Fremde DNA im menschlichen Genom: Konsequenzen für das Wirts- und das Fremdgenom

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Stefanie Weber
aus Leinefelde
Erlangen im Mai 2013

Vorsitzender der Promotionskommission:	Prof. Dr. Siegfried Roth
Erstberichterstatter:	Prof. Dr. Walter Doerfler
Zweitberichterstatter:	Prof. Dr. Jens Brüning
Tag der mündlichen Prüfung:	01. Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 1

Abbildungsverzeichnis 3

Tabellenverzeichnis 4

Abkürzungsverzeichnis 5

I. Einleitung 9

1.1 Epigenetik 9

1.2 DNA- Methylierung 9

1.3 Chromatin- Organisation und Histon- Modifikationen 11

1.4 RNA- Interferenz 12

1.5 Langfristige Genabschaltung 13

1.6 Integration fremder DNA in das Wirtsgenom 13

1.7 Retroelemente 14

1.8 Retroviren 15

1.9 Endogene Retroviren 15

1.10 HIV- 1 17

II. Zielsetzung der Arbeit 25

III. Material 27

3.1 Lösungen, Puffer und Medien 27

3.2 Plasmide 31

3.3 Bakterienstämme 31

3.4 Zelllinien und DNA- Proben 32

3.5 Primer 33

3.6 DNA- Größenmarker 36

3.7 Enzyme 36

3.8 Chemikalien 36

3.9 Laborgeräte 37

3.10 Labormaterialien 39

3.11 Kits und Reaktionssysteme 39

3.12 Programme 40

IV. Methoden 41
4.1 Etablierung stabil transfizierter Zelllinien 41
4.2 RNA- Isolierung aus Einzelzellklonen 43
4.3 Bestimmung von Methylierungsmustern 43
4.4 Quantifizierung der Gesamt- Methylierung 49
4.5 Quantifizierung von 5- Hydroxymethylcytosin 49
V. Ergebnisse 51
5.1 Veränderungen im Methylierungsmuster nach Integration von fremder DNA in Retroelementen im menschlichen Genom 51
5.2 Methylierungsanalysen in proviralen HIV- 1 Genomen von infizierten Patienten in unterschiedlichen Krankheitsstadien 67
VI. Diskussion 81
6.1 Veränderungen im DNA- Methylierungsmuster nach Integration von Fremd- DNA in Retroelementen im menschlichen Genom 81
6.2 Epigenetische Analyse von proviralen HIV- 1 Genomen in Patienten in unterschiedlichen Krankheitsstadien 82
VII. Zusammenfassung 89
VIII. Abstract 91
IX. Literaturverzeichnis 93
X. Anhang 103
10.1 Plasmidkarten 103
10.2 Erklärung 104
10.3 Veröffentlichungen 105
10.4 Lebenslauf 106
10.5 Danksagung 107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DNA- Methylierung, Hydroxylierung und Demethylierung (25) 10
Abbildung 2: Die einzelnen Schritte der Bisulfit- Konversion (42) 11
Abbildung 3: Interaktion von DNA- Methylierung und Chromatin- Modifikationen für die langfristige Genabschaltung (47) 13
Abbildung 4: Schematischer Aufbau von HIV- 1 17
Abbildung 5: Organisation des viralen Genoms 17
Abbildung 6: Schematische Darstellung des HIV- 1 Replikationszyklus (112) 21
Abbildung 7: Aufbau des HIV- 1 Provirus 22
Abbildung 8: Vektorkarte des Plasmids pEGFP- FMR1 mit *BamHI*- Schnittstelle 51
Abbildung 9: PCR mit genomischer DNA isoliert aus Einzelzellklonen mit und ohne integriertes Plasmid 52
Abbildung 10: Nomenklatur Methylierungsmuster 53
Abbildung 11: HERV- K: Methylierungsmuster von nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen 54
Abbildung 12: HERV- K: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen 55
Abbildung 13: HERV- K: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen mit *in vitro* methylierten Plasmid 56
Abbildung 14: HERV- W: Methylierungsmuster von nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen 57
Abbildung 15: HERV- W: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen 58
Abbildung 16: HERV- W: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen mit *in vitro* methylierten Plasmid 60
Abbildung 17: LINE 1: Methylierungsmuster von nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen 61
Abbildung 18: LINE 1: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen 62
Abbildung 19: LINE 1: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen mit *in vitro* methyliertem Plasmid 63
Abbildung 20: Zusammenfassung der globalen DNA- Methylierung aus vier unabhängigen Experimenten. 64
Abbildung 21: Karte des HIV- 1 proviralen Genoms mit den beiden analysierten Bereichen 67
Abbildung 22: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in AIDS- Patienten 69
Abbildung 23: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in chronisch infizierten Patienten I 70
Abbildung 24: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in chronisch infizierten Patienten II 71
Abbildung 25: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in LTNP I 72
Abbildung 26: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in LTNP II 73
Abbildung 27: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in Elite- Controller I 74
Abbildung 28: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in Elite- Controller II 75
Abbildung 29: Plasmidkarte pJET1.2/ blunt von Fermentas 103
Abbildung 30: Plasmidkarte pcDNA3.1(+) 103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	DNA- Proben von HIV- 1 positiven und an AIDS erkrankten Patienten.	33
Tabelle 2:	Primer zum Nachweis der Integration von pEGFP- FMR1 und HIV- 1 im Wirtsgenom.	33
Tabelle 3:	Primer zum Nachweis von HIV- 1 zirkulierenden Formen	34
Tabelle 4:	Sequenzier- Primer	34
Tabelle 5:	Primer für Bisulfit- behandelte DNA.	35
Tabelle 6:	Reaktionsansatz und Programm für die Bisulfit- Konversion	43
Tabelle 7:	Temperaturverteilung der Gradienten 40 ± 10°C, 50 ± 10°C und 60 ± 10°C Analytische PCR	44
Tabelle 8:	Reaktionsansatz und Programm zum amplifizieren Bisulfit- konvertierter DNA	44
Tabelle 9:	Reaktionsansatz und Programm zum Amplifizieren von normaler DNA	45
Tabelle 10:	„sticky- end“ und „blunt- end“ Protokoll der Ligationsreaktion	47
Tabelle 11:	Reaktionsansatz für die analytische Restriktionsspaltung mit *BglII*	48
Tabelle 12:	Reaktionsansatz und PCR- Programm der Sequenzierung	48
Tabelle 13:	Überexprimierte Genomabschnitte beim Vergleich der Expressionsprofile von nicht-transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen und den stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen	65
Tabelle 14:	Reprimierte Genomabschnitte beim Vergleich der Expressionsprofile von normalen HCT-116 Einzelzellklonen und den stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen	66
Tabelle 15:	Auszug aus den Ergebnissen der Expressionsprofile der fünf HCT- 116 Einzelzellklonen (EZ1-5a/b) ohne integrierte Fremd- DNA	67
Tabelle 16:	Nachweis von 2- LTR circles in Patienten- DNAs aus WIHS (Women´s Interagency HIV-1 Study) und der Maple Leaf Clinic Cohort	68
Tabelle 17:	Wiederkehrende mutierte CpG- Folgen in den unterschiedlichen Patienten- DNAs	77
Tabelle 18:	Zusammenfassung von CpG- Mutationen in Sequenzen von 8 zufällig ausgewählten proviralen DNAs aus der Los Alamos HIV- 1 Datenbank	79

Abkürzungsverzeichnis

5- hmC	5- Hydroxymethylcytosin
5- mC	5- Methylcytosin
AA	Afroamerikaner
A	Adenin
Ad 12	Adenovirus Typ 12
AIDS	engl.: Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATCC	engl.: American Type culture Collection
Ap2	Adapterprotein 2
APA4	engl. activating enhancer- binding protein 4
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBF-1	engl. latency- C- promoter binding factor 1
CpG	Dinukleosidphosphat mit einem Cytosin- und Guanin-Rest
CTIP2	engl. COUP- TF- interacting protein 2
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphate
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphate
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphospate
DNA	Desoxyribonukleinsaure (engl.: desoxyribonucleid acid)
DNMT	DNA- Methyltransferasen
ds	doppelsträngig
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphospate
ddNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
ds	doppelstrangig (engl.: double-stranded)
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphate
E. coli	lat.: *Escherichia coli*
EC	elite controller
ELISA	engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	Englisch
env	engl.: envelope
FACS	engl. Fluorescence- Activated Cell Sorting
FMR1	engl.: *fragile X mental retardation 1* gene
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
gag	engl.: group- antigen
GFP	grün fluoreszierende Protein
gp	Glykoprotein
H	Histone
H	Hispanic
h	Stunde(n)
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HCT	engl.: human colon tumor
HDAC	Histon-Deacetylase
HTDV	engl.: human teratocarcinoma derived virus
HERV	engl.: human endogenous retroviruses
HMT	Histon-Methyl-Transferase
H_2O	Wasser
HIV	engl.: human immunodeficiency virus
HTLV	humanes T- Zell Leukämievirus
HLA	engl.: Human Leukocyte Antigen
HP1	Heterochromatin Protein 1
IAP	engl.: intracisternal A particle
IL	Interleukin

IDH2	Isocitratdehydrogenase 2
J- Lat	Jurkat- Latenz
JSRV	engl.: jaagsiekte sheep retrovirus
K	Kaukasier
k.B.	keine Behandlung
Konz.	Konzentration
l	Liter
lat.	Lateinisch
LINEs	engl.: long interspersed elements
L1	LINE 1
LTR	engl.: long terminal repeat
LTNP	engl.: long term nonprogressors
M	Mega-
M	Molar
m	Milli-
m	Meter
µ	Mikro-
MBD	Methyl-CpG-Bindungsdomane
miRNA	engl.: micro RNA
min	Minute(n)
MMTV	murines Leukämievirus
mol	Molekul
mRNA	Boten-RNA; engl.: messenger RNA
n	Nano-
n	nested
n.b.	nicht bestimmt
ncRNA	nicht-kodierende RNA; engl.: non-coding RNA
nef	engl.: negative factor
NRTI	nukleosidischer Reverse- Transkriptase- Inhibitoren
NNRTI	nicht- nukleosidischen Reverse- Transkriptase- Hemmer
NFAT	engl. nuclear factor of activated T cells
NFκB	Nuklearfaktor κB
NP $CD4^+$ T- Zellen	engl.: non- polarized central memory T- cells
NTR	nicht-translatierte Region
NuRD	engl. nucleosome remodeling and histone deacetylation
OD	optische Dichte
ORF	engl.: open reading frame
p	Piko-
PIC	prä- Integrationskomplex
PBMC	engl.: peripheral blood mononuclear cell
PBS	Primerbindestelle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PcG	engl. polycomp group corepressor
pH	pH-Wert
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
pol	engl.: polymerase
P- TEFb	engl. positive transcription elongation factor b
R	engl.: redundant
r	rückwärts
RISC	engl.: RNA-induced silencing complex
rev	engl.: regulator of expression of virion proteins
RNA	engl.: ribonucleic acid
RNAi	engl.: RNA interference
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomal-RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
SAM	S-adenosyl-methionin
siRNA	engl.: short interfering RNA
SINEs	engl.: short interspersed elements
ss	engl.: single-stranded

T	Thymin TAR engl. trans- activation response
T	Thymin
TAR	engl. trans- activation response
TRP1	TAR- RNA- Bindeprotein 1
tat	engl.: transactivator of transcription
TBP	TATA- Box- Bindeprotein
TET	engl.: ten-eleven translocation protein
TNF- α	Tumornekrosefaktor-α
tRNA	Transfer-RNA
TLR9	engl.: Toll- like receptor 9
U	engl.: unit(s)
U3	engl.: unique
UV	ultraviolett
v	vorwärts
VSV- G	Vesicular Stomatitis Virus- Glykoprotein
vpr	engl.: viral protein rapid
vpu	engl.: viral protein out)
vif	engl.: viral infectivity factor
YY1/LSF	engl. YinYang 1/ late SV40 factor

I. Einleitung

1.1 Epigenetik

Der Begriff Epigenetik wurde 1942 erstmalig von Conrad Waddington eingeführt und definierte die Wechselwirkung zwischen Genen und ihren Genprodukten (1).
Heute beschreibt der Begriff Epigenetik vererbbare Veränderungen im Phänotyp, die unabhängig von der DNA- Sequenz von einer Generation zur Nächsten weiter gegeben werden (2;3). Die Mechanismen der Epigenetik umfassen Modifikationen der DNA und Histone sowie nicht-kodierende RNAs.

1.2 DNA- Methylierung

Die „fünfte Base“ 5- Methylcytosin (5- mC) wurde im Jahre 1925 von Johnson und Coghill in der DNA von Tuberkulose- Bakterien entdeckt (4) und 1948 in der Kalbsthymus- DNA durch Hotchkiss (5) nachgewiesen.
In Bakterien besitzt die DNA- Methylierung eine Schutzfunktion. Wird bei einer Infektion mit Bakteriophagen fremde DNA in die Wirtszelle eingeschleust, so wird diese von den Restriktionsendonukleasen des Bakteriums abgebaut. Die bakterielle DNA ist hingegen durch DNA- Methylierung vor dem Abbau geschützt.
In Wirbeltieren erfolgt die DNA- Methylierung ausschließlich an der C5- Position des Cytosins innerhalb der Dinukleotid- Sequenz 5´- CpG - 3´ durch DNA- Methyltransferasen (DNMT). Das Dinukleotid CpG kommt im menschlichen Genom nur zu einem Fünftel der geschätzten Häufigkeit von 4% vor. Der Grund dafür ist, dass die meisten CpG- Folgen (70%) methyliert sind und durch spontane Deaminierung von 5- Methylcytosin Thymin entsteht (6). Die Verteilung der CpG- Folgen im menschlichen Genom ist nicht willkürlich und gleichmäßig (6). Tatsächlich liegen die meisten CpG- Folgen in Regionen stromaufwärts gelegen von Genen (CpG- Inseln). Vor aktiv transkribierenden Genen oder vor Genen, die zur Expression bereit sind, sind die CpG- Folgen nicht methyliert (7), da eine Methylierung von Cytosinen eine Blockade der genetischen Aktivität zur Folge hat. Die wichtigste Funktion der DNA- Methylierung ist somit die langfristige Regulierung der Genexpression (8). Allerdings sind DNA- Methylierung und Genexpression oftmals umgekehrt korreliert (8-12).
Der erste Schritt der Übertragung der Methylgruppe ist der nukleophile Angriff eines konservierten Cysteins der DNMT und die damit verbundene kovalente Bindung an das sechste Kohlenstoff C6 des Cytosin- Ringes. Danach kann die Methylgruppe von S-adenosylmethionin (SAM) auf das nun aktivierte fünfte Kohlenstoffatom C5 des Cytosin- Ringes übertragen werden.
DNMT werden in drei Arten unterteilt, die sowohl strukturell als auch funktionell unterschiedlich sind. Die Instandhaltungsmethylase (engl.: maintenance methylase) DNMT1 hält während der semikonservativen DNA- Replikation (13) und der DNA- Reparatur (14) das Methylierungsmuster aufrecht, da sie bevorzugt hemimethylierte DNA bindet (15). Die DNMT 3A und 3B fungieren hauptsächlich als Initiationsmethylasen (engl.: *de novo* methylase) und etablieren neue

Methylierungsmuster vorwiegend in der Gametogenese und Embryogenese (16). Der regulatorische Faktor DNMT3L (engl.: Dnmt3- like protein) spielt eine essentielle Rolle als Cofaktor für *de novo* Methylierungen der Methyltransferasen 3A und 3B (17-22). Die Einteilung der DNMT ist stark vereinfacht, da die Methylasen übergreifende Funktionen haben (23).
Die DNMT2 methyliert Cytosin 38 in der Asparagin- beladenen Transfer- RNA am Cytosin 38 (24)
Bisher ist in Säugern kein eindeutiges Enzym für eine aktive Demethylierung bekannt (Abbildung 1).

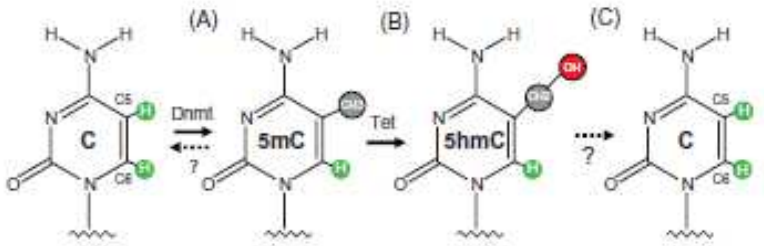

Abbildung 1: DNA- Methylierung, Hydroxylierung und Demethylierung (25)

(A) Das Fragezeichen markiert die Möglichkeit einer Demethylase, die bisher nicht gefunden wurde.
(B) Konversion von 5- mC zu 5- hmC durch den MLL- Fusionspartner TET1 (26).
(C) Bis jetzt ist es ungeklärt, ob 5- hmC ein Zwischen- oder das Endprodukt von aktiver Demethylierung ist. Das Fragezeichen deutet eine mögliche Methylase- geleitete Entfernung der Hydroxymethylgruppe des C5.

5- Hydroxymethylcytosin (5- hmC) ist seit langem aus Bakteriophagen- DNA bekannt (27-30), wo es häufig durch Glykosylierung modifiziert wird, um die eigene Bakteriophagen- DNA vor dem Abbau durch Restriktionsendonukleasen der infizierten Bakterienzelle zu schützen. Im Jahre 2009 konnten Kriaucionis und Heintz (31) 5- hmC in Säuger- DNA nachweisen. Ein hohes Niveau von 5- hmC ist in neuronalen Purkinjezellen der Kleinhirnrinde (31), in selbst- erneuernden und pluripotenten Stammzellen zu finden (26;32). Ein reduziertes Niveau von 5- hmC ist dagegen in den meisten Tumorzelllinien vorhanden (33-35). Die Umwandlung von 5- mC zu 5- hmC erfolgt durch die Oxidation von 5-mC durch TET (engl.: ten- eleven translocation) Proteinen (36), TET1, 2 und 3. Eine Inaktivierung von TET2 durch Mutation führt zu einer verminderten Menge an 5- hmC in verschiedenen Myeloischen Leukämien (37;38). Eine Studie aus dem Jahr 2012 zeigt, dass in Melanomen der Verlust von 5- hmC ein epigenetischer Biomarker sein kann. In diesen Krebszellen sind die Isocitratdehydrogenase 2 (IDH2) und die TET- Enzyme herunter reguliert. Im Tiermodell zeigt eine Überexpression von IDH2 und TET2 ein supprimierendes Tumorwachstum (39). Die Entdeckung von 5- hmC bringt eine zusätzliche Ebene in die Komplexität der epigenetischen Regulation der DNA- Methylierung ein.

Ein Nachweis von 5- mC in der DNA ist durch die Verwendung der beiden isoschizomeren Restriktionsenzyme *HpaII* und *MspI* möglich. *HpaII* und *MspI* besitzen die gleiche Erkennungssequenz 5´- CCGG- 3´, allerdings wird *HpaII* durch 5- mC im 3'-gelegenen C Atom der Erkennungssequenz gehemmt und kann die DNA an der Stelle nicht schneiden. *MspI* kann unabhängig von 5- mC die DNA schneiden (40). Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass nur CpG- Folgen in einer Erkennungssequenz von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen untersucht werden können. Etwa 10- 15% aller CpG- Folgen liegen in so einer Sequenz.

Die heute standardmäßig angewandte Methode zur Untersuchung von 5- mC ist die Bisulfit- Konversion genomischer DNA (41). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass zunächst alle nicht- methylierten Cytosine in Uracil (Abbildung 2) und nach der anschließenden PCR in Thymin umgewandelt werden. Die Amplifikationsprodukte werden dann kloniert und fünf bis zehn einzelne Klone sequenziert. Bei der Auswertung der Sequenzierung sind alle Cytosine außerhalb von CpG- Folgen sowie nicht- methylierte Cytosine in CpG- Folgen in Thymine umgewandelt. Alle methylierten Cytosine bleiben dagegen unreaktiv und sind auch als Cytosine in der Sequenz erkennbar. Der Vorteil dieser Methode ist es, dass man alle CpG- Folgen auf ihren Methylierungsstatus untersuchen kann.

