFP-markierten humanen L1-Element, konnte das von diesem L1 entstammende Markerprotein in Keimzellen, nicht jedoch in somatischen Zellen nachgewiesen werden.³⁸ In einer anderen Arbeit konnte in Mäusen auch in lymphatischem Gewebe eine L1-Expression gefunden werden, so z.B. in Keimzentren von Lymphknoten und in der Thymusrinde.⁴ Immunhistologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen das L1-kodierte ORF1-Protein zeigten eine Expression in Keimzellen im Hoden, Leydig-Zellen, plazentaren Synzytiotrophoblast-Zellen und in einigen Tumoren.^{9-11,19} Mit dem von Ergun et al. kürzlich entwickelten Antikörper gegen des ORF2-Protein konnte dessen Expression im Hoden in Keimzellen, Sertoli- und Leydig-Zellen sowie in plazentaren Synzytiotrophoblast-Zellen und in vaskulären Endothelzellen gefunden werden.¹⁹

5.1 Nachweis des ORF1-Proteins

Da es bisher keinen kommerziell verfügbaren p40-Antikörper gibt, wurde für den Nachweis des ORF1-Proteins ein polyklonaler Antikörper hergestellt und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Von vier Ansätzen erwies sich eine der aufgereinigten Antikörperchargen als geeignet und hat sich im Western Blot und in immunhistologischen Färbungen zur spezifischen Detektion des Proteins bewährt.

Die p40-Expression ist eine Voraussetzung für das Stattfinden von L1-Retrotranspositionen. Das p40-Protein wirkt als Nukleinsäure-Chaperone und ist für die Retrotransposition der L1-Elemente essenziell.³²

5.1.1 Tumor- und Normalgewebe unterscheiden sich hinsichtlich der Expression des ORF1-Proteins

Die hier durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen mit dem p40-Antikörper an humanen Gewebeproben ergaben eine deutliche Expression in Keimzellen im Hoden, übereinstimmend mit früheren Untersuchungen.¹⁰ Hier kommt es im Rahmen genomischer Rearrangements zu einer L1-Aktivierung. L1-Elemente haben dadurch wesentlichen Anteil an der Evolution des Genoms.²⁵ Somit ist ein p40-Expression im Hodengewebe als physiologisch anzusehen. Auch in Lymphfollikeln findet sich Aktivität von L1-Retrotransposons. Sie ist insbesondere in Keimzentren lokalisiert, wo es zu genomischen Rearrangements bei der Reifung der B-Lymphozyten kommt.⁵ Auch das ist Ausdruck der Beteiligung von mobilen genetischen Elementen an physiologisch vorkommenden genomischen Veränderungen. L1-Aktivität in lymphatischem Gewebe von Mäusen wurde bereits von Benihoud et al. gezeigt.⁴

Bei neoplastischen Läsionen wie PIN (prostatische intraepitheliale Neoplasie) und DCIS (duktales Carcinoma in situ) findet sich ebenfalls eine Expression des ORF1-Proteins. Umgebendes Gewebe zeigt hingegen keine p40-Expression. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus Untersuchungen an anderen Malignomen überein.⁹⁻¹¹ Dieser Nachweis aktiver L1-Elemente lässt sich wie folgt erklären: Bei der Entstehung maligner Neoplasien kann es zu adaptiven Veränderungen kommen, bei denen sich Zellen an „Stress“ anzupassen versuchen. Bei der weiteren Entwicklung eines Tumors spielen wiederum adaptive Prozesse eine Rolle. So muss ein Tumor möglicherweise Abwehrreaktionen des Immunsystems widerstehen oder sich an eine verminderte Sauerstoffversorgung, die durch sein eigenes Wachstum entsteht, anpassen. Adaptive Prozesse können zu einer Aktivierung mobiler genetischer Elemente führen. Das ist für verschiedene Organismen beschrieben.^{24,27,28,34} Die einzigen im humanen Genom selbständig aktiven, mobilen genetischen Elemente sind die L1-Retrotransposons. Eine Aktivierung der L1-Elemente kann das Genom auf vielfältige Art und Weise beeinflussen. Rekombinationen zwischen L1-Elementen können zu Deletionen oder Duplikationen von DNA-Abschnitten führen und auch umfassendere genomische Rearrangements wie große Deletionen und chromosomale Inversionen sind beschrieben.^{25,26,47} Der instabile Karyotyp, der sich regelmäßig in Tumorzellen findet,¹⁸ ließe sich also durch eine Aktivierung der L1-Elemente erklären.