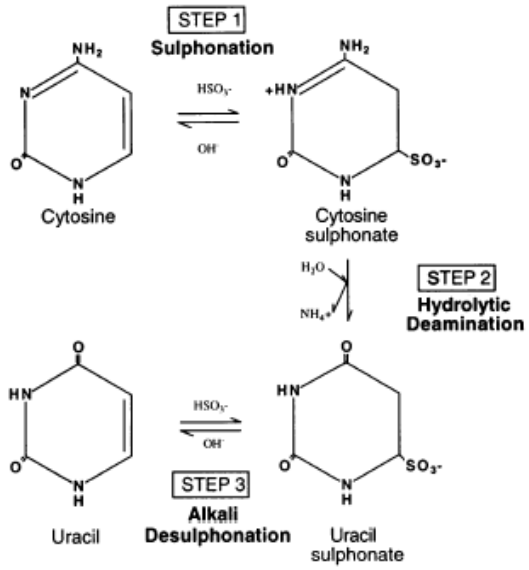

Abbildung 2: Die einzelnen Schritte der Bisulfit- Konversion (42)

1.3 Chromatin- Organisation und Histon- Modifikationen

In allen Eukaryoten ist das Chromatin das Grundgerüst von wichtigen Prozessen wie Transkription, Replikation und DNA- Reparatur. Das Chromatin besteht aus Nucleosomen, die aus einem Proteinkern mit je zwei der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bestehen, dem sogenannten Histon- Oktamer. Das Histon- Oktamer ist von 147bp linksgängiger DNA in 1,67 Windungen umschlossen und zwei der benachbarten Histone sind durch eine 40- 60bp lange Verbindungs- DNA (engl.: linker DNA) miteinander verbunden. Die Eintritts- und Austrittsstelle der DNA ist durch das Histon H1 überdeckt, welches auf der Kerneinheit (engl.: core particle) liegt. Das Histon H1 ist für die Verpackung der Nukleosomen von der 11nm zur 30nm Faser wichtig. Dieser Übergang ist reversibel, wobei nur die 11nm Faser transkribiert werden kann. Die Chromatinstruktur ist wichtig für die Genregulation und wird durch Histon- Modifikationen erreicht (43;44). Im dicht gepackten Heterochromatin befinden sich die weitestgehend stillgelegten Gene, und im lockeren Euchromatin die aktiven Gene. Alle Histone haben einen ähnlichen Aufbau mit einer annähernd globulären Domäne im Zentrum und mit flexiblen amino- und carboxyterminalen Armen. Histone besitzen einen hohen Anteil der basischen Aminosäuren Arginin, Serin und Lysin an den flexiblen Armen, die auf verschiedene Art und Weise modifiziert werden können. Histon- Acetyl- Transferasen (HATs) übertragen Acetylgruppen von Acetyl- CoA auf bis zu vier Lysinreste der Histone H2A,

H2b, H3 und H4 und aktivieren damit die Genexpression. Histon- Deacetylasen (HDACs) können diese wiederum entfernen und somit den Chromatinabschnitt wieder genetisch stilllegen. Proteinkinasen phosphorylieren Serin- Seitenketten der Histone H2A und H3 und Protein-Phosphatasen entfernen die Phosphatgruppen wieder. Histon- Methylierung erfolgt nur an Arginin- und Lysin- Resten und kann sowohl aktivierend (Methylierung am Lysin 4 von H3) als reprimierend (Lysin 9 von H3) wirken. Durch das Zusammenspiel verschiedener Histon-Modifikationen entsteht ein komplexer Histon- Code, der wichtig für die Kontrolle der Genexpression ist (44).

1.4 RNA- Interferenz

Als nicht- kodierende RNAs (ncRNAs) werden RNAs bezeichnet, die zwar von der DNA transkribiert aber nicht in Protein translatiert werden. Viele von den ncRNAs sind in der Regulation von anderen RNAs, wie Boten- RNA (mRNA), Transfer- RNA (tRNA) und ribosomaler RNA (rRNA), beteiligt. Die kleinen ncRNAs (Länge von ca. 25 Nukleotiden), wie microRNA (miRNA) und short interfering RNA (siRNA), und die langen ncRNAs (Länge von über 200 Nukleotiden) regulieren ebenso wie DNA- Methylierung und Histon- Modifikationen die Genexpression epigenetisch (45). Die RNA- Interferenz ist ein Mechanismus um Gene zielgerichtet abzuschalten. Dabei bilden einzelsträngige RNAs (ssRNA) durch Schleifen kurze, nicht vollständige doppelsträngige RNAs (dsRNA), die durch die RNase III Endoribonuklease (Dicer) zurechtgeschnitten werden. Nach Strangabbau werden die einzelsträngigen RNA- Stücke vom RNA- induzierten Stilllegungskomplex RISC (engl.: RNA- induced silencing complex) an die mRNA mit der komplementären Zielsequenz geleitet und die mRNA in der Mitte dieser Region gespalten. Bei miRNAs erfolgt die Bindung an die 3´NTR (nicht- translatierte Region), was eine Translation der der mRNA verhindert. Allerdings gibt es auch Ausnahmen, bei denen eine Bindung von miRNA an die mRNA zu einer Aktivierung der Translation führt (46;47). Durch bidirektionale Transkription entstehen siRNAs, die durch direkte Bindung an die DNA die Transkription verhindert. Lange ncRNAs sind hauptsächlich bei der X- Chromosom Inaktivierung in Säugetieren beteiligt.

1.5 Langfristige Genabschaltung

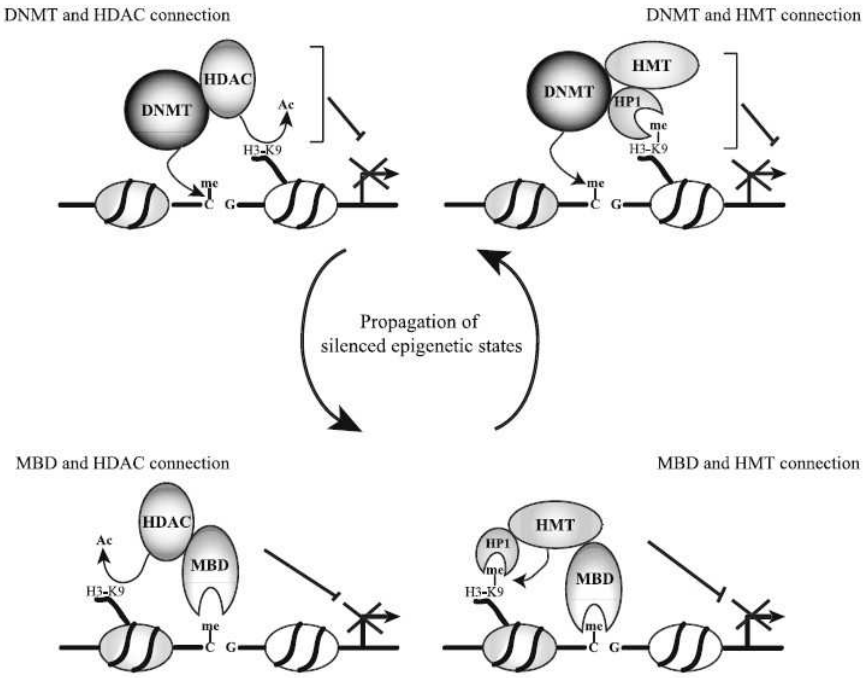

Abbildung 3: Interaktion von DNA- Methylierung und Chromatin- Modifikationen für die langfristige Genabschaltung (48)

Ein möglicher Mechanismus für die Genstilllegung ist in Abbildung 3 dargestellt. In der ersten Phase führt das Zusammenspiel von DNMTs mit HDACs zu einer Histon- Deacetylierung und in einigen Fällen zu DNA- Methylierung, die zu einer Verdichtung des Chromatins und damit zum Abschalten der Genexpression führen. Eine Methylierung am Lysin 9 im Histon H3 (H3K9) führt ebenfalls zu einer DNA- Methylierung (49;50). Durch das Adapter- Protein HP 1 (Heterochromatin- Protein 1) kann die DNMT mit der Histon- Methyltransferase (HMT) interagieren (51;52). In der zweiten Phase führt die Methylierung in den CpG- Folgen zu einer Erkennung und Bindung mit Methyl- CpG- Bindungsdomäne- Proteinen (MBD)(53). Die MBD-Proteine sind mit HDAC und dem H3K9/ HP 1- System assoziiert (54;55) und begünstigen so eine H3K9- Methylierung. Um die transkriptionelle Repression aufrecht zu erhalten, sind DNA-Methylierung, Histon- Deacetylierung und H3K9- Methylierung in einem selbsterhaltenen epigenetischen Kreislauf miteinander verbunden.

1.6 Integration fremder DNA in das Wirtsgenom

Die Integration von fremder DNA in ein Wirtsgenom ist ein häufiges Ereignis. Bakterien beispielsweise nehmen oftmals fremde DNA auf um Selektionsvorteile gegenüber anderen Bakterien zu erhalten (Antibiotika- Resistenz).
Ein Modell für die Integration von fremder DNA ist die Integration von Adenovirus Typ 12 in Hamsterzellen. Die Infektion von Hamsterzellen mit Ad12 verläuft abortiv (56). Allerdings

integriert das Virus sein Genom in das der Hamsterzellen (57-61) und führt vermutlich zu Tumorbildung in neugeborenen Hamstern (62;63). Die Charakteristika der Adenovirus DNA-Integration in Ad12- induzierten Hamstertumore sind folgende:

A) Viele, oftmals vollständige, Kopien des Ad12- Genoms werden integriert. Freie virale Genome werden nicht gefunden.
B) Ad12- induzierte Tumore haben einen Ursprung, weil alle Tumorzellen identische virale Integrationsmuster zeigen. Die Muster sind unterschiedlich in verschiedenen Tumoren.
C) Die Integration passiert durch heterologe Rekombination mit der bevorzugten Nutzung von kleinen Übereinstimmungen in der DNA- Sequenz des Wirtsgenoms mit der viralen Ad12-Sequenz. Bevorzugte Integrationsstellen sind transkriptionell aktive Regionen im Wirtsgenom (64). Manchmal kommt es zu Deletionen in der zellulären DNA.
D) In Adenovirus- transformierten Zellen und Ad12- induzierten Tumorzellen werden die frühen viralen Gene noch transkribiert, während die späten komplett abgeschaltet sind. Die differentielle *de novo* Methylierung spielt eine große Rolle bei der langfristigen Abschaltung von integrierter viraler DNA (11;65). Integrierte Ad12- Genome sind wie zelluläre DNA mit Nukleosomen organisiert (65).

Auch das Wirtsgenom wird durch die Integration von fremder DNA massiv beeinflusst. In Ad12-transformierten Hamsterzellen kommt es teilweise zu erheblichen Veränderungen im Methylierungsmuster endogener retroviraler DNA- Sequenzen und anderen Genombereichen. Dafür muss die Fremd- DNA nicht dauerhaft im Wirtsgenom präsent sein. Die Veränderungen im zellulären Methylierungsmuster findet man auch dann noch, wenn die integrierte Fremd- DNA verloren gegangen ist (66). Vorwiegend auf den kurzen Armen der Hamsterchromosomen befinden sich Kopien des Retrotransposons IAP (engl.: intracisternal A particle) (67) (68). Nach einer Integration von Ad12 kommt es dort zu starken Veränderungen im Methylierungsmuster (66;69).
Eine Integration von fremder DNA kann sowohl Auswirkungen auf die Transkription von Genen in der Nähe und auch auf Gene in weiter entfernt gelegenen Bereichen des Wirtsgenoms haben (66;69;70).

1.7 Retroelemente

Transponierbare mobile Elemente machen 45% des menschlichen Genoms aus (71). Die Einteilung der transposablen Elemente erfolgt aufgrund von strukturellen und funktionalen Merkmalen. Die erste Gruppe sind Retrotransposons mit LTR (engl.: long interspersed elements). Hierzu zählen endogene Retroviren wie HERV (engl.: human endogenous retroviruses), die ca. 8% des menschlichen Genoms ausmachen (71) und IAPs aus dem Nagetier- Genom. Die zweite Gruppe sind LTR- lose Retrotransposons mit der Fähigkeit zur autonomen Transposition, d. h. sie sind selbst in der Lage sich im Genom zu verbreiten. Die wichtigsten Vertreter sind LINEs (engl.: long interspersed elements). Das L1 enthält zwei offene Leseraster (ORF1 und 2), gefolgt von einer 3´Nichtkodierungssequenz und einer Folge von Adenin- Bausteinen. ORF1 kodiert ein 40 kDa großes RNA- Bindeprotein und ORF2 ein 150 kDa Protein mit Domänen für eine Endonuklease und einer reversen Transkriptase. Das L1- Genom wird durch die RNA- Polymerase II transkribiert.

Für die Transposition der RNA erfolgt zunächst ein Schnitt in der Zielstelle der DNA, die als Primer für die reverse Transkriptase fungiert. Die eigene RNA wird von reversen Transkriptasen als Matrize benutzt (engl.: target primed reverse transcription). Im menschlichen Genom gibt es etwa 520.000 L1- Sequenzen, allerdings sind die meisten von ihnen verstümmelt. Ihnen fehlen Teile der 5´ Hälfte, vermutlich durch eine unvollständige reverse Transkription (72).
Die letze Gruppe umfassen LTR- lose Retrotransposons, die sich nicht autonom über das Genom verteilen können. Vertreter dieser Gruppe sind SINEs (engl.: short interspersed elements) mit einer Länge von ca. 300bp. Häufigste Vertreter im menschlichen Genom sind Alu- Elemente mit mehr als einer Million Kopien. Die RNA- Polymerase III transkribiert die RNA und diese wird mit Hilfe von L1- Proteinen transponiert.
Schätzungen zufolge erfolgt eine Transposition/ Genom in jeder Generation und bleibt meist ohne Folgen für das Wirtsgenom. Allerdings kann es vorkommen, dass eine Kopie eines L1- oder Alu-Elements ins offene Leserasters eines Gens integriert und schwere Erkrankungen auslöst. Ein Beispiel ist die Integration von L1 in das Faktor- VIII- Gen als Ursache für die Bluterkrankheit (Hämophilie) (73).

1.8 Retroviren

Retroviren können aufgrund ihres Übertragungsmodus in exogene und endogene Retroviren eingeteilt werden. Exogene Retroviren besitzen in ihrem Genom alle Informationen, die für den Ablauf eines Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln gebraucht werden. Sie werden horizontal durch Infektion übertragen. Endogene Retroviren sind fest im Wirtsgenom verankert und werden vertikal durch Vererbung über die Keimbahn weitergegeben. Unter bestimmten Umständen können endogene Retroviren exogene, infektiöse Partikel bilden. Die meisten sind allerdings soweit deformiert, dass nur noch die LTR- Regionen noch vorhanden sind.
Weiterhin lässt sich die Familie der *Retroviridae* in sieben Genera, α-, β-, γ-, δ- und ε- Retroviren, sowie Lentiviren und Spumaviren einteilen.
Alle Retroviren besitzen ein einzelsträngiges RNA- Genom und das Enzym Reverse Transkriptase, die 1970 unabhängig voneinander von Temin und Baltimore beschrieben wurde (74;75).
Retrovirusinfektionen kommen überwiegend bei Wirbeltieren vor, wo sie viele unterschiedliche Symptome wie Tumorerkrankungen, Immundefizienzen, neurologische Defekte oder harmlose Infektionsverläufe hervorrufen können.
Der prominentesten Vertreter beim Menschen sind die Erreger des erworbenen Immundefekt-Syndroms (AIDS) die HI- Viren (engl.: human immunodeficiency virus), HIV- 1 und HIV- 2. Neben HIV- 1 ist auch noch ein weiteres humanpathogenes Virus bekannt, das humane T- Zell Leukämievirus (HTLV).

1.9 Endogene Retroviren

Endogene Retroviren kommen sowohl im menschlichen wie auch im Genom von anderen Wirbeltieren vor. Sie durchlaufen keinen Replikationszyklus, sondern werden von Generation zu

Generation in Form von Proviren weitergegeben. Man nimmt an, dass humane endogene Retroviren vor ca. 40 Millionen Jahren durch eine Keimzellinfektion mit exogenen Retroviren in das menschliche Genom gelangt sind (76). Durch das Ansammeln von Mutationen und Deletionen im Laufe der Zeit sind die meisten HERV defekt, aufgrund der Zerstörung des offenen Leserahmens der viralen Proteine. Durch homologe Rekombination zwischen 5´und 3´ LTR können die kodierenden Bereiche verloren gehen und es entstehen solitäre LTRs. Der Ursprung der im menschlichen Genom vorhandenen endogenen Retroviren liegt in der Verankerung einstiger infektiöser exogener Retroviren im Genom von Primatenvorläufern (77).

Die Benennung der HERVs erfolgt aufgrund der tRNA, die an der Primerbindungsstelle die reverse Transkription initiieren würde. Der Einbuchstabencode der Aminosäure der betreffenden tRNA wird dabei verwendet. HERVs werden in 30 Familien unterteilt (78) und aufgrund von Sequenzhomologien den Genera exogener Retroviren zugeordnet. Die Mitglieder der HERV- K Familie werden den β – Retroviren zugeordnet. Eine weitere Einteilung erfolgt über Sequenzhomologien im Bereich des *pol*- Gens in die Gruppen HML- 1 bis HML- 10 (79;80).

Endogene Retroviren sind nicht mehr infektiös, allerdings gibt es eine begrenzte Anzahl an HERVs mit dem Potential virale Produkte und Virus- ähnliche Partikel zu produzieren (81). Auswirkungen von integrierten HERVs sind abhängig vom Integrationsort. Proviren oder abgeleitete Sequenzen können durch Enhancer- oder Promotor- Elemente zu einer Aktivierung oder zum Funktionsverlust von zellulären Genen führen (82;83). Ein Beispiel für die Aktivierung eines Gens, ist die Integration eines HERV- E- Elements in die Promotor- Region des Amylasegens. Dadurch kann Amylase nicht nur im Pankreas sondern auch schon in der Speicheldrüse exprimiert werden (84).

In einigen Säugern werden replikationskompetente Retroviren mit Krebsformen in Verbindung gebracht. Beispiele sind das murine Leukämievirus (MMTV) in Mäusen und das JSRV (engl.: jaagsiekte sheep retrovirus) in Schafen. Diese Viren existieren sowohl exogen als auch endogen in ihren jeweiligen Wirten (85;86).

Das humane endogene Retrovirus HERV- K HML- 2 besteht aus etwa 30 Proviren, von denen einige größere Deletionen aufweisen und aus 10.000 bis 25.000 solitären LTRs, die über das gesamte menschliche Genom verteilt sind (80). HERV- K HML- 2 Proviren besitzen als einzige endogene Retroviren vollständige offene Leserahmen für alle viralen Gene (87;88).

HERV- K Partikel wurden in Teratokarzinom- Zelllinien nachgewiesen und werden als HTDV- Partikel (engl.: human teratocarcinoma derived virus) bezeichnet.

Die Expression des HERV- W Env- Proteins (Syncytin- 1) in humanen Trophoblasten der Plazenta führt zu einer Trophoblasten- Zellfusion und Differenzierung zum Syncytiotrophoblasten (89;90). Das HERV- W Env- Protein ist ebenfalls mit dem Env- Protein Syncytin- 2 des endogenen Retrovirus HERV- FRD an der Formation von Syncytiotrophoblasten beteiligt (91). Syncytin- 2 trägt möglicherweise aufgrund seiner immunsuppressiven Eigenschaften dazu bei, dass eine Abstoßung des Embryos durch die Mutter verhindert wird (89;91;92).

1.10 HIV- 1

Im Jahr 1983 wurde HIV- 1 zum ersten Mal durch Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi vom Institut Pasteur in Paris (93) isoliert und beschrieben. Neben HIV- 2 (94) ist HIV- 1 als Auslöser der erworbenen Immunschwäche AIDS identifiziert worden. HIV- 1 gehört zur Familie der Lentiviren. Diese Viren zeichnen sich durch eine lange klinische Latenzphase und eine persistierende Virämie aus.

1.10.1 Morphologie

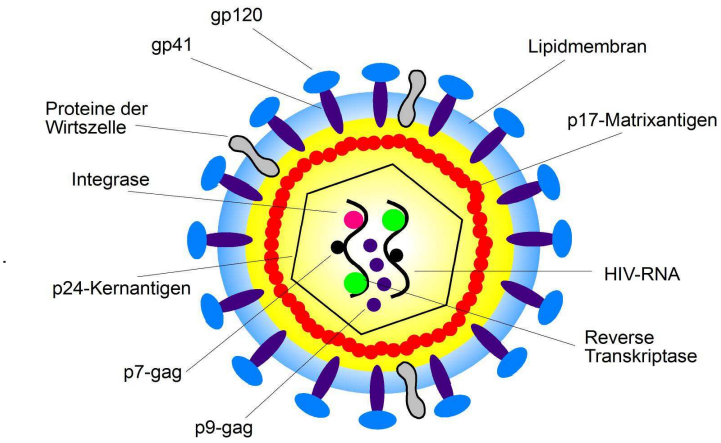

Abbildung 4: Schematischer Aufbau von HIV- 1 (95)

Die HIV- 1 Viruspartikel sind 100nm groß und von einer Lipidhülle umgeben mit 72 eingebetteten *env*- Glykoproteinkomplexe. Diese bestehen aus einem Transmembranprotein gp41 und einem externen Anteil gp120. Die Innenseite der Membran wird von Matrixproteinen (p17) ausgekleidet. Im Inneren des Virus- Partikels findet man das konische Kapsid, aufgebaut aus Kapsidproteinen (p24), mit zwei Kopien des einzelsträngigen (+) RNA- Genoms. Die RNA- Genome liegen im Komplex mit den Nukleokapsidproteinen (p7) und der reversen Transkriptase vor. Neben der reversen Transkriptase (RT) enthält das Viruspartikel noch Integrase und Protease zur Vermehrung (96).

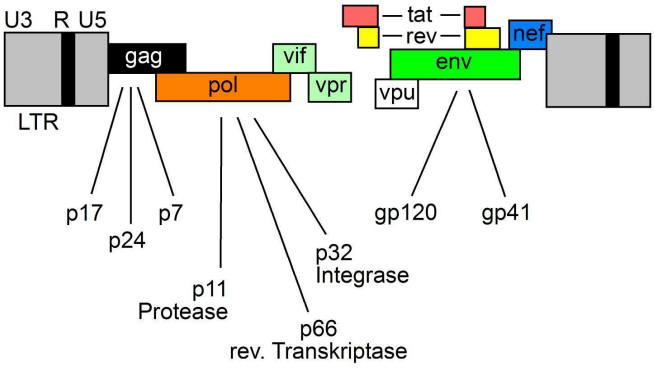

Abbildung 5: Organisation des viralen Genoms (95)

Das retrovirale Genom ist aufgebaut aus 5´ LTR- gag- pol- env- LTR 3´. Die LTR- Regionen sind essentiell für die Integration des viralen Genoms in die Wirtszelle und werden im Integrationsvorgang mit der zellulären DNA verbunden. Die Gene *gag* (engl.: group- antigen) und *env* (engl.: envelope) kodieren für das Nukleokapsid und die Glykoproteine der Virushülle. Das *pol* Gen (engl.: polymerase) kodiert die RT, Integrase und Protease. Die HIV- 1 RNA ist ca. 9kb lang und enthält noch sechs zusätzliche Gene (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef*). *Nef, vif*, *vpr*, und *vpu* sind zu mindestens *in vitro* nicht für die Virusreplikation nötig. Sie werden als akzessorische Gene bezeichnet. Die regulatorischen Proteine *tat* (engl.: transactivator of transcription) und *rev* (engl.: regulator of expression of virion proteins) akkumulieren im Zellkern und binden an bestimmte Stellen der viralen RNA. Das *tat*- Protein ist essentiell für die Replikation des Virus. Die Proteine *tat* und *rev*, stimulieren die Transkription von HIV- 1 DNA in RNA und deren Elongation. Beide sind auch für den Transport der HIV- 1 RNA vom Zellkern ins Zytoplasma und für die Translation notwendig. Das regulatorische Protein *nef* (engl.: negative factor) induziert eine Herabregulation von CD4 und HLA- Klasse- 1- Antigenen (97) an der Oberfläche infizierter Zellen, was ein Entkommen des Virus vor dem Angriff von zytotoxischen T- Zellen begünstigt. *Nef* kann auch die Aktivierung von T- Zellen beeinflussen, indem es mit Proteinen von Signaltransduktionsketten interferiert (98). Die Stimulierung der HIV- 1 LTRs, zellulären und viralen Promotern erfolgt durch *vpr* (engl.: viral protein rapid) und ist für die Virusreplikation in nicht- teilenden Zellen, wie Makrophagen, wichtig. Weiterhin wird *vpr* für den Transport des viralen Präintegrationskomplexes zum Zellkern gebraucht (99) und kann Zellen in der G2- Phase des Zellzyklus arretieren. *Vpu* (engl.: viral protein out) ist wichtig für das „budding“. HIV- 1 haftet an das Membranmolekül Tetherin und benutzt *vpu* um vollständig aus den Zellen freigesetzt zu werden (100;101). Eine weitere Funktion von *vpu* ist die Beteiligung an der Degradation von CD4- gp160- Komplexen, damit genügend gp160 bei der Neubildung von Virionen vorhanden ist (102). Das *vif* Protein (engl.: viral infectivity factor) beeinflusst die Infektiösität der Nachkommenviren bei bestimmten Zelltypen. Essentiell ist das Protein bei der Infektion von peripheren Blutlymphozyten um infektiöse Viren herzustellen (96;103).

1.10.2 Klinik

Die Behandlung einer HIV- 1 Infektion erfolgt durch eine medikamentöse Kombinationstherapie von mindestens drei oder vier antiretroviralen Wirkstoffen. Therapieschemata bestehen aus der Kombination zweier nukleosidischer Reverse- Transkriptase- Inhibitoren (NRTI) mit einem nicht-nukleosidischen Reverse- Transkriptase- Hemmer (NNRTI) oder mit einem Proteasehemmer, ebenso stehen noch Hemmstoffe für die Integrase und für den Virusentritt zur Verfügung (104). Der Vorteil bei dieser Strategie ist, dass möglichst viele voneinander unabhängige Funktionen des Virus angegriffen werden.
Eine erfolgreiche Kombinationstherapie hemmt die Virusreplikation soweit, dass HIV- 1 mit diagnostischen Methoden nicht mehr nachweisbar ist (< 40 Kopien pro ml Serum), allerdings kann sie die Virusreplikation nicht vollständig unterbinden. Eine Reduzierung der Viruslast kann die Progression von AIDS verzögern.
Ein weiteres Problem der Therapie ist das rasche Auftreten von resistenten HIV- 1 Varianten. Resistente Viren können durch die Inhibitoren nicht mehr in ihrer Replikation gehemmt werden, deshalb wird während der Therapie auf das Auftreten von Mutationen im Virusgenom (z.B. im Gen der reversen Transkriptase oder der Protease) geachtet. Mutationen werden durch Amplifikation des entsprechenden Genomabschnitts durch PCR und anschließender Sequenzierung nachgewiesen. Werden Mutationen gefunden, so wird die Zusammensetzung der Medikamente entsprechend angepasst. Durch den Selektionsdruck der eingesetzten antiretroviralen Medikamente nimmt allerdings auch die Rate mit Infektionen durch bereits resistente HIV- 1 Varianten zu (96).
Eine Eliminierung des Virus aus dem Wirtsgenom kann die Kombinationstherapie nicht bewirken. HIV- 1 Proviren verbleiben als Reservoir in ruhenden T- Zellen, wo sie bereits seit der Frühphase der Infektion integriert wurden. Wenn diese T- Zellen aktiviert werden, kommt es zur Produktion von infektiösen Viruspartikeln, deswegen ist es wichtig, Strategien zu finden, um dieses Reservoir zu eliminieren.

Der Krankheitsverlauf einer HIV- 1 Infektion kann in drei Phasen eingeteilt werden. Die erste Phase (Primärinfektion) verläuft meist ohne Symptome und dauert ungefähr sechs Monate an. Die Patienten produzieren in dieser Zeit große Virusmengen von 10^6 bis 10^8 Genomäquivalenten pro ml Blut, die $CD4^+$- Lymphozyten fallen vorübergehend auf unter 500 Zellen pro µl und der CD4/ CD8-Zellquotient verändert sich auf weniger als 0,5. An diese Phase schließt sich ein mehrere Jahre andauerndes Symptom freies Stadium der chronischen Infektion an (Latenz). In Patienten lassen sich spezifische HIV- 1 Antikörper und T- Lymphozyten nachweisen und infolge der antiviralen Immunantwort sinkt die Viruslast im Blut unter $2x\ 10^4$ Genomäquivalenten pro ml Blut. Aufgrund der fortschreitenden Virusreplikation sinkt die Anzahl der $CD4^+$- Zellen langsam ab. Die asymptomatische Phase dauert, bei etwa 50% der nicht mit antiretroviralen Medikamenten behandelten HIV- 1 Infizierten, über 10 Jahre. Bereits ein bis zwei Jahre, bevor sich die klinischen Symptome von AIDS entwickeln, sinkt die Zahl der $CD4^+$- Zellen rapide ab und die Viruskonzentration im Blut nimmt zu. In der dritten Phase der HIV- 1 Infektion treten die klinischen Symptome von HIV- 1 und AIDS auf. Zu den klinischen Symptomen von HIV- 1 zählen

zum Beispiel Fieber, Hautausschlag, Geschwüre im Bereich der Mundschleimhaut, Nachtschweiß und geschwollene Lymphknoten sowie ein Gewichtsverlust von mehr als 2,5kg. AIDS-definierende Erkrankungen bzw. opportunistische Infektionen sind zum Beispiel Tuberkulose, Lungenentzündung, Pilzinfektionen der oberen Atemwege und Entwicklung von Tumoren wie das Kaposi- Sarkom. Für gesunde Menschen sind opportunistische Infektionen ungefährlich, bei einem HIV- 1 Infizierten, der durch die Virusinfektion ein geschwächtes Immunsystem hat, tödlich (96).

Die Entwicklung von AIDS nach einer HIV- 1 Infektion kann unterschiedliche Verläufe haben. Ein geringer Prozentsatz der Infizierten entwickeln AIDS innerhalb der ersten 2 bis 3 Jahre nach der Primärinfektion, sogenannte „ rapid progressors“ (105;106). Eine andere Gruppe von HIV- 1 Infizierten sind die sogenannten „long term nonprogressors“ (LTNP). Diese Langzeit-Überlebenden zeigen keine klinischen Symptome seit mehr als 12 Jahre ohne eine antiretrovirale Therapie erhalten zu haben (107-109). Allerdings kann es auch nach einer 15 Jahre andauernden Latenzphase zum Ausbruch von AIDS kommen (110). Ein gemeinsamer Mechanismus zum Verhindern von AIDS existiert in den LTNPs nicht.

Einige sind mit HI- Viren infiziert, die eine ineffiziente Replikation haben. Andere LTNPs wiederum halten die Progression zu AIDS durch humorale und Zell- vermittelte Immunantworten in Schach (110).

LTNPs haben eine Viruslast von unter 10.000 Genomäquivalenten pro ml Blut und eine normale Anzahl an $CD4^+$- Zellen (111), bei Nicht- Infizierten liegt der Wert zwischen 450 und 1600 pro ml Blut.

Eine besondere Gruppe innerhalb der LTNPs sind die „Elite Controllers“ (Elite- Kontrolleure), deren Immunsystem hält die HIV- 1 Infektion über einen langen Zeitraum unter Kontrolle. Die Viruslast ist in dieser Gruppe sehr niedrig oder auch nicht mit diagnostischen Methoden nachweisbar (112;113).

1.10.3 Replikationszyklus

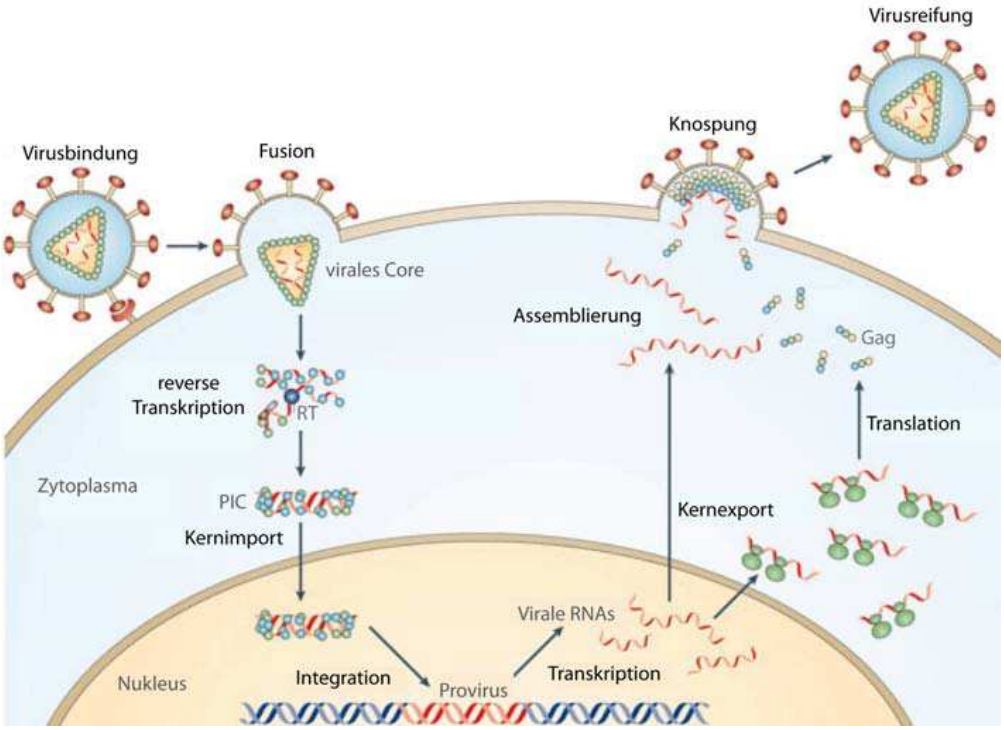

Abbildung 6: Schematische Darstellung des HIV- 1 Replikationszyklus (114)

Zu Beginn einer retroviralen Infektion ist die Anheftung des viralen *env*- Glykoproteins an den CD4- Rezeptor auf $CD4^+$ positiven Zellen des menschlichen Immunsystems wie T- Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Der Eintritt des HI- Virus resultiert in einer Konformationsänderung des gp120 um die Bindung an einen Ko- Rezeptor CCR5 (Makrophagen) oder CXCR4 (T- Lymphozyten) zu ermöglichen. Nach Virus- Adsorption fusionieren die Virusmembran mit der Wirtszellmembran. Das virale RNA- Genom wird zusammen mit den viralen Enzymen ins Zytoplasma entlassen und die virale RNA durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Die HIV- 1 DNA wird als prä- Integrationskomplex (PIC) in den Zellkern transportiert, wo sie mit Hilfe der viralen Integrase ins Wirtszellgenom integriert wird. Die Provirus- DNA wird durch die zelluläre RNA- Polymerase II transkribiert und es entstehen zunächst mehrfach gespleißte mRNAs, die nach Export ins Zytoplasma translatiert werden. Im Zytoplasma werden die regulatorischen Proteine tat, rev und nef synthetisiert und in den Zellkern transportiert, um zu einer verstärkten Transkription sowie zur Bildung ungespleißter und einfach gespleißter mRNAs zu führen. Diese werden nach dem Transport in das Zytoplasma zur Translation der viralen Strukturproteine, der akzessorischen Polypeptide und als Virusgenom verwendet. An der Zytoplasmamembran lagern sich Virusgenome mit den Proteinkomponenten zusammen und es kommt zur Knospung unreifer Virus- Partikel von der Zelloberfläche. Die Reifung zu infektiösen HI- Viren erfolgt über die Spaltung der gag- und gag/ pol- Vorläuferproteine durch die virale Protease.

1.10.4 Das HIV- 1 Provirus

Als Provirus wird das integrierte virale Erbgut bezeichnet. Der Aufbau ist in Abbildung 7 dargestellt. Die LTRs flankieren die viralen Gensequenzen und liegen an den Genomenden in gleicher Orientierung vor. Sie erfüllen regulatorische Aufgaben und bestehen aus den U3 (engl.: unique), R (engl.: redundant) und U5- Bereichen. *Cis*- aktive Sequenzen, wie Promotor- und Enhancer- Elemente, welche die retrovirale Genexpression kontrollieren, sind vor allem im U3- Bereich enthalten. In der U3- Region befindet sich ebenfalls eine Bindestelle für NFκB (Nuklearfaktor κB), ein Transaktivatorprotein. Nach Stimulierung des Immunsystems und der Wirkung der Cytokine IL- 1 oder TNF- α in T- Lymphozyten wird NFκB aktiviert und leitet die virale Genexpression ein. Bei HIV- 1 ist die NFκB- abhängige Genexpression sehr wichtig, da jede Stimulierung des Immunsystems durch andere Infektionen die HIV- 1- Expression induziert. Durch die gebildeten Virus- Partikel wird eine fortschreitende Infektion von T- Zellen erreicht und diese Zellpopulation weiter geschädigt. Im U3- Bereich befinden sich noch weitere Kontrollelemente, wie Bindestellen für die Transkriptionsfaktor Sp1 und des Adapterproteins Ap2. Nach dem U5- Bereich folgt die Primerbindestelle (PBS) des Provirus, an der zelluläre tRNA bindet, um die reverse Transkriptase- Reaktion zu initiieren. Im 5´- Bereich befindet sich auch das Verpackungssignal der viralen RNA die Ψ- Site.

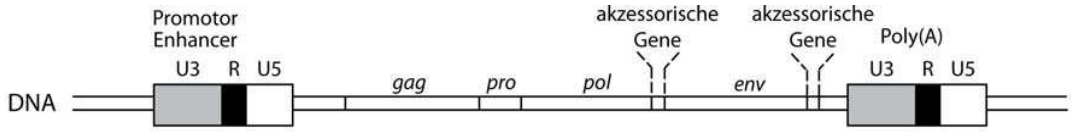

Abbildung 7: Aufbau des HIV- 1 Provirus (115)
gag- gruppenspezifische Antigene; *pro*= Protease; *pol*= Polymerase; *env*= Membranproteine

HIV- 1 hat, wie alle anderen Lentiviren, einen hohen Grad an CpG- Suppression, nur 20% des statisch erwarteten CpG- Gehalts (116). Statistische Analysen zeigen, dass diese CpG Suppression im HIV- 1 Genom auf evolutionäre Selektion zurückzuführen ist (117). Die CpG- Dinukleotide sind nicht gleichmäßig über das virale Genom verteilt, sondern konzentrieren sich auf das 5´ und das 3´ LTR. Viele der CpG- Dinukleotide im LTR sind essentiell für die Virusreplikation, genauso wie für die Bindung von Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle (118). Die Stilllegung der proviralen DNA durch CpG- Methylierung wurde in anderen Retroviren, wie HTLV- 1, beschrieben (119). In Zelllinien, die latent mit HIV- 1 infiziert sind, ist das 5´LTR des Provirus hypermethyliert (120). Eine Aktivierung der viralen Expression korreliert mit einem Verlust der Methylierung im LTR (121;122). Zwei CpG- Inseln im 5´ Promotor scheinen besonders sensibel für die CpG- Methylierung zu sein. Die erste Insel enthält Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (Sp1, NFκB), welche die virale Transkription initiieren. MBD2/ HDAC2- Bindestellen sind in der zweiten CpG- Insel identifiziert worden. Die Rekrutierung dieser beiden Faktoren resultiert in einer Cytosin- Methylierung und damit zu einer anhaltenden Abschaltung des HIV- 1 Provirus (122). Patienten mit einer Viruslast unter der Nachweisgrenze (avirämisch) zeigen eine höhere Anzahl an hypermethylierten HIV- 1 Promotoren in ruhenden $CD4^+$ T- Zellen als in Patienten mit hoher

Viruslast unter HAART (hochaktiven antiretroviralen Therapie) (121). In einer neueren Studie wurde dagegen keine DNA- Hypermethylierung in avirämischen Patienten gefunden (123). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte am Zeitpunkt der Infektion in den Patienten liegen. DNA-Methylierung ist vielleicht ein spätes Ereignis um das Abschalten von bereits latenten Viren zu verstärken (124;125). In asymptomatischen Patienten, die eine geringe Viruslast ohne antiretrovirale Therapie haben, wurde ein geringer Grad an DNA- Methylierung gefunden, wohingegen in AIDS- erkrankten Patienten keine DNA- Methylierung im 5´LTR gefunden wurde (126). Die bisher veröffentlichten Ergebnisse deuten an, dass es neben der DNA- Methylierung noch andere Mechanismen zur Abschaltung des HIV- 1 Provirus gibt. Allerdings gibt es zum momentanen Zeitpunkt zu wenige Studien zu diesem Thema.

II. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit umfasst zwei thematische Schwerpunkte.
Im Rahmen des ersten Projektes sollten die Veränderungen von Retroelementen nach Integration von fremder DNA in das menschliche Wirtsgenom untersucht werden. Durch Versuche mit einer Adenovirus 12 transformierten Hamster- Zelllinie konnte unter anderem gezeigt werden, dass es zu massiven Veränderungen im Methylierungsmuster in Retrotransposons (IAPs) kommt (66;69). Um DNA- Methylierungsveränderungen nach einer Integration von fremder DNA zu untersuchen, sollte als Modell eine Tumorzelllinie mit einem Plasmid stabil transfiziert und zu Einzelzellklonen weiter kultiviert werden. Durch Bisulfit- Sequenzierung genomischer DNA sollten der DNA-Methylierungsstatus der endogenen Retroviren HERV- K und HERV- W sowie dem Retrotransposon LINE 1 untersucht werden. Des Weiteren sollte durch GeneChip® Expressions-Arrays nach Genom- weiten Veränderungen in den trans- genomischen Zellen gesucht werden.

Durch eine Behandlung mit antiretroviraler Therapie wird der Ausbruch von AIDS nach einer HIV- 1 Infektion nur verzögert und nicht geheilt. Dennoch gibt es HIV- 1 infizierte Menschen, die mit der Infektion mehr als 10 Jahre lang ohne Therapie symptomfrei leben, sogenannte Langzeit-Überlebende (engl. long term nonprogressors; LTNPs). Das zweite Projekt der Arbeit sollte nun untersuchen, in wie weit epigenetische Prozesse, speziell die DNA- Methylierung, eine Rolle bei der Kontrolle der HIV- 1 Infektion spielen. Dazu sollten die DNA- Methylierungsmustern von HIV-1 Proviren durch Bisulfit- Sequenzierung genomischer DNA in HIV- 1 Patienten in unterschiedlichen Krankheitsstadien untersucht und miteinander verglichen werden.

III. Material

3.1 Lösungen, Puffer und Medien

3.1.1 Zellkultur

Ciprofloxacin, 2,35mg/ ml
In 170ml H_2O_{Ampuwa} wurden 0,4 g Ciprofloxacin- Hydrochlorid- Monohydrat gelöst, durch einen 0,22µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert, zu je 2,5ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium (DMEM)
In 950ml H_2O_{Ampuwa} wurden 13,38g DMEM und 3,7g $NaHCO_3$ gelöst. Der pH- Wert von 7,05 wurde mit 25% HCl im Endvolumen von 1l eingestellt. Das Medium wurde mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz steril filtriert. Vor Gebrauch wurde 10% fötales Kälberserum zugefügt.

Einfriermedium für Eukaryotenzellen
Das entsprechende Zellkulturmedium wird, für die Zelllinie HCT- 116 DMEM mit 10% Glycerol versetzt.

Geneticin, 50mg/ ml
In 10ml PBS wurden 500mg Geneticin- Sulfat (G418, > 650U/ mg) gelöst und mit einem 0,22µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert. Aliquots wurden bei -20°C eingefroren und konnten bis zu 5 Mal hintereinander gefroren/ aufgetaut werden.

L- Glutamin, 50mg/ ml
In 1l H_2O_{Ampuwa} wurden 50g L- Glutamin im 37°C heißen Wasserbad gelöst, mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz steril filtriert, zu je 3,5ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Lysis- Puffer:
Für 100ml Lysis- Puffer wurden 1ml 10mM Tris HCl pH 8,0, 5ml 25mM EDTA pH 8,0 und 5ml 0,5% SDS in 89ml H_2O_{Ampuwa} gelöst.
Endkonzentration: 1M Tris HCl, 0,5M EDTA pH 8, 0, 10% SDS

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)
In 9l $H_2O_{Milli-\ Q}$ wurden 80g NaCl, 11,5g Na_2HPO_4- $2H_2O$, 2g KCl, 2g KH_2PO_4, 4,9ml $MgCl_2$ und 4,6ml 2M $CaCl_2$ gelöst. Im Endvolumen von 10l wurde der pH- Wert 7,3 mit 1M HCl eingestellt, mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz filtriert und bei 4°C oder Raumtemperatur gelagert.
Endkonzentration: 136,89mM NaCl, 6,64mM Na_2HPO_4, 2,68mM KCl, 1,47mM KH_2PO_4, 0,98mM $MgCl_2$, 0,92mM $CaCl_2$

Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} (PBSo)

In 9l $H_2O_{Milli-Q}$ wurden 80g NaCl, 11,5g Na_2HPO_4- $2H_2O$, 2g KCl und 2g KH_2PO_4 gelöst. Im Endvolumen von 10l wurde der pH- Wert 7,3 mit 1M HCl eingestellt, mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz filtriert und bei 4°C oder Raumtemperatur gelagert.

Endkonzentration: 136,89mM NaCl, 6,64mM Na_2HPO_4, 2,68mM KCl, 1,47mM KH_2PO_4

Streptomycin, 60mg/ ml und Penicillin, 99500U/ ml

In 83ml H_2O_{Ampuwa} wurden 5g Streptomycin- Sulfatsalz und 5g Penicillin G- Natriumsalz (1625U/ mg) gelöst, durch einen 0,22µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert, zu je 1ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Trypsin- EDTA

In 950ml H_2O_{Ampuwa} wurden 8g NaCl, 0,4g KCl, 0,1g Na_2HPO_4- $2H_2O$, 1g D- (+) Glukose und 3g Tris gelöst, der pH- Wert von 7,5 mit 25% HCl eingestellt und 0,1g EDTA- Na_2-$2H_2O$, 1,2g Trypsin und 5ml Phenolrot dazu gegeben. Im Endvolumen von 1l wurde der pH 7,5 nochmals mit 1M HCl eingestellt. Die Lösung mit einem 0,1µm Millidisk 10 Filtereinsatz steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Endkonzentration: 136,89mM NaCl, 5,37mM KCl, 136,89mM NaCl, 5,37mM KCl, 0,56mM Na2HPO4, 5,55mM D-(+)-Glukose, 24,77mM TRIS, 0,27mM EDTA-Na2, 0,12% Trypsin w/v), 0,0005% Phenolrot (w/v)

Zellkulturmedium HCT- 116

Das DMEM für die Zelllinie HCT- 116 wurde vor Gebrauch mit 10% FKS (v/v), 350µg/ ml L-Glutamin und 120µg/ ml Streptomycin mit 199U/ ml Penicillin versetzt.

3.1.2 Bakterienkultur

Ampicillin, 50mg/ ml

In 100ml H_2O_{Ampuwa} wurden 5g Ampicillin- Natriumsalz gelöst, durch einen 0,2µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert, zu je 2,5ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

0,5M $CaCl_2$:

0,37g wurden in 5ml H_2O_{Ampuwa} gelöst, steril filtriert mit einem 0,22µm Spritzenvorsatzfilter, zu 50µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

DTT, 2,25M

In 5ml $H_2O_{Milli-Q}$ wurden 1,84g DTT und 250µl 1M Kaliumacetat gelöst, zu 50µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Endkonzentration: 2,25M DTT, 50mM Kaliumacetat

100mM EDTA

0,19g wurden in 5ml $H_2O_{Milli-Q}$ gelöst, steril filtriert mit einem 0,22µm Spritzenvorsatzfilter und bei 4°C gelagert.

1M Glucose

0,9g D- (+) Glukose wurden in 5ml $H_2O_{Milli-Q}$ gelöst, steril filtriert mit einem 0,22µm Spritzenvorsatzfilter und bei 4°C gelagert.

Inoue- Transformationspuffer

In 1l $H_2O_{Milli-Q}$ wurden 10,88g $MnCl_2$- $4H_2O$, 2,2g $CaCl_2$- $2H_2O$, 18,65g KCl und 20ml 0,5M PIPES pH 6,7 gelöst, mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz steril filtriert, zu je 50ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.
Endkonzentration: 55mM $MnCl_2$, 15mM $CaCl_2$, 250mM KCl, 10mM PIPES

1M Kaliumacetat ($C_2H_3KO_2$):

24,5g Kaliumacetat wurden in 250ml $H_2O_{Milli-Q}$ gelöst, steril filtriert mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz und bei 4°C gelagert.

5M KOH

56,11g wurden in 200ml H_2O_{Ampuwa} gelöst.

LB- Medium (Luria- Bertani Medium)

In 950ml $H_2O_{Milli-Q}$ wurden 10g Pepton aus Casein, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl und 16g Agar gelöst, der pH- Wert von 7,2 mit 5M NaOH eingestellt, auf 1l Endvolumen aufgefüllt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.
Vor Gebrauch: 50µg/ ml Ampicillin (0,5ml Ampicillin auf 0,5l LB- Medium)

LM- Agarplatten

In 1l $H_2O_{Milli-Q}$ wurden 10g Pepton, 5g Hefeextrakt, 0,6g NaCl und 16g Agar gelöst, autoklaviert und auf 55°C abgekühlt. Vor dem Gießen der Platten wurden jeweils 10ml $MgSO_4$ und $MgCl_2$ sowie das entsprechende Antibiotikum dazugegeben. 20ml LM- Agar wurden auf die Petrischalen (Ø 10cm) pipettiert.
Ampicillin- Selektion**:** 100µg/ ml Ampicillin (2ml Ampicillin auf 1l LM- Agar)

1M $MgSO_4$- 6 H_2O

30g wurden in 250ml $H_2O_{Milli-Q}$ gelöst, steril filtriert mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz und bei 4°C gelagert.

1M $MgCl_2$- 6 H_2O

23,8g wurden in 250ml $H_2O_{Milli-Q}$ gelöst, steril filtriert mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz und bei 4°C gelagert.

0,5M $MgCl_2$

0,5g wurden in 5ml $H_2O_{Milli-Q}$ gelöst, steril filtriert mit einem 0,22µm Spritzenvorsatzfilter, zu 50µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

β- Mercaptoethanol, 1,22M

In 9047µl $H_2O_{Milli-Q}$ wurden 853µl 14,3M β- ME und 100µl 1M MOPS gelöst, zu je 50µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.
Endkonzentration: 1,22M β- ME, 10mM MOPS

1M MOPS

20,9g MOPS wurden in 100ml $H_2O_{Milli-Q}$ gelöst.

NZY^+- Medium

In 1l $H_2O_{Milli-Q}$ wurden 10g Pepton aus Casein, 50g Hefeextrakt und 6g NaCl gelöst, autoklaviert und bei 4°C gelagert.
Vor Gebrauch wurden zu 10ml NZY+- Medium 125µl 1m $MgSO_4$, 125µl 1M $MgCl_2$ und 200µl 1M D- (+) Glukose dazugegeben.

PIPES, 0,5M, pH 6,7

In 80ml $H_2O_{Milli-Q}$ wurden 15,1g PIPES gelöst, der pH- Wert von 6,7 mit 5M KOH eingestellt, auf 100ml Endvolumen aufgefüllt, mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz steril filtriert, zu 20ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

SOB- Medium

In 1l $H_2O_{Milli-Q}$ wurden 20g Peptone aus Casein, 5g Hefeextrakt, 0,6g NaCl und 0,2g KCl gelöst, autoklaviert und dann bei 4°C gelagert.
Vor Gebrauch wurden zu 100ml Medium 1ml 1M $MgSO_4$ $MgSO_4$ und 1ml 1M $MgCl_2$ zugegeben.

3.1.3 Sonstige Lösungen

Chloroform/ Isoamylalkohol- Gemisch

Chloroform und Isoamylalkohol wurden im Verhältnis 24:1 gemischt und bei Raumtemperatur gelagert.

Desoxyribonukleosid- 5´- triphosphate, 10mM

Jeweils 10µl von 100mM dATP, dCTP, dTTP und dGTP wurden mit 60µl H_2O_{Ampuwa} gemischt und bei -20°C gelagert.

DNA- Ladepuffer, 6x

Für 50ml wurden 30ml 100% Glycerol, 6ml 0,5M EDTA- Na_2 pH 8,0, 1,5ml 1% Bromphenolblau, 1,5ml 1% Xylencyanol und 0,5ml 1m Tris- HCl pH 7,6 gemischt und mit H_2O_{Ampuwa} aufgefüllt.

Endkonzentration: 60% Glycerol (v/ v), 60mM EDTA- Na_2, 0,03% Bromphenolblau (w/ v), 0,03% Xylencyanol (w/ v), 10mM Tris- HCl

Natriumacetat- Lösung, 3M, pH 5,2

40,38g Natriumacetat- $3H_2O$ wurden in 80 ml $H_2O_{Mili-\ Q}$ gelöst. Der pH 5,2 wurde mit Eisessig eingestellt und mit $H_2O_{Mili-\ Q}$ auf 100ml Endvolumen aufgefüllt, steril filtriert mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz und bei Raumtemperatur gelagert.

RNase A, 10mg/ ml (DNase- frei)

In 10ml TE- Puffer pH 8,0 wurden 100mg RNase A gelöst, 15min. lang im kochenden Wasserbad erhitzt und nach langsamen Abkühlen zu je 1ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

TBE- Puffer, 5x

In 5l $H_2O_{Mili-\ Q}$ wurden 270g Tris, 137,5g Borsäure und 100ml EDTA- Na_2 pH 8,0 gelöst.
Endkonzentration: 445mM Tris, 445mM Borsäure, 10mM EDTA- Na_2 pH 8,0

TE- Puffer, pH 8,0

Für 1l wurden 10ml 1M Tris- HCl pH 8,0 und 2ml 0,5M EDTA- Na_2 pH 8,0 gelöst und der pH 8,0 mit 1M HCl eingestellt.
Endkonzentration: 10mM Tris- HCl pH 8,0, 10mM EDTA- Na_2 pH 8,0

3.2 Plasmide

pcDNA3.1(+)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
pJet1.2/ blunt	Fermentas, St. Leon- Rot
pEGFP- FMR1	Weber, S. 2007 (127)

3.3 Bakterienstämme

E. coli DH5α — Life Technologies GmbH, Darmstadt

Genotyp:

F– f80*lac*ZDM15 D(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (rk–, mk+) *pho*A *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1

3.4 Zelllinien und DNA- Proben

3.4.1 Menschliche Zelllinien

HCT- 116 Männliche Zelllinie eines Kolorektalkarzinoms; American Type Culture Collection (ATCC) CCL- 247; LGC Standards, Wesel

3.4.2 DNA- Proben von HIV- 1 positiven und an AIDS erkrankten Patienten

Patient	Geschlecht	Ethnische Herkunft	Datum	Viruslast (Kopien/ ml)	CD4 Zellzahl (Zellen/mm3)	HAART	Klinischer Status
W-1[#]	♀	AA	06/ 1995	464	n. b.	k. B.	LTNP
			05/ 1996	431	800	k. B.	LTNP
			04/ 2003	280	1047	k. B.	LTNP
			04/ 2006	250	623	k. B.	LTNP
W-21[#]	♀	AA	01/ 1997	240	1849	k. B.	LTNP
			03/ 2001	530	1774	k. B.	LTNP
			06/ 2006	2000	1278	k. B.	LTNP
W-360[#]	♀	K	07/ 1996	21.130	972	k. B.	LTNP
TR19[##]	♂	K	03/ 2007	5579	560	k. B.	LTNP
W-20[#]	♀	H	09/ 1997	< 48	1174	k. B.	Elite Controller
			04/ 2006	< 80	1826	k. B.	Elite Controller
			07/ 2006	230	1146	k. B.	Elite Controller
W-350[#]	♀	AA	05/ 2002	< 80	917	k. B.	Elite Controller
			10/ 2002	< 80	784	k. B.	Elite Controller
W-351[#]	♀	AA	03/ 2002	110	886	k. B.	Elite Controller
W-352[#]	♀	AA	03/ 2002	< 80	n. b.	k. B.	Elite Controller
			01/ 2006	< 80	601	k. B.	Elite Controller
			07/ 2006	< 80	1032	k. B.	Elite Controller
TR15[##]	♂	K	03/ 2007	< 50	650	k. B.	Elite Controller
TR16[##]	♂	K	12/ 2006	110	610	k. B.	Elite Controller
W-4[#]	♀	AA	08/ 1999	110.000	135	k. B.	AIDS
W-17[#]	♀	H	06/ 1999	480.000	0	D4T, EFV, NVF	AIDS
901148[###]	♂	n. v.	02/ 2009	12.000	n. v.	k. B.	Chronische Infektion, Behandlung fehlgeschlagen, NRTI, NNRTI Resistenzen

901196### ♂	K	02/ 2009 38.000	n. v.	k. B.	Chronische Infektion, verschiedene Behandlungen fehlgeschlagen
901251### ♀	n. v.	02/ 2009 63.000	n. v.	k. B.	Chronische Infektion vor der Behandlung, keine Resistenzen
901271### ♂	K	02/ 2009 130.000	n. v.	k. B.	Chronische Infektion vor der Behandlung, keine Resistenzen
901330### ♂	K	02/ 2009 470.000	n. v.	k. B.	Chronische Infektion vor einer Kurzzeit- Behandlung, keine Resistenzen
901448### ♂	K	02/ 2009 36.000	n. v.	k. B.	Chronische Infektion vor einer Kurzzeit- Behandlung, keine Resistenzen
901496### ♂	n. v.	02/ 2009 670.000	n. v.	k. B.	Chronische Infektion vor der Behandlung, keine Resistenzen
901448### ♂	n. v.	02/ 2009 180.000	n. v.	k. B.	Chronische Infektion vor der Behandlung, keine Resistenzen

Tabelle 1: DNA- Proben von HIV- 1 positiven und an AIDS erkrankten Patienten.

♂= männlich; ♀= weiblich; AA= Afroamerikaner; K= Kaukasier; H= Hispanic; n. v. = nicht verfügbar; n. b. = nicht bestimmt; k. B. = keine Behandlung; LTNP = Langzeit- Überlebende(r) (engl.: long term nonprogressor),
NRTI = Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren;
NNRTI = Nichtnukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
# = DNA- Proben WIHS (Women´s Interagency HIV- 1 Study)
= DNA- Proben Maple Leaf Clinic Cohort, Toronto, Canada
= DNA- Proben Virologie, Erlangen

3.5 Primer

Alle Oligidesoxyribonukleotid- Primer wurden von Sigma- Aldrich, Taufkirchen hergestellt.