5.1.2 Verschiedene Tumorzelllinien exprimieren das ORF1-Protein

Sieben humane Zelllinien wurden auf eine Expression des ORF1-Proteins p40 untersucht. Dabei handelte es sich um vier Tumorzelllinien (Ovarialkarzinom: OVCAR-3, malignes Melanom: SK-MEL-13, Kolonkarzinom: HT-29 und Mammakarzinom: MCF-7) und drei Zelllinien, die aus nicht entarteten Epithelien etabliert worden waren (Keratinocyten: HaCaT, Mamma: MCF-10A, Ovar: HOSE). Es war anzunehmen, dass auch die hier untersuchten Tumorzelllinien p40-Expression zeigen würden, wohingegen in den drei nicht transformierten Zelllinien keine p40-Expression zu erwarten war. Jedoch zeigte neben den vier Tumorzelllinien auch die Keratinocyten-Zelllinie HaCat eine Expression des ORF1-Proteins. Die nicht transformierten Zelllinien aus Ovarial- und Mammaepithel waren negativ. HaCat-Zellen sind spontan immortalisiert und nicht tumorigen, d.h. sie bilden im Tierversuch bei Injektion in Nacktmäuse keine Tumore.²¹ Sie können jedoch nach Fusenig et al.²¹ wie alle immortalisierten Zellen als Krebszellen in einem frühen Stadium betrachtet werden und weisen zytogenetische Veränderungen auf. Dies wiederum wäre mit einer Aktivität von L1-Retrotransposons vereinbar.

5.2 RT-PCR zum Nachweis von L1-Aktivität

Die RT-PCR ist eine bis dato selten eingesetzte Methode zum Nachweis der L1-mRNA, die theoretisch ein geeigneter Marker für stattfindende Retrotranspositionen wäre. Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht, die Methode eines PCR-basierten L1-Aktivitätsnachweises zu etablieren. Die verwendeten Primer amplifizieren ein 436 bp langes Fragment der nicht translatierten Region am 5'-Ende der L1-Elemente. Da der Großteil der L1-Retrotransposons am 5'-Ende unvollständig (trunkiert) ist, würden auf diese Weise nur die vollständigen und somit potenziell aktiven L1-Elemente erfasst.

Bei der vergleichenden Untersuchung von Tumorzelllinien und nicht transformierten Zelllinien sollten sich analog zum Western Blot auch Unterschiede in der Expression der L1-RNA ergeben. Zunächst wurde mittels RT-PCR in zellulärer Gesamt-RNA gescreent. Hierbei konnten die erwarteten Unterschiede in der Expression jedoch nicht gefunden werden. Das kann auf das vielfache Vorkommen der Retrotransposons im gesamten Genom zurückgeführt werden. Das gleiche Resultat lieferte die RT-PCR aus zytoplasmatischer RNA, mit deren Gewinnung

versucht wurde, Verfälschungen des Ergebnisses durch nukleäre RNA zu vermeiden. Im Zytoplasma sollte sich nur die mRNA aktiver L1-Retrotransposons befinden. L1-Sequenzen, die z.B. in Introns von Genen vorkommen, sollten durch Splicing entfernt worden sein und nicht ins Zytoplasma gelangen. Allerdings reichen in Anbetracht der Sensitivität der PCR und dem vielfachen Vorkommen der L1 bereits kleinste Verunreinigungen mit nukleärer RNA bzw. DNA-Kontaminationen aus, um die Ergebnisse zu beeinträchtigen. Außerdem befindet sich im Zytoplasma ribosomale RNA, die Fragmente von L1-Elementen enthalten kann, da diese im gesamten Genom vorkommen.³⁹ Um dieses Problem zu lösen, wurde versucht, die Bestandteile des Zytoplasmas weiter mittels Ultrazentrifugation aufzutrennen. Dies geschah über einen kontinuierlichen Sucrose-Gradienten. Diese Methode wird sowohl zur Isolierung von Ribosomen² als auch zur Fraktionierung von mRNA¹³ verwendet. In den oberen Fraktion des Gradienten sollte die L1-mRNA, aber keine ribosomale RNA vorhanden sein. Die RT-PCR Ergebnisse aus den verschiedenen Fraktionen des Gradienten zeigten zwar Unterschiede, es war hierbei jedoch keine gute Reproduzierbarkeit gegeben.