3.5.1 Primer zum Nachweis der Integration von pEGFP-FMR1 und HIV- 1 im Wirtsgenom

Primer		Sequenz 5´→ 3´
Kan.pEGFP 5´	v	ATG ATT GAA CAA GAT GGA TT
Kan.pEGFP 3´	r	TCA GAA GAA CTC GTC AAC AA
Alu1 forward *	v	GCC TCC CAAAGT GCT GGG ATT ACA G
HIV- 1 gag reverse *	r	GCT CTC GCA CCC ATC TCT CTC C
LTR forward *	vn	GCC TCA ATA AAG CTT GCC TTG A
LTR reverse *	r n	TCC ACA CTG ACT AAA AGG GTC TGA

Tabelle 2: Primer zum Nachweis der Integration von pEGFP- FMR1 und HIV- 1 im Wirtsgenom.

v= Vorwärts- Primer; r= Rückwärts- Primer; n= Primer für verschachtelte PCR; *(128)

3.5.2 Primer zum Nachweis von HIV- 1 zirkulierenden Formen

Primer		Sequenz 5´→ 3´
MH535 **	v	AAC TAG GGA ACC CAC TGC TTA AG
MH536 **	r	TCC ACA GAT CAA GGA TAT CTT GTC

Tabelle 3: Primer zum Nachweis von HIV- 1 zirkulierenden Formen

v= Vorwärts- Primer; r= Rückwärts- Primer; **(129)

3.5.3 Sequenzierprimer

Primer		Sequenz 5´→ 3´
pJET1.2/blunt	r	AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG
pEGFPo P1	v	TGG AAG GGC TAA TTC ACT CC
HXB2o P2	r	CAC ACA CTA CTT GAA GCA CTC AAG
HXB2o P3	v n	AAG ATA TCC TTG ATC TGT GG
HXB2o P4	r n	CTT AAG CAG TGG GTT C
HXB2o P7a	v	AGT ACC AGT TGA GCC AGA TA
HXB2o P8a	r	AGC TTT ATT GAG GCT TAA G
HXB2o P7i	v n	GGA GAG AAC ACC AGC TTG TT
HXB2o P8i	r n	CAG GCT CAG ATC TGG TCT AA
HXB2o P9	v	GCA TTC TGG ACA TAA GAC AA
HXB2o P10	r	TTTGCCACAATTGAAACAC
HXB2o P11	v n	ACC AAAGGAACCCTTTAGAG
HXB2o P12	r n	TCTTTGGTTCCTAAAATTGC
HXB2o P13	v	GAGAGACAGGCTAATTTTTT
HXB2o P14	r	TTGACAGGTGTAGGTCCT
HXB2o P15	v n	AGGGAAGATCTGGCCTTC
HXB2o P16	r n	CCTATAGCTTTATGTCCACAGATTT

Tabelle 4: Sequenzier- Primer

v= Vorwärts- Primer; r= Rückwärts- Primer; n= Primer für verschachtelte PCR

3.5.4 Primer für Bisulfit -behandelte DNA

	Primer		Sequenz 5´→ 3´
Line 1	L1.2 P1	v	AGG AGT TAA GAT GGT YGA ATA G
	L1.2 P2	r	ACT AAA AAA ACC ACT ACT CTC T
	L1.2 P3	v n	GAA TAG TTT YGG TTT ATA GTT T
	L1.2 P4	r n	TTA AAT CTA CAA AAA TTA CT
HERV- K6	K P1	v	AAT TTT TTA TAT TGT TTA TGA TGT AAA GAT
	K P2	r	ATA AAA CTA AAA TAA AAA ACA TAT TTA CTT
	K P3	v n	GTT TAT ATG TTT GTT TGT TGA TTT TTT TTT
	K P4	r n	TTA CTT TTA ATT TAC CCC ATT ATC ACC CTA
	K P5	v	AGA TTT TTG TTT ATA TGT TTG TTT GTT GAT
	K P6	r	TCC CCC TCT TTT TAA AAA AAT TTT AAT AAA
	K P7	v n	ATA ATT GTT TTG TGA TTT TGA TAT ATT TTT
	K P8	r n	TAA AAA ACA TAT TTA CTT TTA ATT TTA CTT
	K P9	v	TTT TGA TGT TTT TGG AAG TTG TAT AAT AGA

	K P10	r	TAT CCT CAT ATA AAA AAA ATT AAA TCC ATA
	K P11	v n	TGA AAA TAT AAG GAA AAA ATT TTA GAA AGA
	K P12	r n	TTT TAC TCC CTC TTT CAT ATC TTT TAA CTT
	K P13	v	TTT AGT TTT TGA TGT TTT TGG AAG TTG TAT
	K P14	r	AAT ATC CTC ATA TAA AAA AAA TTA AAT CCA
	K P15	v n	AAT GAA AAT ATA AGG AAA AAA TTT TAG AAA
	K P16	r n	ACT ATT TTA CTC CCT CTT TCA TAT CTT TTA
HERV- W	W P1	v	TTA TAA ATT ATT TTA AGA ATT AAA TGG GGA
	W P2	r	CTC AAC AAA AAA ACC TAA ATA CTA TTA AAA
	W P3	v n	ATT TTT TGG TTA TTT TGT AAG ATT AAT TTA
	W P4	r n	AAA ATA CCT TTA ATA TCA TTA ACA TCA AAT
	W P5	v	TTA TTA TTT ATT GGA TTA GGT TTT TTT AAA
	W P6	r	ATA AAC AAC AAA ACA AAC CAT ATA AAA TAA
	W P7	v n	TTA AGT AGA TAG TTA GGG TTT GTG AAG TGT
	W P8	r n	ATA AAC AAC AAA ACA AAC CAT ATA AAA TAA
	W P9	v	TAT AAG GAA TTT ATT TTT GAG AAG AGG GAA
	W P10	r	TCC TCC AAA ACA ACT AAA ATT AAT CAT TTT
	W P11	v n	AAG AAT TAT TTT ATT TTT GTG ATA TGG TAT
	W P12	r n	TTA CAT ACA TAC AAA AAA TAA CAA AAT AAT
HIV- 1	HIV- 1 P1	v	TTT TTT TGG TTA GAT TAG ATT TGA GTT T
	HIV- 1 P2	r	ATA ATA ATC TAA ATT CTT CTA ATC CTA TCT
	HIV- 1 P3	v n	TTG TTT TGA GTG TTT TAA GTA GTG TGT GTT
	HIV- 1 P4	r n	ATC CCA ATA TTT ATC TAC AAC CTT CTA ATA
	HIV- 1 P5	v	TTT AAG AAT AGT TTT TGT TGT ATT TTT TAT
	HIV- 1 P6a	r	ACA TTA AAC AAA CTA ACA ACA CTA TTC TTT
	HIV- 1 P7	v n	AGT GAA TAG AGT TAG GTA GGG ATA TTT ATT
	HIV- 1 P8a	r n	AAT TCC TAA CTC CAA TAC TAT AAA AAA TTC
	HIV- 1 P5a	v	AAT ATT GGT GGA ATT TTT TAT AGT ATT
	HIV- 1 P6	r	ACA CAA ACA ACA TTA ATA ACT ACT ATA TTA
	HIV- 1 P7a	v n	AGT TAG GAA TTA AAG AAT AGT GTT GTT AGT
	HIV- 1 P8	r n	CTA CTT ATA ATT ACT CCA TAT TTT TCC AAA
	HIV- 1 P9	v	AGA AGA GGT TAA TAA AGG AGA GAA TAT TAG
	HIV- 1 P10	r	CAA ATC TAA TCT AAC CAA AAA AAC CCA ATA
	HIV- 1 P11	v n	TTT GTT ATA TTT TGT GAG TTT GTA TGG GAT
	HIV- 1 P12	r n	CAA ACA AAA AAC AAC TAC TTA TAT ACA AAA
	HXB2B P1	v	TGGAAGGGTTAATTTATTTT
	HXB2B P2	r	CACACTACTTAAAACACTCAAA
	HXB2B P3	v n	AAGATATTTTTGATTTGTGG
	HXB2B P4	r n	CTTAAACAATAAATTCCCTAAT
	HXB2B P9	v	GTATTTTGGATATAAGATAA
	HXB2B P10	r	TTAAAACACTTAACAATCT
	HXB2B P11	v n	GGATTAAAGGAATTTTTTAG
	HXB2B P12	r n	AATTACCTCTCTACATCATTATA
	HXB2B P13	v	TTATTAGAAGAGAGTTTTAG
	HXB2B P14	r	TTAACAAATATAAATCCTAC
	HXB2B P15	v n	GTTTGGGGTAGAGATAATAA
	HXB2B P16	r n	CCTATAACTTTATATCCACAAAT

Tabelle 5: Primer für Bisulfit- behandelte DNA.

v= Vorwärts- Primer; r= Rückwärts- Primer; n= Primer für verschachtelte PCR

3.6 DNA- Größenmarker

GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon- Rot

3.7 Enzyme

Restriktionsendonukleasen und Puffer

BglII (10U/µl): 5´- AGATCT- 3´	Fermentas, St. Leon- Rot

sonstige Enzyme

DNA *Blunting* Enzym	Fermentas, St. Leon- Rot
Phusion Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Proteinase K	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Ribonuklease A	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
T4 DNA- Ligase	Fermentas, St. Leon- Rot
Taq Polymerase	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Trypsin, 1:250	Gerbu, Wieblingen

3.8 Chemikalien

Agar	Serva, Heidelberg
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin- Natriumsalz	Gerbu, Wieblingen
Bacto- Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleosid- 5´- triphosphate	Promega, Madison, WI, USA
Dulbecco Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
1, 4- Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt	Apotheke Erlangen
Ethidiumbromid, 1%	Sigma, Aldrich, Taufkirchen
fötales Kälberserum (FKS)	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Geneticin (50mg/ml)	Gibco, Karlsruhe
Gentamycin- Sulfatsalz	Serva, Heidelberg
D- (+)- Glukose	Merck, Darmstadt
L- Glutamin	Merck, Darmstadt
Glycerol, 99,5%	Baker, Deventer, Niederlande
Glycerol, 100%	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Hefeextrakt	Serva, Heidelberg

H_2O_{Ampuwa}	Fresenius Kabi, Bad Homburg v. d. H.
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol (2- Propanol)	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalium- di- hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid- Dihydrat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Gerbu, Wieblingen
Magnesiumchlorid- Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid- Tetrahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
2- Mercaptoethanol (β- ME), 99%	Carl Roth, Karlsruhe
Minimum Essential Medium (MEM)	Life, Technologies
3- [N- Morpholino] - propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat, ultrarein (SDS)	MP Biomedicals, Aurora, OH, USA
di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin G- Natriumsalz	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Phenol	Biomol, Hamburg
Phenolrot	Merck, Darmstadt
Piperazin- 1,2- bis[2- ethansulfonsäure] (PIPES)	Merck, Darmstadt
Salzsäure, 25%	Merck, Darmstadt
Streptomycin- Sulfatsalz	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Tris- [hydroxymethyl] - aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma- Aldrich, Taufkirchen

3.9 Laborgeräte

Bakterienbrutschrank	Memmert, Schwabach
Bakterien- Inkubationsschüttler:	
Multitron 2	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
Stuart SI500	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Chromato- Vue Transilluminator C- 62	Ultra- Violet Products, San Gabriel, CA, USA
DNA- Sequenziermaschine:	
AbiPrism 3730 DNA Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Gel- Dokumentationssystem:	
Herolab E.A.S.Y. RHHeraeus, Düsseldorf	
Gelkammern:	
HU6	Carl Roth, Karlsruhe
HU10	Carl Roth, Karlsruhe
HU25	Carl Roth, Karlsruhe
DNA- Pocketblock	Biozym Scientific, Oldendorf
Handdispenser:	
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank:	
Privileg Super Energiesparer	Quelle, Fürth
Labor- pH- Meter:	
inoLab pH 720	WTW, Weilheim

Magnetrührer:	
RCT basic safety control IKAMAG	IKA- Werke, Staufen
Mehrkanalpipetten:	
8- Kanalpipette Research 300	Eppendorf, Hamburg
12- Kanalpipette Research 100	Eppendorf, Hamburg
12- Kanalpipette Research 300	Eppendorf, Hamburg
Membran- Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikroskop:	
Axovert 25	Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten- Lesegerät:	
Emax	MWG- Biotech, Ebersberg
Mikrowelle:	
M 720	Miele, Gütersloh
Netzgeräte:	
EPS 300	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
GPS 200/400	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Nukleofector II	Lonza, Köln
PCR- Maschinen/ Thermozykler:	
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler pro S	Eppendorf, Hamburg
Photometer:	
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA
Pipetten:	
0, 1- 2µl	Eppendorf, Hamburg
1- 10µl	Eppendorf, Hamburg
1- 20, 10- 200, 100- 1000µl	Gilson, Villiers- le- Bel, Frankreich
Pipettierhelfer:	
accu- jet- pro	Brand, Wertheim
Sterilbank Antair BSK 4	Anthos Mikrosysteme, Köln
Taumel- Schüttler 3011	GFL, Burgwedel
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank (-20°C):	
Öko super	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühltruhe (-80°C):	
Hera Freeze	Heraeus, Düsseldorf
Tischautoklav HRM- 242II	Becthai, Bangkok, Thailand
Tischzentrifugen:	
Uni- Fuge	Carl Roth, Karlsruhe
Mini Spin	Eppendorf, Hamburg
Biofuge Pico	Heraeus, Düsseldorf
5415 R	Eppendorf, Hamburg
Rotina 38 R	Hettich, Tuttlingen
Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen
Überkopfrotator 3025	GFL, Burgwedel
Vortexer:	
VF2	Janke& Kunkel, Staufen
Vortex Genie 2	Janke& Kunkel, Staufen
Waagen:	
Feinwaage 1801 004	Sartorius, Göttingen
Präzisionswaage 1507 004	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder:	

1012	GFL, Burgwedel
W22	Störk- Tronic, Stuttgart
Wasserfilteranlage Mill- Q^{UF} Plus	Millipore, Schwalbach
Zellinkubator Steri- Cult 200	Forma Scientific, Marietta, OH, USA
Zellzählgerät	
Z2 Coulter Particle Count and Size Analyser	Beckman/ Coulter, Fullerton, CA, USA

3.10 Labormaterialien

Combitip Plus: 0, 1, 0, 2, 10ml	Eppendorf, Hamburg
Cryogefäße, 1,8ml	VWR, Darmstadt
Gewebekulturplatte:	
6-, 12-, 24-, 48-, 96- Lochplatten, F- Form	Greiner Bio- One, Frickenhausen
Glaswaren	Schott, Mainz und Brand, Wertheim
Küvetten:	
Halb- Mikro- Küvette	Sarstedt, Nümbrecht
UVette	Eppendorf, Hamburg
Millidisk 10 Filtereinsatz: 0,1, 0,22µm	Millipore, Schwalbach
Parafilm M	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen:	
kristall 0,5- 10µl	Multimed Wicker, Kirchheim/ Teck
gelb 1-200µl	Sarstedt, Nümbrecht
blau 200- 1000µl	Ratiolab, Dreieich
10µl mit Filter	Peqlab, Erlangen
20µl mit Filter	Peqlab, Erlangen
200µl mit Filter	Nerbe Plus, Winsen/ Lube
1250µl mit Filter	Peqlab, Erlangen
Polypropylen- Röhrchen, 14ml	Greiner Bio- One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße:	
0,2ml	Biozym Scientific, Oldenburg
0,5ml	Carl Roth, Karlsruhe
1,5ml	Brand, Wertheim
1,5ml Schraubverschluß	Sarstedt, Nümbrecht
2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rotkappröhrchen, 15, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter: 0,2µm	Millipore, Schwalbach
Steri- Cup: 500ml, 0,22µm	Millipore, Schwalbach
Toppits Alu- und Frischhaltefolie	Melitta, Minden
Zahnstocher	Neoten, Salzgitter
Zellkulturflaschen Cellstar 25, 75cm^2 mit Filter	Greiner Bio- One, Frickenhausen
Zellschaber	Corning Incorporated, Corning, NY, USA

3.11 Kits und Reaktionssysteme

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon- Rot
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
MethylFlash™ Hydroxymethylated DNA Quantification Kit	Epigentek, Farmingdale, NY, USA

Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit	Epigentek, Farmingdale, NY, USA
MinElute® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Nukleofektor Kits	Lonza, Köln
PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Life Technologies, Darmstadt
QuickLyse Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden

3.12 Programme

CorelDRAW® 12	Corel Corporation, Ottawa, ON, Kanada
Microsoft® Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Vector NTI® Advance 11	Life Technologies, Darmstadt

IV. Methoden

4.1 Etablierung stabil transfizierter Zelllinien

4.1.1 Zellkultur

Die von einem menschlichen Kolon Karzinom stammende Zelllinie HCT- 116 wurde bei 37°C, 5% CO_2- Atmosphäre und 80% Luftfeuchtigkeit in Dulbecco´s modifizierten Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum, 350µg/ ml L-Glutamin, 120µg/ ml Streptomycin und 199U/ ml Penicillin nach Standardmethoden kultiviert.
Die adhärent wachsenden Zellen wurden passagiert, wenn die Zellen in einer Schicht den Boden vollständig bedeckten (Vollkonfluenz). Zur weiteren Kultivierung wurde die Zelllinie HCT- 116 1:4 geteilt. Nach etwa vier Tagen war die Vollkonfluenz bei HCT- 116 erreicht.

4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde ein Beckman/ Coulter „Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer“ verwendet. Zur Zellzahlbestimmung wurden 50µl Zellsuspension in einer 1:200 Verdünnung mit 0,9% NaCl eingesetzt.

4.1.3 Transfektion von HCT- 116 mit pEGFP- FMR1

HCT- 116 wurden mit dem linearisierten pEGFP- FMR1 durch Nucleofection® transfiziert. Dazu wurden HCT- 116 geerntet und ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung genutzt. 1x 10^6 Zellen pro Nucleofections- Ansatz wurden 90x g 10min. lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100µl Nucleofector Lösung (Nucleofector Lösung V für HCT- 116) resuspendiert und mit 2µg Plasmid- DNA gemischt. Der Ansatz wurde Luftblasenfrei in eine Küvette pipettiert, mit einem Deckel verschlossen, in den Nucleofector® gestellt und entsprechend dem eingestellten Programm (HCT: D- 32) elektroporiert. Die transfizierten Zellen wurden in 25cm^2 mit vorgewärmtem Medium überführt und nach Standardmethoden kultiviert.

4.1.4 Selektion von Eukaryotischen Zellen

Um die Selektionsbedingungen für die stabil transfizierten Zelllinien zu bestimmen, wurden HCT- 116 mit verschiedenen Konzentrationen von Geneticin (G418) 14 Tage lang inkubiert. Alle 3 Tage wurden die Zellen mit dem entsprechenden Selektionsmedium gefüttert und auf Überlebende kontrolliert. Für HCT- 116 wurde eine G418 Konzentration 150µg/ml bestimmt.

4.1.5 Einzelzellklonierung

Für die Einzelzellklonierung wurden die Vertiefungen einer 96- Loch- Platte bis auf Nummer A1 mit jeweils 100µl Zellkulturmedium mit der entsprechenden Geneticin- Konzentration befüllt. Die transfizierten Zellen wurden geerntet und ein Aliquot im Zellzählgerät vermessen. Um Einzelzellklone hoch zu ziehen, wurden 2000 Zellen in 200µl Zellkulturmedium aufgenommen und in die Vertiefung A1 pipettiert. Aus dieser wurden 100µl in die nächste Vertiefung B1pipettiert und vorsichtig gemischt. Mit derselben Pipettenspitze wurde wiederum 100µl aus B1 entnommen, in die Vertiefung C1 überführt und gemischt. Die Schritte wurden wiederholt bis die Vertiefung H1 erreicht wurde. Hier wurde die 100µl Suspension nach dem Mischen verworfen. Um ein Endvolumen von 200µl pro Vertiefung zu erreichen, wurde mit einer Acht- Kanal- Pipette 100µl Medium mit Geneticin dazugegeben. Mit der Acht- Kanal- Pipette wurden 100µl der ersten Verdünnungsreihe (A1- H1) in die zweite Reihe (A2- H2) überführt und vorsichtig gemischt. Diese Schritte wurden solange wiederholt bis die 12. Vertiefungsreihe (A12- H12) erreicht wurde. In der letzten Reihe wurde die 100µl Suspension verworfen und die einzelnen Vertiefungen der 96- Loch- Platte mit 100µl Zellkulturmedium mit Geneticin befüllt, um ein Endvolumen von 200µl pro Vertiefung zu erhalten. Die Platten inkubierten bei 37°C, 5% CO_2 und 80% Luftfeuchtigkeit im Zellinkubator. Die einzeln gewachsenen Zellklone wurden zunächst in eine 48- Loch- Platte, dann 24-, 12-, 6- Loch- Platte und schließlich in 25 cm^2 Zellkulturflaschen umgesetzt.

4.1.6 Isolierung genomischer DNA aus Einzelzellklonen

Um genomische DNA aus den Einzellklonen zu extrahieren, wurden die Zellen mit Trypsin von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst und 5 min. lang bei 2500x rpm (Rotina 38R), 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, die Zellen mit PBSo gewaschen und das Zellpellet in Lysispuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte erst ein RNase A- Verdau bei 37°C, 1h lang und dann ein Proteinase K- Verdau bei 45°C mindestens 5 h lang.
Die genomische DNA wurde durch Phenol/ Chloroform Extraktion aufgereinigt. Dies erfolgte in zwei Schritten: 1. Zugabe zu einem Volumen Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25: 24: 1)
2. Zugabe zu einem Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24: 1)
Nach jedem Schritt wurde das Gemisch in einem Überkopfrotator 10 min. lang invertiert und anschließend in der Tischzentrifuge bei Raumtemperatur mit maximaler Geschwindigkeit 2 min. lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren zwei Phasen erkennbar, die obere wässrige Phase wurde vorsichtig entnommen und weiter verwendet. Die untere phenolische Phase wurde verworfen.
Die zuletzt abgenommene wässrige Phase wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1/ 10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,2 versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde bis 2ml mit absolutem Ethanol aufgefüllt. Die Fällung der DNA erfolgte 1h lang bei -80°C. Anschließend wurde die DNA bei 4°C 30 min. lang mit maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit 70% Ethanol gewaschen und der Überstand erneut verworfen.
Die DNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in TE- Puffer pH 8,0 gelöst und bei 4°C gelagert.

4.2 RNA- Isolierung aus Einzelzellklonen

RNA aus Einzelzellklonen wurde durch das RNeasy® Mini Kit von Qiagen nach Hersteller-Protokoll isoliert.

4.3 Bestimmung von Methylierungsmustern

4.3.1 Bisulfit- Konversion genomischer DNA (41)

Die genomische DNA wurde mit Hilfe des „EpiTect Bisulfite Kit“ der Firma Qiagen konvertiert.
Für eine Reaktion wurden 1 bis 2µg DNA eingesetzt. Der genaue Reaktionsansatz ist in Tabelle 6 aufgeführt. Die Konversionsreaktion erfolgte fünf Stunden lang in der PCR- Maschine, danach wurde die einzelsträngige DNA auf eine Säule gebunden, gewaschen, desulfoniert, nochmals gewaschen, eluiert und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Reaktionsansatz		Programm		
20µl	DNA-Lösung	99°C	5 min.	Denaturierung
85µl	Bisulfit- Mix	60°C	25 min.	Inkubation
35µl	Konversions-Puffer	99°C	5 min.	Denaturierung
140µl	Gesamt-Volumen	60°C	85 min.	Inkubation
		99°C	5 min.	Denaturierung
		60°C	175 min.	Inkubation
		20°C	∞	Halten

Tabelle 6: Reaktionsansatz und Programm für die Bisulfit- Konversion

4.3.2 Polymerase- Kettenreaktion (PCR) Bisulfit- behandelter DNA (130)

Um die Spezifität und die Ausbeute der PCR zu erhöhen, wurden verschachtelte (engl. nested) PCRs durchgeführt. Dabei wurden zwei Primerpaare verwendet, wobei das zweite Paar im Amplikon des ersten Primerpaares lag. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die optimale Primer- Anlagerungstemperatur wurde durch Gradienten- PCR für jedes äußere und innere Primerpaar ermittelt. Die drei verwendeten Gradienten mit ihren Temperaturen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die PCR mit dem inneren Primerpaar wurde unter denselben Bedingungen mit 1/10 des Reaktionsvolumens der ersten PCR durchgeführt.

40 ± 10°C	50 ± 10°C	60 ± 10°C
30,6°C	40,3°C	50°C
31,1°C	40,8°C	50,5°C
32,4°C	42,1°C	51,8°C
34,3°C	44,0°C	53,8°C
36,6°C	46,4°C	56,1°C
39,2°C	49,0°C	58,8°C
41,9°C	51,7°C	61,5°C
44,5°C	54,3°C	64,1°C
46,9°C	56,7°C	66,5°C
48,7°C	58,5°C	68,3°C
49,9°C	59,7°C	69,5°C
50,3°C	60,1°C	69,8°C

Tabelle 7: Temperaturverteilung der Gradienten 40 ± 10°C, 50 ± 10°C und 60 ± 10°C Analytische PCR

Zum Amplifizieren der Bisulfit- behandelten DNA wurde die *Taq*- Polymerase verwendet. Der genaue Reaktionsansatz ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Reaktionsansatz			Programm		
	Ausgangskonz.	Endkonz.	95°C	5 min.	Initiale Denaturierung
2,5µl	10x PCR- Puffer	1x	95°C	2 min.	Denaturierung
2µl	25mM $MgCl_2$	2mM	°C	2 min.	Anlagerung
0,5µl	10mM dNTPs	200µM	72°C	2 min.	Elongation
0,4µl	5U/µl *Taq*	0,08U/µl		45 Zyklen	
2µl	DNA		72°C	7 min.	Finale Elongation
0,5µl	10µM Primer v	0,2µM	4°C	∞	Halten
0,5µl	10µM Primer r	0,2µM			
16,6µl	H_2O_{Ampuwa}				
25µl	gesamt				

Tabelle 8: Reaktionsansatz und Programm zum amplifizieren Bisulfit- konvertierter DNA

Zum Amplifizieren von normaler DNA wurde die *Phusion*- Polymerase verwendet. Der genaue Reaktionsansatz ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Reaktionsansatz			Programm		
	Ausgangskonz.	Endkonz.	98°C	30 s	Initiale Denaturierung
5µl	5x HF- Puffer	1x	98°C	10 s	Denaturierung
0,5µl	50mM $MgCl_2$	1mM	°C	30 s	Anlagerung
0,5µl	10mM dNTPs	200µM	72°C	30 s	Elongation
0,25µl	2U/µl *Phusion*	0,02U/µl		35 Zyklen	
2µl	DNA		72°C	7 min.	Finale Elongation
0,5µl	10µM Primer v	0,2µM	4°C	∞	Halten
0,5µl	10µM Primer r	0,2µM			
15,75µl	H_2O_{Ampuwa}				
25µl	gesamt				

Tabelle 9: Reaktionsansatz und Programm zum Amplifizieren von normaler DNA

4.3.3 Präparative PCR

Um eine höhere Ausbeute zu erhalten, wurde die verschachtelte PCR jedes PCR- Fragments nochmal in einem Gesamtvolumen von 150µl unter denselben Bedingungen wir die analytische PCR durchgeführt.

4.3.4 Agarose- Gelelektrophorese

Die PCR- Fragmente wurden mit 6x DNA- Ladepuffer versetzt und in einem 1,3% Agarosegel durch Anlegen eines elektrischen Feldes bei 400mA und 100V 30 min. lang aufgetrennt. Als Gelelektrophoresepuffer wurde 1x TBE verwendet. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden 3µl des DNA- Größenmarkers „ GeneRuler DNA Ladder Mix“ der Firma Fermentas aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt und unter kurzwelligem UV- Licht visualisiert.

4.3.5 Gelaufreinigung der PCR- Fragmente

Die PCR- Fragmente wurden mit dem „MinElute® Gel Extraction Kit“ von Qiagen extrahiert und aufgereinigt. Unter langwelligen UV- Licht wurden die PCR- Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in einer Lösung chaotropischer Salze unter Verwendung von Hitze aufgelöst und anschließend auf eine Säule gegeben. Die DNA wurde dabei an eine Glasfaser- Membran gebunden und Kontaminationen wie Salze, Agarose und Proteine wurden weggewaschen. Die aufgereinigten PCR- Fragmente wurden in Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

4.3.6 Klonierung

Herstellung chemisch kompetenter DH5α (131):

100µl von chemisch kompetenten DH5α wurden in 400ml SOB- Medium mit frisch dazugegebenen 4ml 1M $MgSO_4$ und 4ml 1M $MgCl_2$ überführt. Die Bakterienkultur wurde bei 18°C und 200 rpm 48h lang geschüttelt. Bei einer OD_{600} von 0,3 wurden die Bakterien geerntet. Dazu wurde die Bakterienkultur in 50ml Rotkappröhrchen überführt, 10 min. lang im Eis- Ethanolbad gekühlt und dann bei 2500x g und 0°C 3 min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Zellpellets in insgesamt 50ml eiskalten Inouepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien wieder bei 2500x g und 0°C 3 min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren vollständig entfernt und die Zellpellets in 2,5ml Inouepuffer mit 187,5µl DMSO resuspendiert. Die chemisch kompetenten DH5α wurden zu 50µl Portionen aliquotiert, in einem Eis- Ethanolbad vorgekühlt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien wurden bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Bestimmung der Transformationseffizenz:

Die Transformationseffizenz wurde durch Transformation mit 10pg pcDNA3.1(+) Plasmid- DNA unter Verwendung folgender Formel bestimmt.

$$\frac{\text{Transformationseffizenz}}{\mu g} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien x } 10^6 \text{ pg}}{\text{Menge der transformierten DNA [pg]}} \times \frac{\text{Volumen}^{\text{transformiert}}}{\text{Volumen}^{\text{ausplattiert}}}$$

Ligation der PCR- Fragmente in den pJET1.2/blunt Vektor

Die aufgereinigten PCR- Fragmente wurden mit dem „ CloneJET™ PCR Cloning Kit“ von Fermentas in den Vektor pJET1.2/blunt ligiert. Für PCR- Fragmente, die mit der *Taq*- Polymerase amplifiziert wurden, ist das „sticky end“ Protokoll verwendet worden, da diese Polymerase 3´Adenin- Überhänge an das PCR- Produkt anhängt. PCR- Fragmente, die durch die *Phusion*- Polymerase generiert wurden, sind mit Hilfe des „blunt end“ Protokolls in den Vektor ligiert worden. In Tabelle 10 sind beide Protokolle aufgeführt.

„sticky- end“ Protokoll		„blunt- end“ Protokoll	
„Blunting“ Reaktion			
10µl	2x Ligations- Puffer	10µl	2x Ligations- Puffer
2µl	PCR- Fragment	2µl	PCR- Fragment
5µl	$H_2O_{Nuklease- frei}$	5µl	$H_2O_{Nuklease- frei}$
1µl	DNA *Blunting* Enzym	1µl	pJET1.2/blunt Vektor
2µl	*T4* DNA- Ligase	1µl	*T4* DNA- Ligase
18µl	gesamt	20µl	gesamt
Inkubation bei 70°C 5 min. lang, danach kurz auf Eis stellen			
1µl	pJET1.2/blunt Vektor		
1µl	*T4* DNA- Ligase		
20µl	gesamt		
Ligationsreaktion 30 min. lang bei Raumtemperatur			

Tabelle 10: „sticky- end“ und „blunt- end“ Protokoll der Ligationsreaktion

Transformation in chemisch kompetente DH5α (131)

Zu 50µl frisch auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten DH5α wurden 1µl 100mM EDTA zugegeben und 5 min. lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 1µl 1,22M β-Mercaptoethanol (25mM Endkonzentration) und 2,25M DTT (44mM Endkonzentration) dazugegeben und 10 min. lang auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die DNA vorbereitet. Dazu wurden 1,5µl Ligationsansatz mit je 1µl 0,5M $CaCl_2$ und 0,5M $MgCl_2$ gemischt. Nach Inkubationsende wurden die vorbereiteten Bakterien in vorgekühlte Polypropylen- Röhrchen (-20°C) überführt und mit der DNA gemischt. Nach 30 min. Inkubation auf Eis erfolgte 1 min. lang bei 42°C ein Hitzeschock. Die Bakterien wurden sofort danach auf Eis gestellt. Nach 5 min. wurde 950µl vorgewärmtes NZY^+- Medium zu den Bakterien gegeben. Die Regenerationsphase erfolgte 1h lang im 37°C Wasserbad.
Anschließend wurden die Bakterien bei 4000x rpm (Rotina 38R) und 37°C, 5 min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 200µl NZY^+- Medium resuspendiert. Der komplette Ansatz wurde auf eine vorgewärmte LM- Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert.

4.3.7 Plasmid- DNA Minipräparation

Die Bakterienklone wurden mit autoklavierten Zahnstochern von LM- Agarplatten abgehoben und in 15 ml Rotkappröhrchen mit 3 ml LB- Medium (50µg/ml Ampicillin) überführt. Die Bakterienkulturen schüttelten über Nacht bei 37°C und 250x rpm im Bakterienschüttler. Die Plasmid- DNA wurde durch das „QuickLyse Miniprep Kit“ von Qiagen isoliert. Dazu wurden die Bakterienkulturen zunächst bei maximaler Geschwindigkeit 1 min. lang sedimentiert. Der

Überstand wurde verworfen, die Bakterien lysiert und auf eine Säule gegeben. Die Plasmid- DNA wurde an eine Membran gebunden und nach einem Waschschritt mit einer Isopropanol- haltigen Lösung mit Wasser eluiert. Die Plasmid- DNA wurde bei -20°C gelagert.

4.3.8 Restriktionsanalyse

Um positive Klone zu identifizieren wurde die isolierte Plasmid- DNA mit der Restriktionsendonuklease *BglII* (5´- AGATCT- 3´) geschnitten. Die analytische Restriktionsspaltung wurde 1,5h lang im 37°C warmen Wasserbad inkubiert, anschließend mit 2µl 6x DNA- Ladepuffer versetzt und auf ein 1,3% Agarosegel (w/) aufgetragen. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolge 30 min. lang bei 400mA und 90V.

Restriktionsansatz	
2µl	Plasmid- DNA
1µl	10x Puffer O Orange
0,2µl	*BglII*
6,8µl	H_2O_{Ampuwa}
8µl	gesamt

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die analytische Restriktionsspaltung mit *BglII*

4.3.9 Sequenzierung und Auswertung

Alle positiv getesteten Bakterienklone wurden nach der Didesoxy- Kettenabbruchmethode (132) mit Fluorochrom- markierten ddNTPS mit dem „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ von Applied Biosystems sequenziert. Die Ansätze wurden durch Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik, Universitätsklinikum Erlangen aufgereinigt und im „AbiPrism 3730 DNA Analyser“ von Applied Biosystems sequenziert.

Reaktionsansatz			Programm		
	Ausgangskonz.	Endkonz.	96°C	3 min.	Initiale Denaturierung
2µl	5x Sequenzier-Puffer	1x	96°C	10 s	Denaturierung
0,6µl	10µM pJET1.2/blunt reverse	0,5µM	50°C	15 s	Anlagerung
0,5µl	BigDye v3.1 Mix		60°C	4 min.	Elongation
4,9µl	H_2O_{Ampuwa}			25 Zyklen	
2µl	DNA		60°C	5 min.	Finale Elongation
10µl	gesamt		4°C	∞	Halten

Tabelle 12: Reaktionsansatz und PCR- Programm der Sequenzierung

Die Daten der Sequenzierung wurden mit Hilfe des Programms „Vector NTI® Advance 12“ von Life Technologies ausgewertet.
Bei der Bisulfit- Konversion wurden alle unmethylierten Cytosine zunächst in Uracil- Reste und nach der PCR in Thymin- Reste umgewandelt. Alle methylierten Cytosine waren für diese Konvertierungsreaktion unempfindlich und wiesen in der Sequenz auf 5- Methylcytosin hin, weil alle nicht- methylierten Cytosine in und außerhalb von CpG- Folgen zu Thymin umgewandelt wurden und somit nicht mehr in der Auswertung zu erkennen waren.
Für die DNA- Methylierungsmuster wurden nur Moleküle verwendet, die über 95% aller Cytosine außerhalb von CpG- Folgen zu Thymin konvertiert wurden, im Vergleich zu der Originalsequenz der DNA- Fragmente.

4.4 Quantifizierung der Gesamt- Methylierung

Um die globale Methylierung in Einzelzellklonen mit stabil integrierter Plasmid- DNA zu untersuchen, wurde das „Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit“ von Epigentek verwendet. Dazu wurde die genomische DNA auf Mikrotiter- Streifen gebunden. Die methylierte DNA wurde durch einen 5- Methylcytosin- Antikörper nachgewiesen und in einer ELISA- ähnlichen Reaktion mit einem Mikrotiterplatten- Lesegerät quantifiziert. Die Menge der methylierten DNA war proportional zur Stärke der OD_{450}.

4.5 Quantifizierung von 5- Hydroxymethylcytosin

Für die Quantifizierung von 5- Hydroxymethylcytosin in HIV- 1 Patienten wurde das „MethylFlash™ Hydroxymethylated DNA Quantification Kit (Colorimetric)“ von Epigentek verwendet. Bei dieser Methode wurde genomische DNA an Mikrotiter- Streifen gebunden und hydroxymethylierte DNA mit einem Capture- und einem Detektions- Antikörper nachgewiesen und in einem Mikrotiterplatten- Lesegerät quantifiziert. Die Menge von hydroxymethylierter DNA war dabei proportional zur Stärke der OD_{450}.

V. Ergebnisse

5.1 Veränderungen im Methylierungsmuster nach Integration von fremder DNA in Retroelementen im menschlichen Genom

5.1.1 Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie

Zur Klärung der Frage, ob es zu Veränderungen im menschlichen Genom nach Integration von Fremd- DNA kommt, wurde als Modell in die DNA der menschlichen Tumorzelllinie HCT- 116 das Plasmid pEGFP- FMR1 stabil integriert. HCT- 116 ist eine männliche Zelllinie eines Kolorektalkarzinoms. Das Plasmid trägt zur Selektion von stabil transfizierten Zellen eine Kanamycin/ Neomycin (Geneticin) Resistenz. Geneticin hemmt die Proteinbiosynthese von Eukaryonten, indem es an die 80S- Ribosomen ankoppelt und Ablesefehler der tRNA verursacht. Stabile Zellen, die ein Neomycin/ Geneticin- Resistenzgen tragen, das für die Neomycin-Phosphotransferase codiert, können das Antibiotikum inaktivieren. Für die Vermehrung in Bakterien besitzt das Plasmid einen bakteriellen Replikationsursprung (pUC- Plasmid-Replikationsursprung) und ein Kanamycin- Resistenzgen. Das Plasmid trägt das erste Exon des menschlichen *FMR1* (engl.: fragile X mental retardation 1) Gen mit einem Teil der 5´nicht translatierten Region mit einer $(CGG)_n$- Repetition.