5.2.1 Sequenzierung des kleineren PCR-Produktes

Die RT-PCR aus den einzelnen Fraktionen des Sucrose-Gradienten zeigte neben dem erwarteten 436 bp langen Fragment ein zweites, etwa 220 bp langes Produkt. Dieses Fragment wurde sequenziert. Es ist aus einem etwa 80 bp langen Stück unbekanntes Ursprungs sowie einem etwa 120 bp langen Bereich des L1-5'UTR-Bereiches zusammengesetzt. Es handelt sich also offenbar um eine korrekt amplifizierte Sequenz und es lag keine falsche Primerbindung vor. Die Kombination dieser beiden Sequenzen kommt in etlichen Klonen des Menschen und des Schimpansen vor. Hier finden sich über den amplifizierten Bereich hinaus noch etwa 30 weitere Basen des L1-5'UTR. Dieses Muster ist in allen Klonen identisch. Es ist anzunehmen, dass es sich um eine sehr alte, nicht ganz vollständige L1-Transposition handelt, die möglicherweise bereits vor der Trennung zwischen Mensch und Schimpanse aufgetreten ist und daher in beiden Spezies zu finden ist.

5.3 Bestimmung der L1-Aktivität mittels Retrotranspositionsassay

Der Retrotranspositionsassay ist ein System zur Detektion von Retrotranspositionen in kultivierten Zellen. Dazu wird ein Vektor mit einem humanen L1-Element und einem Markergen (EGFP) in Zellen eingebracht. EGFP wird nur exprimiert, wenn Retrotranspositionen des L1-Elementes, welches sich auf dem Vektor befindet, stattgefunden haben. Die Zellen können dann zur Fluoreszenz angeregt und mittels Fluoreszenzmikroskopie oder FACS Retrotranspositionen erfasst werden.^{39,41} Mit dem Fluoreszenzmikroskop kann in erster Linie eine qualitative Aussage gemacht werden. Im FACS hingegen kann der Anteil der fluoreszierenden Zellen wesentlich präziser bestimmt werden. Mit diesem Modell wurde von Ostertag et al.⁴¹ die Aktivität verschiedener humaner L1-Retrotransposons in HeLa-Zellen untersucht. Dabei hatte sich L1_{RP} als besonders aktiv erwiesen. Deshalb wurden die Versuche in dieser Arbeit ebenfalls mit L1_{RP} durchgeführt. Insgesamt wurden bisher aber erst wenige Zelllinien auf L1-Aktivität mit dem Retrotranspositionsassay untersucht und Aktivität bisher nur in Tumorzelllinien gefunden.

5.3.1 MCF-10A-Zellen zeigten keine Aktivität im Retrotranspositionsassay

Alle untersuchten Tumorzelllinien (OVCAR-3, MCF-7, SK-MEL-13, HT-29) zeigten L1-Aktivität im Retrotranspositionsassay. Bei den nicht transformierten Zellen, MCF-10A, HaCaT und HOSE, war keine Aktivität zu erwarten, da sie das ORF1-Protein nicht exprimieren. Tatsächlich zeigte lediglich die Zelllinie MCF-10A keine Aktivität, HaCaT eine sehr geringe. HOSE-Zellen dagegen waren nicht weniger aktiv für Retrotranspositionen als die untersuchten Tumorzelllinien. Da immortale Zellen zytogenetische Veränderungen aufweisen,²¹ ist eine Aktivierung von L1-Elementen auch in nicht transformierten Zelllinien durchaus denkbar.

5.3.2 Zeitliche Unterschiede im Beginn der L1-Aktivität

Hinsichtlich des zeitlichen Auftretens ließen sich Retrotranspositionen frühestens sechs Tage nach der Transfektion (HaCaT) und spätestens nach neun Tagen (HT-29) nachweisen. Von Ostertag et al.⁴¹ ist für HeLa-Zellen das Auftreten erster Retrotranspositionen bereits nach 48 Stunden beschrieben und ein Anhalten der Aktivität über mindestens 16 Tage.⁴¹ Diskutiert wird,

dass das ORF2-Protein, bzw. der gesamte RNP-Komplex (=Assoziation von ORF1- und ORF2-Protein sowie L1-RNA) nur während einer Mitose also bei Verlust der Integrität der Kernmembran, in den Nukleus gelangt, da Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 60 kD nicht durch passive Diffusion in den Zellkern eintreten können. Das ORF2-Protein allein hat bereits ein Molekulargewicht von 150 kD.³⁹ Auch könnte die Integration von L1-Elementen eine aktive DNA-Synthese erfordern und das wäre nur beim Durchlaufen des Zellzyklus möglich.⁴¹ Somit könnte der gefundene Unterschied im Auftreten von Retrotranspositionen auf eine andere Zellteilungsaktivität der hier untersuchten Zelllinien nach deren Transfektion, im Vergleich zu den von Ostertag et al. untersuchten HeLa-Zellen zurückgeführt werden.