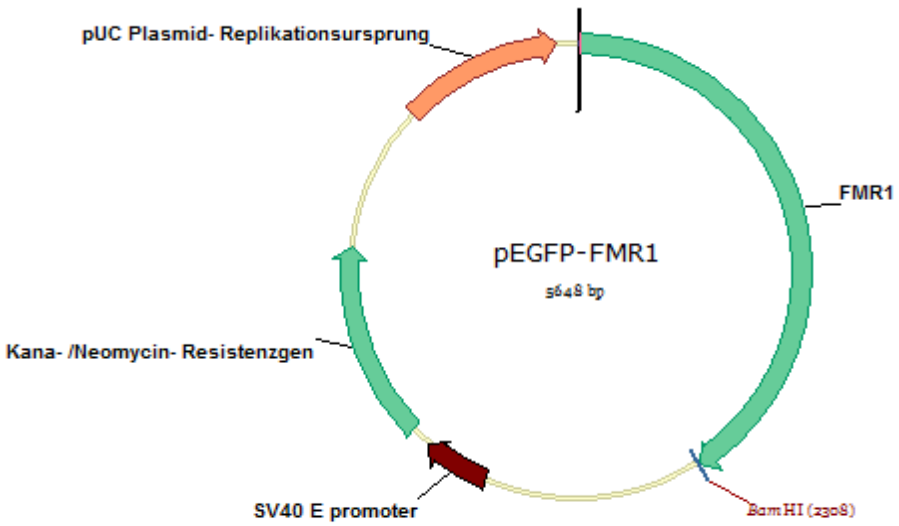

Abbildung 8: Vektorkarte des Plasmids pEGFP- FMR1 mit *BamHI*- Schnittstelle

Um eine stabile Transfektion zu erreichen, wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *BamHI* linearisiert. *BamHI* schneidet den Vektor in einem Bereich, in dem sich kein essentieller Genabschnitt befindet. Die Überprüfung der Linearisierung erfolgte auf einem Agarosegel. Anschließend wurde das Plasmid durch Phenol/ Chloroform aufgereinigt. Die HCT- 116 Zellen wurden mit dem aufgereinigten Plasmid inkubiert und, für das Einschleusen der Fremd- DNA,

elektroporiert. Nur transfizierte Zellen mit der Geneticin- Resistenz konnten unter Selektionsbedingungen überleben. Die transfizierten Zellen wurden unter Standardbedingung mit Zugabe von Geneticin zunächst in Massenkultur kultiviert. Um eine stabile Zelllinie zu erhalten, die aus einem Zellklon hervorgegangen ist, wurden transfizierten Zellen durch serielle Verdünnung zu Einzelzellklonen vereinzelt.
Als Kontrolle für den ursprünglichen DNA- Methylierungsstatus wurden HCT- 116 Zellen ebenfalls durch serielle Verdünnung zu Einzelzellklonen unter Standardbedingungen ohne Zugabe von Geneticin kultiviert.

5.1.2 Kontrolle der genomischen Integration

Der Einbau des linearisierten Plasmids pEGFP- FMR1 in die Tumorzelllinie HCT- 116 wurde durch Amplifikation eines Teils des Kanamycin- Gens kontrolliert, weil Kanamycin in menschlicher DNA nicht vorkommt. Hierzu wurde genomische DNA aus den Einzelzellklonen isoliert und eine PCR mit den Primerpaar Kan.pEGFP 5´ und Kan.pEGFP 3´ durchgeführt. Es wird eine spezifische Bande bei 800bp erwartet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

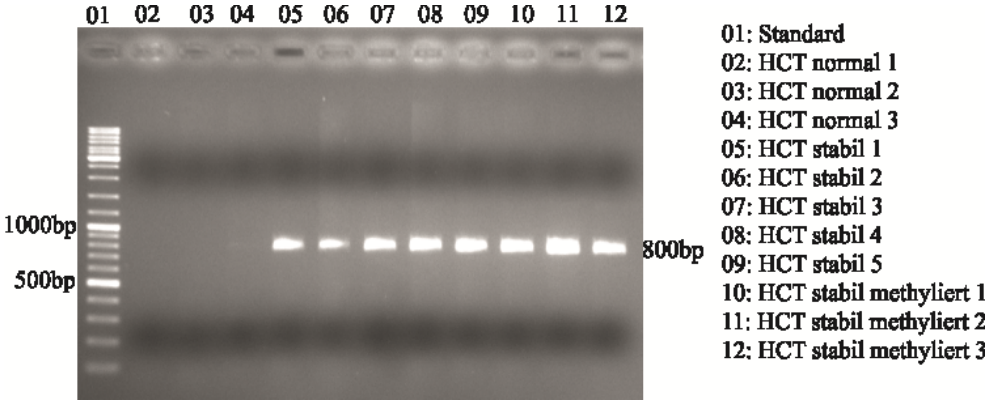

Abbildung 9: PCR mit genomischer DNA isoliert aus Einzelzellklonen mit und ohne integriertes Plasmid

Die erste Spur zeigt den Standard (GeneRuler DNA Ladder Mix). In den Spuren zwei bis vier sind, wie erwartet, keine Amplifikationsprodukte aus der PCR mit der isolierten genomischen DNA aus drei Einzelzellklonen ohne transfiziertes Plasmid zu sehen, die als Kontrolle für den Originalzustand der DNA- Methylierung in den einzelnen Retroelementen dienen. In den Spuren fünf bis neun sind die PCR- Produkte aus der genomischen DNA der Einzelzellklone mit stabil integrierten Plasmid aufgetragen. Es zeigte sich die erwartete spezifische Bande bei 800bp für die Amplifikation eines Teils des im Plasmid vorhandenen Kanamycin- Gens.
In meiner Diplomarbeit (133) habe ich zusätzlich noch HCT- 116 Zellen mit, *in vitro* durch die *SssI*- Methylase (CpG- Methylase), methyliertes und linearisiertes Plasmid pEGFP- FMR1 transfiziert. Aus drei Einzelzellklonen wurde ebenso genomische DNA isoliert und diese auf eine erfolgreiche Integration kontrolliert. Das Ergebnis ist in den Spuren 10 bis 12 zu sehen. Auch hier ist die spezifische Bande der Kanamycin- PCR von 800bp zu sehen. Durch dieses Experiment konnte die Persistenz des Plasmids pEGFP- FMR1 in HCT- 116 Einzelzellklonen eindeutig nachgewiesen werden. Eine weitere Gewährleistung der Integration des Plasmids in die Zellen ist

der Selektionsdruck durch Geneticin im Zellkulturmedium. Dadurch konnten nur diejenigen Zellen überleben, die über ein stabil integriertes Plasmid mit dem Geneticin- Resistenzgen verfügen.

5.1.3 Analyse von DNA- Methylierungsmustern

Für die Erstellung von Methylierungsmustern wurde genomische DNA aus den Einzelzellklonen mit und ohne stabil transfiziertes Plasmid isoliert und durch Bisulfit- Konversion analysiert. Bei der Bisulfit- Behandlung werden alle nicht methylierten Cytosine zu Uracil und nach der sich anschließenden PCR in Thymin umgewandelt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass alle CpG- Folgen von einzelnen klonierten und sequenzierten DNA- Molekülen auf ihren Methylierungszustand untersucht werden können. Bei der Verwendung von Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen hingegen können nur solche CpG- Dinukleotide analysiert werden, die in der Erkennungssequenz liegen. Für die Bisulfit- Behandlung der DNA wurde das „EpiTect Bisulfite Kit“ von Qiagen verwendet. Um die Ausbeute und die Spezifität der PCR zu erhöhen, wurden für jedes PCR- Fragment zwei Primerpaare verwendet, dabei lag das zweite Primerpaar im Amplikon des ersten Paares (verschachtelte PCR). Die Sequenzen der Oligodesoxyribonukleotid-Primer sind in Tabelle fünf angegeben. Die amplifizierten PCR- Fragmente wurden anschließend kloniert und sequenziert.

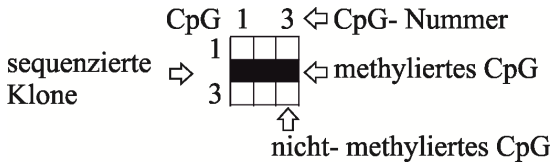

Abbildung 10: Nomenklatur Methylierungsmuster

In Abbildung 10 ist ein Beispiel für die Darstellungsweise der DNA- Methylierungsmuster dargestellt. Schwarze Quadrate stellen methylierte CpG- Folgen und weiße Quadrate nicht-methylierte CpG- Folgen dar. Jede Zeile repräsentiert ein einzelnes sequenziertes DNA- Molekül aus einem Einzelzellklon. Die CpG- Paare in den Methylierungsmustern sind komprimiert, so dass sie nebeneinander liegen. Die Positionen im korrekten Maßstab werden durch eine Karte mit den analysierten CpG- Folgen zu jedem untersuchten Retroelement gezeigt.

5.1.4 Kontrollexperimente

Zur Kontrolle wurde genomische DNA aus Einzelzellklonen ohne transfiziertes Plasmid isoliert und wie die Einzelzellklone mit stabil integrierter Fremd- DNA Bisulfit konvertiert. Für die Erstellung der DNA- Methylierungsmuster wurden auch nur die klonierten und sequenzierten DNA- Moleküle verwendet, in denen über 95% aller Cytosine außerhalb von CpG- Folgen zu Thymin umgewandelt wurden, verglichen mit den DNA- Fragmenten vor der Bisulfit- Konversion. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden für jedes DNA- Fragment mindestens zwei Klone sequenziert und ausgewertet.

Keine Veränderungen der DNA- Methylierung in Retroelementen nach Integration fremder DNA in das Genom von menschlichen Zellen

5.1.5 HERV- K (HML- 2.HOM): Methylierungsmuster von nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklone

Das HERV- K besitzt als einziges humanes endogenes Retrovirus einen offenen Leserahmen für alle retroviralen Gene. Nur aufgrund einer Punktmutation in der reversen Transkriptase- Domäne der viralen Polymerase ist das Retrovirus inaktiv(134). Für die Untersuchung der Methylierungsmuster wurden drei Bereiche, in denen gehäuft CpG- Dinukleotide auftraten, untersucht.

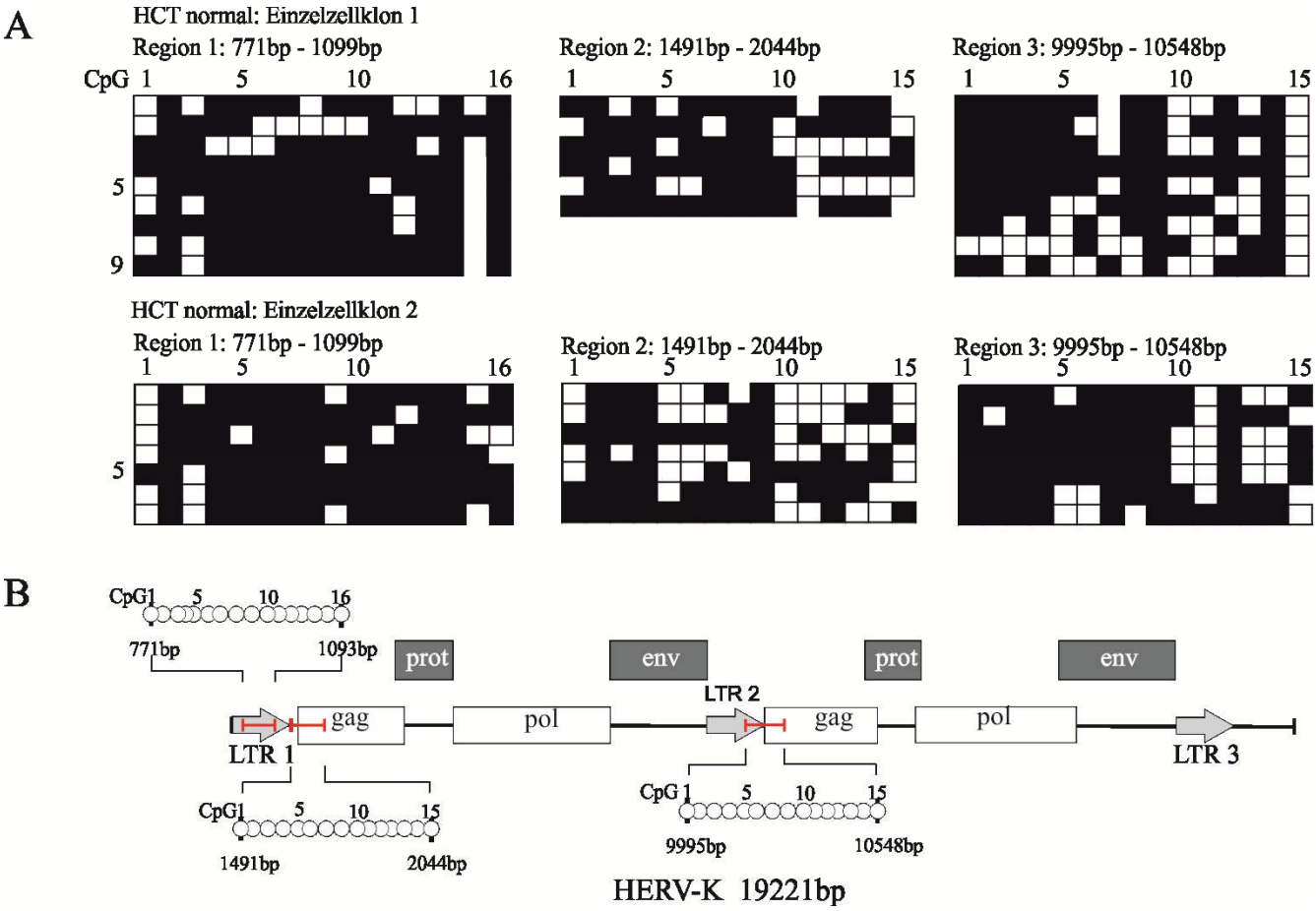

Abbildung 11: HERV- K: Methylierungsmuster von nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

A) Methylierungsmuster der drei Regionen von zwei Kontroll- Einzelzellklonen

B) Karte des HERV- K (AF074086) mit den untersuchten Bereichen; *Gag* kodiert für Strukturproteine, *pol* kodiert für virale Enzyme wie die reverse Transkriptase und *env* kodiert für Oberflächenproteine. Die Regionen für die Untersuchung des Methylierungsstatus der CpG- Dinukleotide (als Kreise dargestellt) sind mit roten Balken markiert.

In Abbildung 11A sind die Methylierungsmuster von zwei nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen (HCT normal) dargestellt, die als Kontrollen für den DNA- Methylierungsstatus vor der Integration fremder DNA dienten. In der ersten analysierten Region (771- 1099bp) befanden

sich 16 CpG- Dinukleotide. Im Einzelzellklon 1 waren 112 von insgesamt 137 analysierten CpG- Folgen methyliert. Das CpG 15 ist im ersten Einzelzellklon nur in zwei der neun analysierten DNA- Molekülen präsent. Bei der Auswertung der Bisulfit- behandelten DNA war statt des erwarteten CpG ein TpA- Dinukleotid zu erkennen. Im zweiten Einzelzellklon waren 91 von den insgesamt 110 untersuchten CpG- Folgen methyliert. Die zweite analysierte Region (1491- 2044bp) umfasste 15 CpG- Folgen. Im ersten Einzelzellklon waren von den insgesamt 84 analysierten CpG- Folgen 64 methyliert. Im zweiten Einzelzellklon waren 62 von den insgesamt 102 untersuchten CpG- Folgen methyliert. Die dritte untersuchte Region (9995- 10548bp) beinhaltete 15 CpG- Folgen. Im Einzelzellklon 1 waren von insgesamt 129 CpG- Folgen 86 methyliert. Und im Einzelzellklon 2 waren 77 von insgesamt 100 analysierten CpG- Folgen methyliert.

5.1.6 HERV- K (HML- 2.HOM): Methylierungsmuster von stabil- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

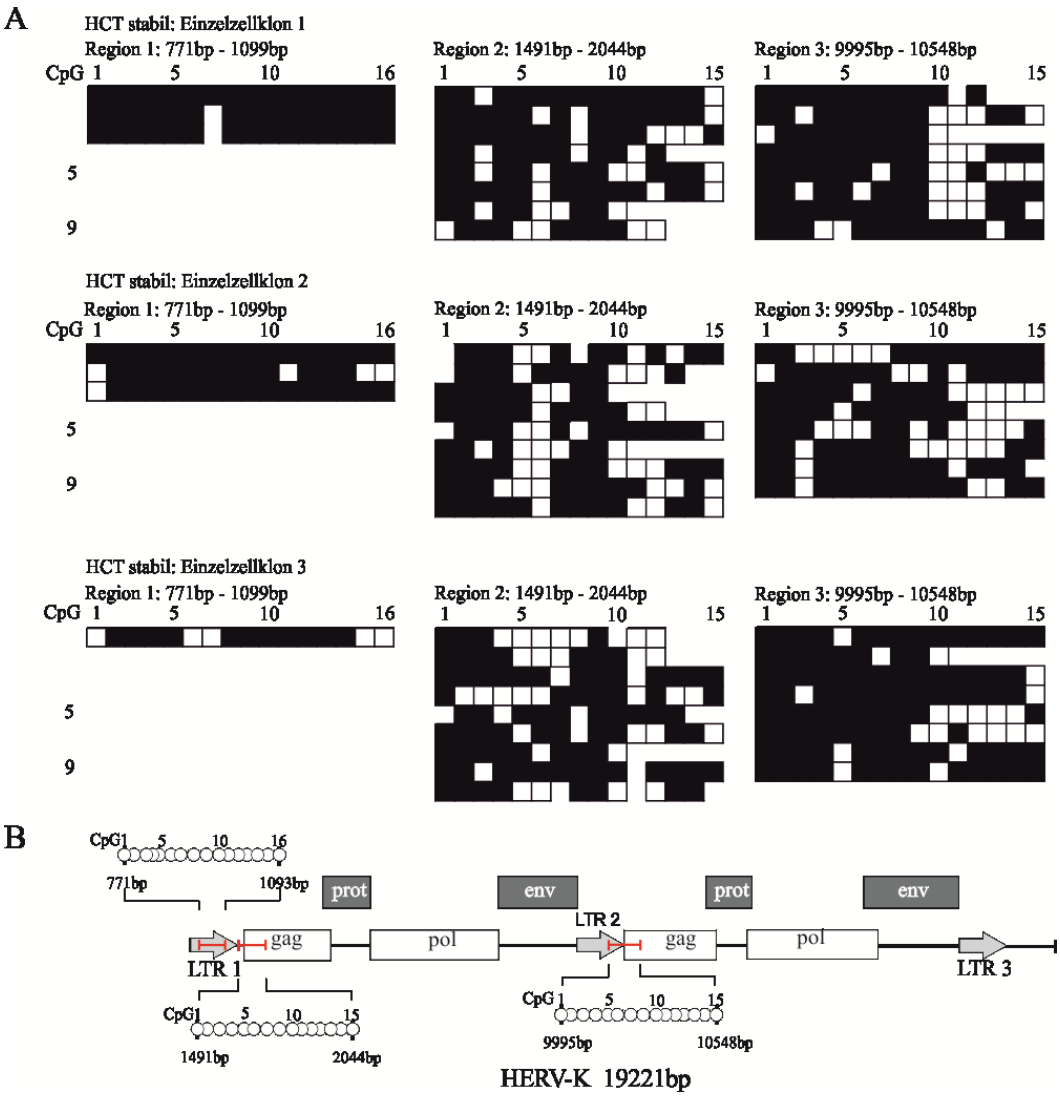

Abbildung 12: HERV- K: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

A) Methylierungsmuster der drei Regionen von drei Einzelzellklonen

B) Karte des HERV- K (AF074086) mit den untersuchten Bereichen (rote Balken) und den analysierten CpG- Folgen

In Abbildung 12A sind die Methylierungsmuster von drei stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen (HCT stabil) dargestellt. Im Einzelzellklon 1 waren alle der 46 analysierten CpG- Folgen methyliert. Das CpG 7 ist im ersten Einzelzellklon nur in zwei der drei analysierten DNA- Molekülen präsent. Bei der Auswertung der Bisulfit- behandelte DNA war statt des erwarteten CpG ein TpA- Dinukleotid zu erkennen. Im zweiten Einzelzellklon waren 43 von den insgesamt 48 untersuchten CpG- Folgen methyliert und im dritten Einzelzellklon waren 11 der 16 untersuchten CpG- Folgen methyliert. Die zweite analysierte Region (1491- 2044bp) umfasste 15 CpG- Folgen. Im ersten Einzelzellklon waren von den insgesamt 107 analysierten CpG- Folgen 80 methyliert. Im zweiten Einzelzellklon waren 78 von den insgesamt 114 untersuchten CpG- Folgen methyliert und der dritte Einzelzellklon hatte von den insgesamt 114 analysierten CpG- Folgen 82 methyliert. Die dritte untersuchte Region (9995- 10548bp) beinhaltete 15 CpG- Folgen. Im Einzelzellklon 1 waren von insgesamt 109 CpG- Folgen 83 methyliert und im Einzelzellklon 2 waren 80 von insgesamt 115 analysierten CpG- Folgen methyliert. Der dritte Einzelzellklon hatte 94 methylierte CpG- Folgen von insgesamt 113 untersuchten CpG- Dinukleotiden.