5.3.3 Der Retrotranspositionsassay- ein artifizielles System

Methodisch bedingt können keine Aussagen darüber gemacht werden in wieweit sich die mit dem Reporter-Plasmid ermittelte Retrotranspositionsaktivität von den In-Vivo-Bedingungen unterscheidet.^{36,41} Es handelt sich um ein artifizielles System zum Nachweis von L1-Aktivität, da die Transpositionen von einem Vektor aus stattfinden und nicht von genomischen LINE1-Elementen. Außerdem wäre eine Beeinflussung der L1-Aktivität durch die Selektion der transfizierten Zellen mit dem Antibiotikum Puromycin denkbar. Es könnte hierbei zu einer adaptiven L1-Aktivierung in einigen Zelllinien kommen. Hiermit wäre auch erklärbar, dass HOSE-Zellen das ORF1-Protein nicht exprimieren im Retrotranspositionsassay hingegen eine L1-Aktivität zeigen.

Der artifizielle Charakter kam auch bei der Auswertung der FACS-Daten zum Ausdruck. So waren im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen, die als Leerwert mitgeführt wurden, Verschiebungen des Autofluoreszenzberges im Histogramm der Fluoreszenz festzustellen. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Eigenfluoreszenz der Zellen durch Puromycin beeinflusst wird.

5.4 L1-Retrotransposons und Karzinogenese

L1-Elemente sind die einzigen aktiven mobilen genetischen Elemente im humanen Genom und kodieren für die Proteine, die für ihre, aber auch die Ausbreitung nicht autonomer mobiler Elemente erforderlich sind.³⁹ Eine Aktivierung der L1-Elemente hat gravierende Auswirkungen

auf die Stabilität des Genoms einer Zelle und könnte an der Entstehung von Malignomen beteiligt sein.^{26,47}

In dieser Arbeit wurden Methoden etabliert, die eine Untersuchung dieser Hypothese ermöglichen.

Auf einen möglichen Zusammenhang deutet hin, dass in allen untersuchten Tumorzelllinien aktive L1-Retrotransposons nachgewiesen werden konnten. Hingegen konnte in aus nicht entartetem Gewebe etablierten Zelllinien, je nach Nachweismethode keine generelle Aktivität gefunden werden. In der nicht transformierten Zelllinie MCF-10A ließ sich weder eine Expression des ORF1-Proteins noch eine Aktivität im Retrotranspositionsassay nachweisen.

Die Präneoplasien PIN und DCIS zeigen im Unterschied zum umgebenden Normalgewebe in der Immunhistologie mit dem p40-Antikörper eine Expression des ORF1-Proteins.

Zur genauen Klärung der Umstände, die zur Aktivierung von L1-Retrotransposons führen, wären z.B. Induktionsversuche mit Zelllinien, die nativ keine L1-Aktivität aufweisen, geeignet. Ein mögliches Verfahren stellt die in-vitro-Karzinogenese dar. Hierfür wäre MCF-10A eine geeignete Modellzelllinie. Die In-Vitro-Karzinogenese mit humanen Zelllinien ist jedoch kompliziert und langwierig.²¹ Es müssen verschiedene Modelle verglichen und etabliert werden. Entscheidend ist es, den Zeitpunkt zu finden, an dem L1 Elemente bei der malignen Transformation der Zellen aktiv werden. Hierfür stehen jetzt Western Blot und der Retrotranspositionsassay als Methoden zur Verfügung.

Western Blot und Immunhistologie kommen prinzipiell auch als Nachweisverfahren in Tiermodellen wie z.B. der Haut-Karzinogenese bei Mäusen infrage.

6 Zusammenfassung

Transponierbare Elemente sind mobile DNA-Elemente und werden deshalb auch als „Jumping Genes“ bezeichnet. Nahezu die Hälfte des humanen Genoms besteht aus transponierbaren Elementen. Innerhalb der großen Gruppe mobiler genetischer Elemente nehmen die L1-Retrotransposons eine Sonderstellung ein. Zu etwa 17% besteht das humane Genom aus L1-Elementen. Sie sind die einzigen selbstständig mobilen Elemente beim Menschen.

Von verschiedenen Spezies ist bekannt, dass mobile genetische Elemente im Rahmen von Adaptationsvorgängen aktiviert werden können. Dadurch kommt es zu genomischen Rearrangements, mit Hilfe derer sich Zellen an Stressfaktoren anzupassen versuchen. Diese Prozesse könnten auch bei der Karzinogenese von Bedeutung sein. Um diese Hypothese zu untersuchen ist es notwendig, die Aktivität von L1-Elementen nachweisen zu können.

Hierfür wurden verschiedene Methoden etabliert und evaluiert. So kann mittels eines neu entwickelten Antikörpers das von L1-Elementen kodierte Protein p40 (ORF1-Protein), welches für den Ablauf einer Retrotransposition essenziell ist, nachgewiesen werden. Dieser Antikörper funktioniert sowohl im Western Blot als auch in der Immunhistochemie. Im Hodengewebe und in lymphatischem Gewebe wird p40 unter physiologischen Bedingungen exprimiert. Doch auch Präkanzerosen wie duktales Carcinoma in situ der Mamma und prostatiche intraepitheliale Neoplasie zeigen im Gegensatz zum umgebenden Normalgewebe eine p40-Expression.

Vier humane Tumorzelllinien (Ovarialkarzinom: OVCAR-3, malignes Melanom: SK-MEL-13, Kolonkarzinom: HT-29 und Mammakarzinom: MCF-7) wurden auf Expression von p40 mittels Western Blot untersucht. Alle untersuchten Tumorzelllinien exprimieren das ORF1-Proteinprodukt. Auch in der aus normalen Keratinozyten etablierten Zelllinie HaCaT ließ sich p40 nachweisen. Die nicht transformierten Zelllinien MCF-10A (Mamma-Epithel) und HOSE (Oberflächenepithel des Ovars) hingegen waren p40-negativ.

Ein PCR-basierter Nachweis der mRNA vollständiger L1-Elemente (nur diese L1-Elemente sind potenziell aktiv), stellt sich aufgrund des vielfachen Vorkommens von L1-Sequenzen und der hohen Sensitivität der PCR als kompliziert dar und erlaubt keine sicheren Schlüsse über eine L1-Aktivität.

Zum Nachweis der In-Vitro-Aktivität wurde ein Retrotranspositionsassay für die sieben

Zelllinien etabliert. Hiermit können vollständige Retrotranspositionen, die von einem in Zellen eingebrachten Vektor mit einem L1-Element ausgehen, erfasst werden. Die vier Tumorzelllinien sowie die Zelllinien HaCaT und HOSE zeigten L1-Aktivität. Die Zelllinie MCF-10A wies dagegen keine L1-Aktivität auf.

Es wurde gezeigt, dass L1-Elemente in Tumorzelllinien aktiv sind. In der nicht transformierten Zelllinie MCF-10A ließ sich weder eine Expression des ORF1-Proteins noch eine Aktivität im Retrotranspositionsassay nachweisen. Lediglich bei der Zelllinie HOSE ergaben sich keine übereinstimmenden Ergebnisse von Western Blot und Retrotranspositionsassay. Da immortale Zellen zytogenetische Veränderungen aufweisen, ist eine Aktivierung von L1-Elementen auch in nicht transformierten Zelllinien durchaus denkbar. Zudem ist möglich, dass es in HOSE-Zellen zu einer adaptiven L1-Aktivierung als Reaktion auf die in dem Assay herrschenden Bedingungen kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden zum Nachweis der Aktivität von L1-Retrotransposons etabliert. Mit Hilfe dieser Methoden kann die hypothetische Rolle von L1-Retrotransposons in der Karzinogenese untersucht werden. MCF-10A stellt hierfür eine geeignete Modellzelllinie dar.

7 Literaturverzeichnis

1. Amaxa-Press-Release. 2005. Webpage www.amaxa.com
Internet Communication
2. Alberts,B. et al. Molekularbiologie der Zelle. Wiley-VCH, Weinheim, (2004).
3. Alves,G. et al. DNA release by line-1 (L1) retrotransposon. Could it be possible? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 906, (2000) 129-133.
4. Benihoud,K. et al. Unusual expression of LINE-1 transposable element in the MRL autoimmune lymphoproliferative syndrome-prone strain. *Oncogene* 21, (2002) 5593-5600.
5. Böcker,W., Denk,H. & Heitz,P. Pathologie. Urban&Fischer, (2001).
6. Boland,C.R. & Ricciardiello,L. How many mutations does it take to make a tumor? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, (1999) 14675-14677.
7. Boukamp,P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, (1988) 761-771.
8. Branciforte,D. & Martin,S.L. Developmental and cell type specificity of LINE-1 expression in mouse testis: implications for transposition. *Mol. Cell Biol.* 14, (1994) 2584-2592.
9. Bratthauer,G.L., Cardiff,R.D. & Fanning,T.G. Expression of LINE-1 retrotransposons in human breast cancer. *Cancer* 73, (1994) 2333-2336.
10. Bratthauer,G.L. & Fanning,T.G. Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer. *Oncogene* 7, (1992) 507-510.
11. Bratthauer,G.L. & Fanning,T.G. LINE-1 retrotransposon expression in pediatric germ cell tumors. *Cancer* 71, (1993) 2383-2386.
12. Brouha,B. et al. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, (2003) 5280-5285.
13. Buell,G.N., Wickens,M.P., Payvar,F. & Schimke,R.T. Synthesis of full length cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs. *J. Biol. Chem.* 253, (1978) 2471-2482.
14. Bushman,F.D. Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. *Cell* 115, (2003) 135-138.
15. Cullen,B.R. Nuclear RNA export pathways. *Mol. Cell Biol.* 20, (2000) 4181-4187.

16. Deininger,P.L. & Batzer,M.A. Mammalian retroelements. *Genome Res.* 12, (2002) 1455-1465.
17. Dombroski,B.A., Mathias,S.L., Nanthakumar,E., Scott,A.F. & Kazazian,H.H., Jr. Isolation of an active human transposable element. *Science* 254, (1991) 1805-1808.
18. Duesberg,P. & Rasnick,D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil. Cytoskeleton* 47, (2000) 81-107.
19. Ergun,S. et al. Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues. *J. Biol. Chem.* 279, (2004) 27753-27763.
20. Florl,A.R., Lower,R., Schmitz-Drager,B.J. & Schulz,W.A. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br. J. Cancer* 80, (1999) 1312-1321.
21. Fusenig,N.E. & Boukamp,P. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol. Carcinog.* 23, (1998) 144-158.
22. Han,J.S. & Boeke,J.D. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? *Bioessays* 27, (2005) 775-784.
23. Hauptmann,S. & Schmitt,W.D. Transposable elements - Is there a link between evolution and cancer? *Med. Hypotheses* (2005).
24. Hirochika,H., Sugimoto,K., Otsuki,Y., Tsugawa,H. & Kanda,M. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, (1996) 7783-7788.
25. Kazazian,H.H., Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, (2004) 1626-1632.
26. Kazazian,H.H., Jr. & Goodier,J.L. LINE drive. retrotransposition and genome instability. *Cell* 110, (2002) 277-280.
27. Ke,N., Irwin,P.A. & Voytas,D.F. The pheromone response pathway activates transcription of Ty5 retrotransposons located within silent chromatin of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 16, (1997) 6272-6280.
28. Kumar,A. & Bennetzen,J.L. Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 33, (1999) 479-532.
29. Lander,E.S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, (2001) 860-921.

30. Livingston,P.O. et al. Serological responses of melanoma patients to vaccines derived from allogeneic cultured melanoma cells. *Int. J. Cancer* 31, (1983) 567-575.
31. Loeb,K.R. & Loeb,L.A. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21, (2000) 379-385.
32. Martin,S.L. et al. LINE-1 Retrotransposition Requires the Nucleic Acid Chaperone Activity of the ORF1 Protein. *J. Mol. Biol.* 348, (2005).
33. Marusic,M. Evolutionary and biological foundations of malignant tumors. *Med. Hypotheses* 34, (1991) 282-287.
34. Menees,T.M. & Sandmeyer,S.B. Cellular stress inhibits transposition of the yeast retrovirus-like element Ty3 by a ubiquitin-dependent block of virus-like particle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, (1996) 5629-5634.
35. Mizrokhi,L.J., Georgieva,S.G. & Ilyin,Y.V. jockey, a mobile Drosophila element similar to mammalian LINES, is transcribed from the internal promoter by RNA polymerase II. *Cell* 54, (1988) 685-691.
36. Moran,J.V. Human L1 retrotransposition: insights and peculiarities learned from a cultured cell retrotransposition assay. *Genetica* 107, (1999) 39-51.
37. Nigumann,P., Redik,K., Matlik,K. & Speek,M. Many human genes are transcribed from the antisense promoter of L1 retrotransposon. *Genomics* 79, (2002) 628-634.
38. Ostertag,E.M. et al. A mouse model of human L1 retrotransposition. *Nat. Genet.* 32, (2002) 655-660.
39. Ostertag,E.M. & Kazazian,H.H., Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 35, (2001) 501-538.
40. Ostertag,E.M. & Kazazian,H.H., Jr. Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res.* 11, (2001) 2059-2065.
41. Ostertag,E.M., Prak,E.T., DeBerardinis,R.J., Moran,J.V. & Kazazian,H.H., Jr. Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic Acids Res.* 28, (2000) 1418-1423.
42. Paquette,B. & Little,J.B. Genomic rearrangements in mouse C3H/10T1/2 cells transformed by X-rays, UV-C, and 3-methylcholanthrene, detected by a DNA fingerprint assay. *Cancer Res.* 52, (1992) 5788-5793.
43. Sassaman,D.M. et al. Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat. Genet.* 16, (1997) 37-43.

44. Shapiro,J.A. Genome system architecture and natural genetic engineering in evolution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 870, (1999) 23-35.
45. Shapiro,J.A. Genome organization and reorganization in evolution: formatting for computation and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 981, (2002) 111-134.
46. Soifer,H.S., Zaragoza,A., Peyvan,M., Behlke,M.A. & Rossi,J.J. A potential role for RNA interference in controlling the activity of the human LINE-1 retrotransposon. *Nucleic Acids Res.* 33, (2005) 846-856.
47. Symer,D.E. et al. Human 11 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell* 110, (2002) 327-338.
48. Takai,D., Yagi,Y., Habib,N., Sugimura,T. & Ushijima,T. Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 30, (2000) 306-309.
49. Temin,H.M. Evolution of cancer genes as a mutation-driven process. *Cancer Res.* 48, (1988) 1697-1701.
50. Tsao,S.W. et al. Characterization of human ovarian surface epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFs). *Exp. Cell Res.* 218, (1995) 499-507.
51. Yang,N., Zhang,L., Zhang,Y. & Kazazian,H.H., Jr. An important role for RUNX3 in human L1 transcription and retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* 31, (2003) 4929-4940.

8 Thesen

1. Das humane Genom besteht zu etwa 17% aus L1-Retrotransposons. Innerhalb der großen Gruppe mobiler genetischer Elemente (unser Genom besteht etwa zur Hälfte aus transponierbaren Elementen), nehmen sie eine Sonderstellung ein, da sie im humanen Genom die einzigen selbstständig mobilen Elemente sind.
2. Mobilität (=Aktivität) von L1-Elementen kann gravierende Auswirkungen auf die Stabilität des Genoms einer Zelle haben. Deshalb muss es stringente Regulationsmechanismen geben, über deren Natur aber bisher wenig bekannt ist.
3. Bei der Entstehung maligner Tumoren kann es zu einer Aktivierung von L1-Elementen kommen. Um diese Hypothese zu untersuchen, ist es notwendig, die Aktivität von L1-Elementen nachweisen zu können.
4. Ziel dieser Arbeit war es, Nachweismethoden für aktive L1-Elemente zu entwickeln und zu evaluieren. Da man über die Regulation der L1-Aktivität bisher wenig weiß, ist es sinnvoll, diese Aktivität auf verschiedenen Ebenen (RNA, Proteine, Insertion) nachzuweisen.
5. Im Rahmen einer Aktivierung von L1-Elementen wird das ORF1-Protein (p40) exprimiert. Mit einem neu hergestellten polyklonalen Antikörper kann p40 im Western Blot und immunhistologisch nachgewiesen werden.
6. Ein Zellkultur-basierter Retrotranspositionsassay ermöglicht den Nachweis vollständiger Retrotranspositionen mit Hilfe eines L1-Elementes, das in Zellen eingebracht wird und nach erfolgter Insertion ein Markerprotein (EGFP) exprimiert. Die Auswertung erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse.
7. In Keimzellen des Hodens und in Keimzentren von Lymphknoten wird das ORF1-Protein exprimiert. Präkanzerosen der Prostata (PIN) und Mamma (DCIS) zeigen eine p40-Expression, das umgebende Normalgewebe hingegen nicht.
8. Im Western Blot sind zwei der drei nicht transformierten Zelllinien negativ für p40 (ORF1-Protein). Die vier untersuchten Tumorzelllinien exprimieren das ORF1-Protein.

-
9. Alle vier Tumorzelllinien zeigen L1-Aktivität im Retrotranspositionsassay, aber auch zwei der nicht transformierten Zelllinien weisen eine Aktivität auf.
 10. PCR-basierte Nachweise führen aufgrund des vielfachen Vorkommens der L1-Elemente im Genom und der hohen Sensitivität der PCR zu keinen sicheren Aussagen über eine L1-Aktivität.
 11. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden zur Detektion der Aktivität von L1-Retrotransposons etabliert. Es zeigte sich, dass sowohl in Tumorgewebe als auch in Tumorzellen L1 aktiv sind, jedoch in normalen nicht transformierten Zellen weitestgehend ruhen. Somit könnte in der Tat die Aktivität von L1-Elementen eine Rolle in der Karzinogenese spielen.
 12. Zur weiteren Klärung der Hypothese, dass von L1-Elemente an der Entstehung von Malignomen beteiligt sind, bietet sich die Modelllinie MCF-10A an, welche keinerlei spontane L1-Aktivität aufweist und somit für Induktionsversuche geeignet ist.

9 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Alle benutzten Hilfsmittel, die Literatur sowie die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sind vollständig angegeben.

Halle, den 10.04.2006

Stephan Ruhla

10 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Halle, den 10.04.2006

Stephan Ruhla

11 Tabellarischer Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 25.06.1976
Geburtsort: Lauchhammer
Familienstand: ledig

SCHULAUUSBILDUNG

08/1992 bis 06/1996 Gymnasium Senftenberg, Abschluss Abitur

ZIVILDIENTST

09/1996 bis 09/1997 DGB-Jugendbildungsstätte Flecken Zechlin

STUDIUM

10/1997 bis 09/1998 Studium der Agrarwissenschaften, Humboldt-Universität zu Berlin
10/1998 bis 02/1999 Praktikum im Ökologischen Landwirtschaftsbetrieb H. Przybilski in Bergholz (MV)
04/1999 bis 05/2005 Studium der Humanmedizin
04/1999 bis 11/2004 an der Charité in Berlin
11/2004 bis 05/2005 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

DISSERTATION

seit 09/2001 „Methoden zum Nachweis aktiver L1-Retrotransposons“ bei Prof. Dr. Steffen Hauptmann

BERUF

seit 10/2005 Assistenzarzt am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle, den 10.04.2006

Stephan Ruhla

12 Publikationen

12.1 Zeitschriftenbeiträge

METHODS TO DETECT RETROTRANSPOSITION AT DIFFERENT LEVELS

Wolfgang D. Schmitt, Stephan Ruhla, Anna Wolisz, Lena Flierl, Martin Köbel, and Steffen Hauptmann

Institute of Pathology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06097 Halle, Germany

Manuscript in preparation

12.2 Kongressbeiträge

ACTIVITY OF LINE1-RETROTRANSPOSONS IS ENHANCED IN TUMOR CELL LINES AND INFLUENCED BY CELL CULTURE CONDITIONS

(Poster)

Wolfgang D. Schmitt*, Stephan Ruhla*, Anna Wolisz, Lena Flierl, Martin Köbel, and Steffen Hauptmann

*These authors contributed equally to this work.

Institute of Pathology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Germany

DETECTION OF LINE1-ACTIVITY IN A WIDE RANGE OF CELL TYPES

(Poster)

W.D. Schmitt, S. Ruhla, A. Wolisz, M. Köbel, J.L. Goodier, E.M. Ostertag, H.H. Kazazian, and S. Hauptmann

Institute of Pathology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Germany

Department of Genetics, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA

96th Annual Meeting, American Association for Cancer Research, April 2005, Anaheim, USA

TRANSPOSABLE ELEMENTS: A POSSIBLE LINK BETWEEN TOBACCO-PRODUCT-INDUCED TOXINS AND CARCINOGENESIS ?

(Vortrag und Poster)

W.D. Schmitt, S. Ruhla, A. Wolisz, L. Flierl, and S. Hauptmann

Institute of Pathology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Germany

2005 US Research Forum on Tobacco Science and Health, February 2005, St.Louis, USA

DETECTION OF RETROTRANSPOSITION IN CANCER

(Vortrag und Poster)

W.D. Schmitt, S. Ruhla, and S. Hauptmann

Institute of Pathology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Germany

Annual Fall Meeting of GBM, September 2004, Münster, Germany

13 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Steffen Hauptmann. Er vertraute mir dieses überaus spannende Thema an und ließ mir die beste Betreuung zuteil werden. Sein unermüdliches Engagement und sein Interesse an meiner Arbeit waren mir besonders an erfolglosen Tagen Trost und Ansporn zugleich.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Wolfgang D. Schmitt, der diese Arbeit in großen Teilen betreut hat. Ich habe sehr von den Diskussionen mit Ihm und seiner kollegialen Art profitiert.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Christa Scholz, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Höhne und allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Proteinstrukturforschung am Institut für Biochemie der Charité für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Und ich möchte mich bei Dr. Martin Köbel, Maika Gulich, Ines Koch, Elisabeth Glanz, Dr. Antje Siegert, sowie allen Mitdoktoranden in Berlin und Halle für ihre Hilfe herzlich bedanken.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für ihre beständige Unterstützung in den Jahren des Studiums und während der Doktorarbeit.

Last but not least möchte ich mich bei Annette Mehner, Christine Klühs und Christoph Mielzarek fürs Korrekturlesen bedanken.