5.1.7 HERV- K (HML- 2.HOM): Methylierungsmuster von stabil mit *in vitro* methyliertem Plasmid transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

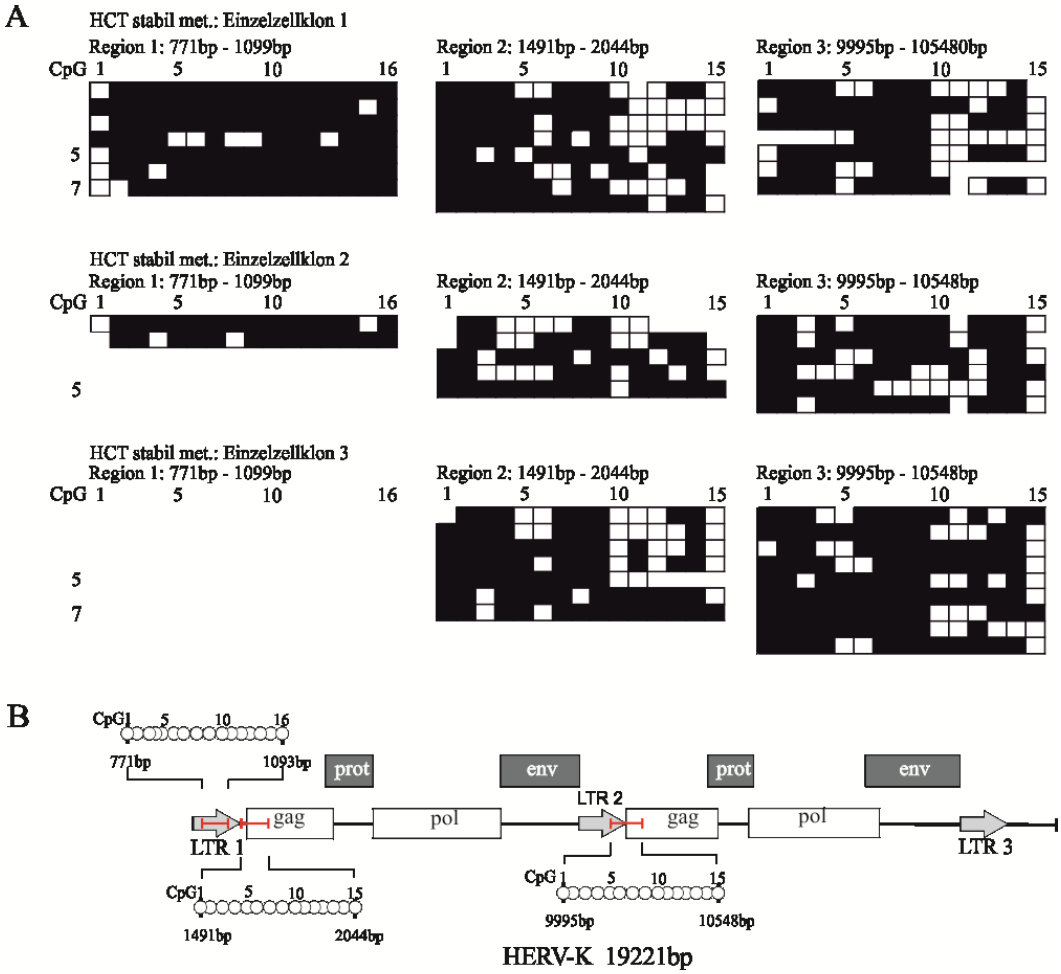

Abbildung 13: HERV- K: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen mit *in vitro* methylierten Plasmid

A) Methylierungsmuster der drei Regionen von drei Einzelzellklonen

B) Karte des HERV- K (AF074086) mit den untersuchten Bereichen (rote Balken) und den analysierten CpGs

Die Abbildung 13A zeigt die Methylierungsmuster von drei stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen mit *in vitro* methylierten Plasmid (HCT stabil met.). Im Einzelzellklon 1 waren 99 der 109 analysierten CpG- Folgen methyliert. Im zweiten Einzelzellklon waren 27 von den insgesamt 31 untersuchten CpG- Folgen methyliert. Im dritten Einzelzellklon konnte kein Methylierungsmuster der ersten Region erstellt werden, da es Amplifikationsprobleme des PCR-Fragments gab. Die zweite analysierte Region (1491- 2044bp) umfasste 15 CpG- Folgen. Im ersten Einzelzellklon waren von den insgesamt 116 analysierten CpG- Folgen 80 methyliert. Im zweiten Einzelzellklon waren 46 von den insgesamt 67 untersuchten CpG- Folgen methyliert und der dritte Einzelzellklon hatte von den insgesamt 100 analysierten CpG- Folgen 72 methyliert.
Die dritte untersuchte Region (9995- 10548bp) beinhaltete 15 CpG- Folgen. Im Einzelzellklon 1 waren von insgesamt 92 CpG- Folgen 64 methyliert und im Einzelzellklon 2 waren 64 von insgesamt 85 analysierten CpG- Folgen methyliert. Der dritte Einzelzellklon hatte 102 methylierte CpG- Folgen von insgesamt 133 untersuchten CpG- Dinukleotiden.

Im endogenen Retrovirus HERV- K konnte nach der Integration fremder DNA in den drei analysierten Bereichen keine Veränderung im Methylierungsmuster gefunden werden.

5.1.8 HERV- W: Methylierungsmuster von nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

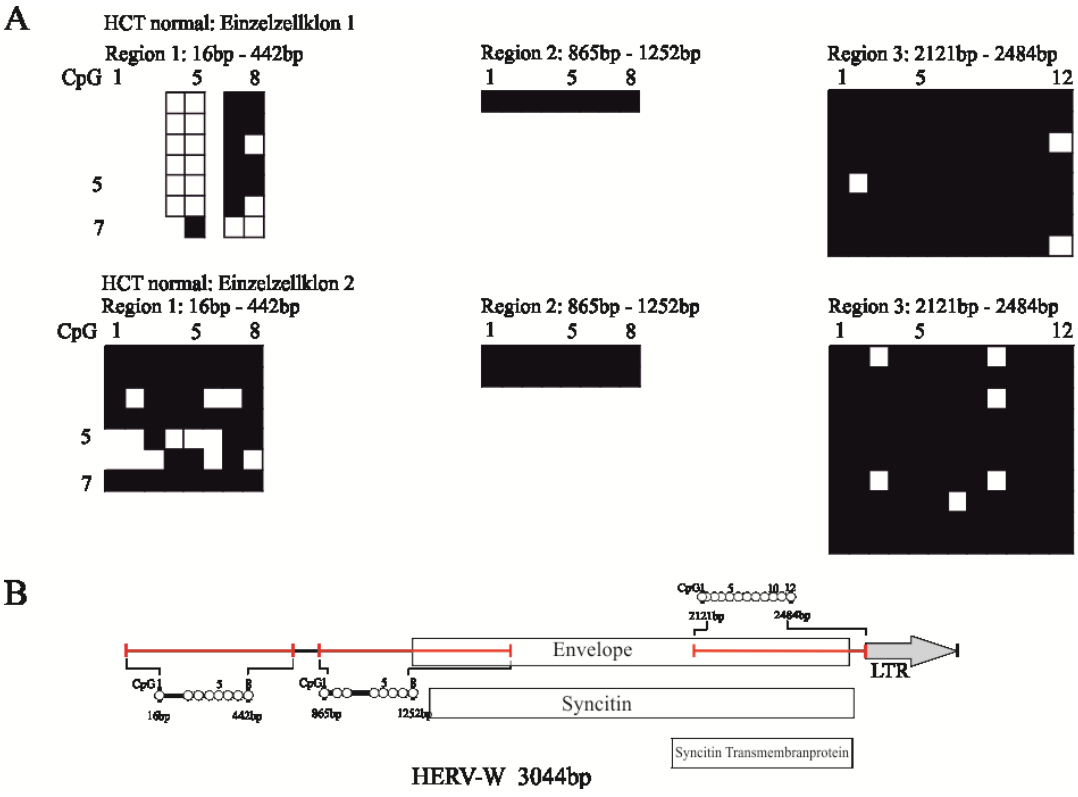

Abbildung 14: HERV- W: Methylierungsmuster von nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

A) Methylierungsmuster der drei Regionen von zwei Kontroll- Einzelzellklonen

B) Karte des HERV- W (NM014590) mit den untersuchten Bereichen; Die Regionen für die Untersuchung des Methylierungsstatus der CpG- Dinukleotide (als Kreise dargestellt) sind mit roten Balken markiert.

In Abbildung 14A sind die Methylierungsmuster von zwei nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen (HCT normal) dargestellt, die als Kontrollen für den DNA- Methylierungsstatus vor der Integration fremder DNA dienten. In der ersten analysierten Region (16- 442bp) befanden sich 8 CpG- Dinukleotide. Im Einzelzellklon 1 waren 11 von insgesamt 27 analysierten CpG- Folgen methyliert. Die CpG- Folgen 1 bis 3, sowie das CpG 6 sind im ersten Einzelzellklon zu TpA mutiert. Im zweiten Einzelzellklon waren 44 von den insgesamt 46 untersuchten CpG- Folgen methyliert. Die zweite analysierte Region (865- 1252bp) umfasste 8 CpG- Folgen. Im ersten Einzelzellklon waren alle acht analysierten CpG- Folgen methyliert. Aufgrund von Schwierigkeiten beim Sequenzieren, konnte nur ein DNA- Molekül ausgewertet werden. Im zweiten Einzelzellklon waren alle untersuchten CpG- Folgen methyliert. Die dritte untersuchte Region (2121- 2484bp) beinhaltete 12 CpG- Folgen. Im Einzelzellklon 1 waren von insgesamt 96 CpG- Folgen 93 methyliert. Und im Einzelzellklon 2 waren 114 von insgesamt 120 analysierten CpG- Folgen methyliert.

5.1.9 HERV- W: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

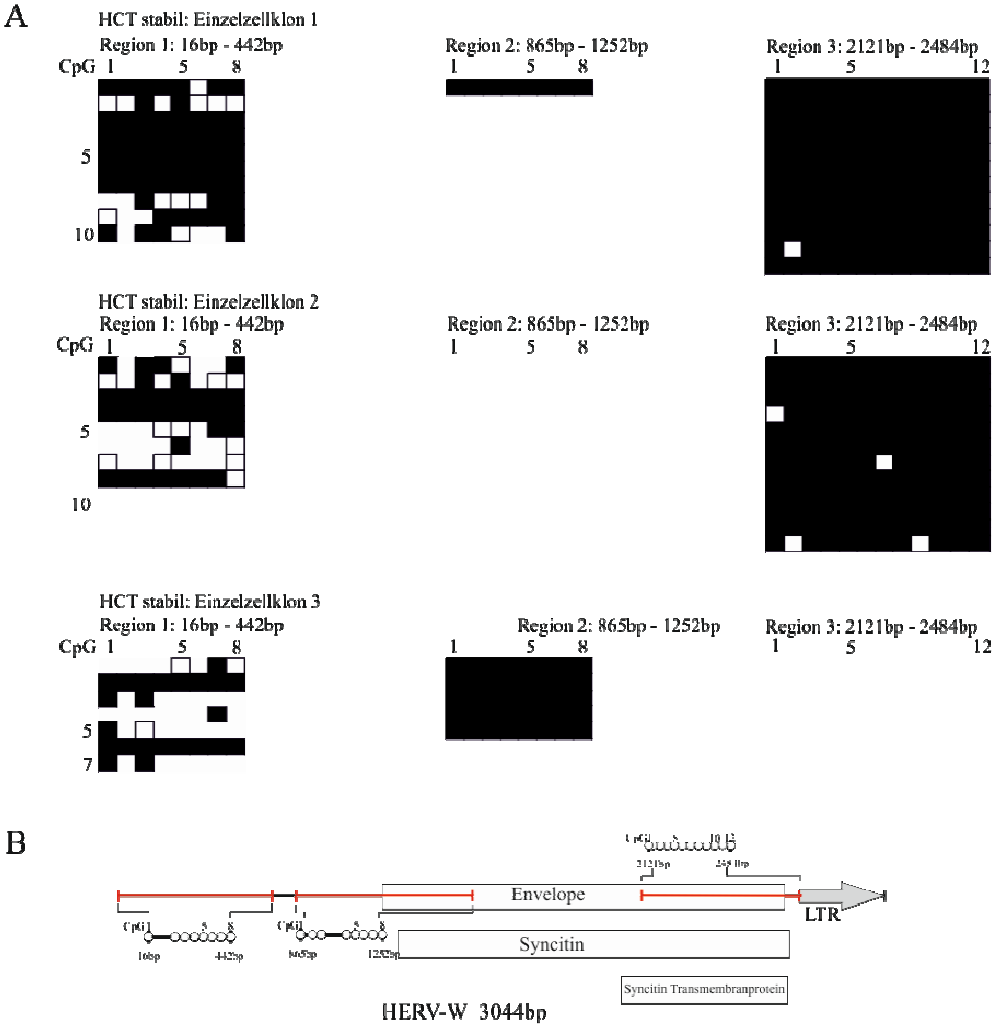

Abbildung 15: HERV- W: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

A) Methylierungsmuster der drei Regionen von drei Einzelzellklonen

B) Karte des HERV- W (NM014590) mit den untersuchten Bereichen; Die Regionen für die Untersuchung des Methylierungsstatus der CpG- Dinukleotide (als Kreise dargestellt) sind mit roten Balken markiert.

Abbildung 15A zeigt die Methylierungsmuster von drei stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen (HCT stabil). In der ersten analysierten Region (16- 442bp) befanden sich 8 CpG- Dinukleotide. Im Einzelzellklon 1 waren 61 von insgesamt 73 analysierten CpG- Folgen methyliert. Im zweiten Einzelzellklon waren 32 von den insgesamt 44 untersuchten CpG- Folgen methyliert. Der dritte Einzelzellklon hatte von den insgesamt 26 analysierten CpG- Folgen 23 methyliert. Einzelne CpG- Folgen waren in allen untersuchten Einzelzellklonen zu TpA mutiert.
Die zweite analysierte Region (865- 1252bp) umfasste 8 CpG- Folgen. Im ersten Einzelzellklon waren alle CpG- Folgen methyliert. Aufgrund von Schwierigkeiten beim Sequenzieren, konnte nur ein DNA- Molekül ausgewertet werden. Im Einzelzellklon 2 konnte kein PCR- Fragment für den Bereich amplifiziert werden. Einzelzellklon 3 hatte von 40 analysierten CpG- Folgen alle methyliert. Die dritte untersuchte Region (2121- 2484bp) beinhaltete 12 CpG- Folgen. Im Einzelzellklon 1 waren von insgesamt 144 CpG- Folgen 143 methyliert. Und im Einzelzellklon 2 waren 140 von insgesamt 144 analysierten CpG- Folgen methyliert. Im Einzelzellklon 3 konnte für diesen Bereich kein PCR- Fragment amplifiziert werden.

5.1.10 HERV- W: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen mit *in vitro* methylierten Plasmid

Abbildung 16A zeigt die Methylierungsmuster von drei stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen mit *in vitro* methyliertem Plasmid (HCT stabil met.). In der ersten analysierten Region (16- 442bp) befanden sich 8 CpG- Dinukleotide. Im Einzelzellklon 1 waren 31 von insgesamt 39 analysierten CpG- Folgen methyliert. Im zweiten Einzelzellklon waren 38 von den insgesamt 39 untersuchten CpG- Folgen methyliert. Der dritte Einzelzellklon hatte von den insgesamt 38 analysierten CpG- Folgen 34 methyliert. Einzelne CpG- Folgen waren in allen untersuchten Einzelzellklonen zu TpA mutiert. Die zweite analysierte Region (865- 1252bp) umfasste 8 CpG- Folgen. Bei Einzelzellklon 1 konnte aufgrund von Schwierigkeiten bei der PCR kein PCR- Fragment amplifiziert werden. Im Einzelzellklon waren 15 der insgesamt 16 untersuchten CpG- Folgen methyliert. Einzelzellklon 3 hatte von 16 analysierten CpG- Folgen alle methyliert. Die dritte untersuchte Region (2121- 2484bp) beinhaltete 12 CpG- Folgen. Im Einzelzellklon 1 waren von insgesamt 120 CpG- Folgen 119 methyliert. Und im Einzelzellklon 2 waren 117 von insgesamt 120 analysierten CpG- Folgen methyliert. Im Einzelzellklon 3 konnte für diesen Bereich kein PCR- Fragment amplifiziert werden.

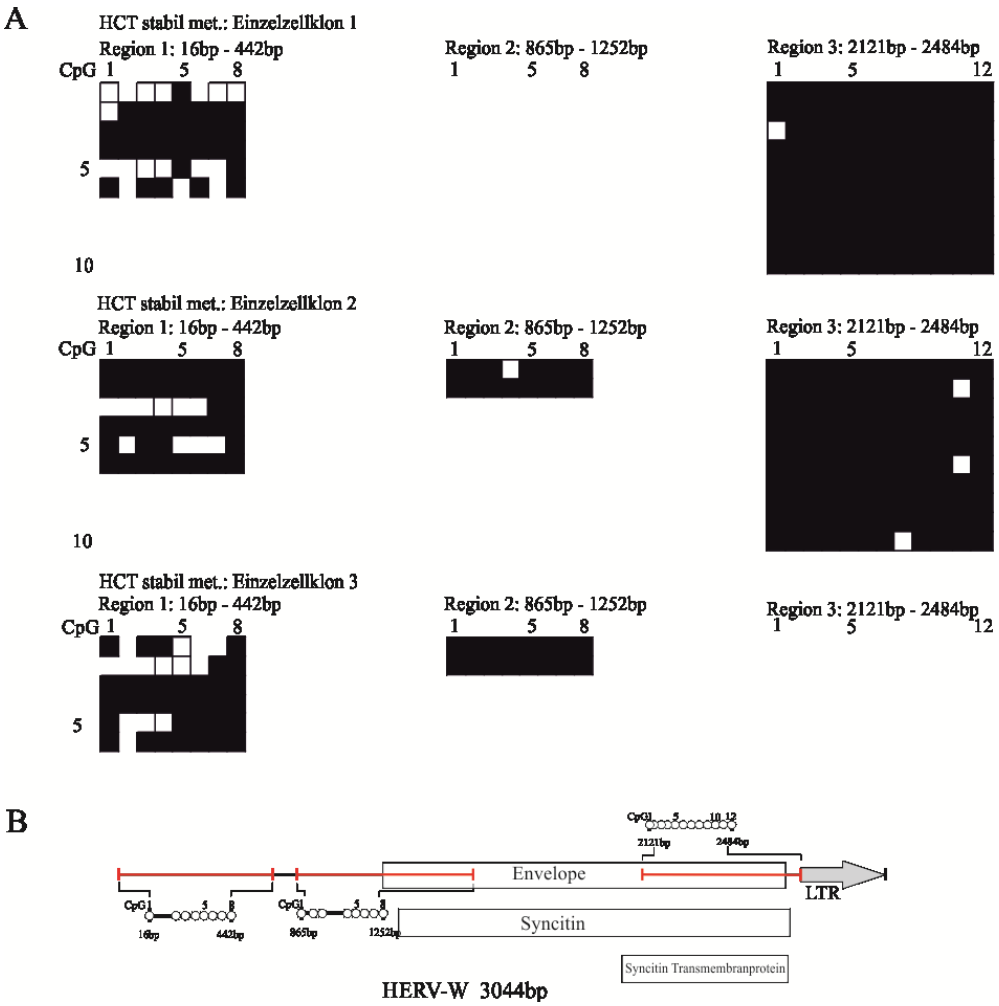

Abbildung 16: HERV- W: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen mit *in vitro* methylierten Plasmid

A) Methylierungsmuster der drei Regionen von drei Einzelzellklonen

B) Karte des HERV- W (NM014590) mit den untersuchten Bereichen und der analysierten CpG- Folgen

Das endogene Retrovirus HERV- W zeigt in den untersuchten Bereichen keine Veränderungen im Methylierungsmuster der HCT- 116 Einzelzellklonen.

5.1.11 LINE 1: Methylierungsmuster von nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

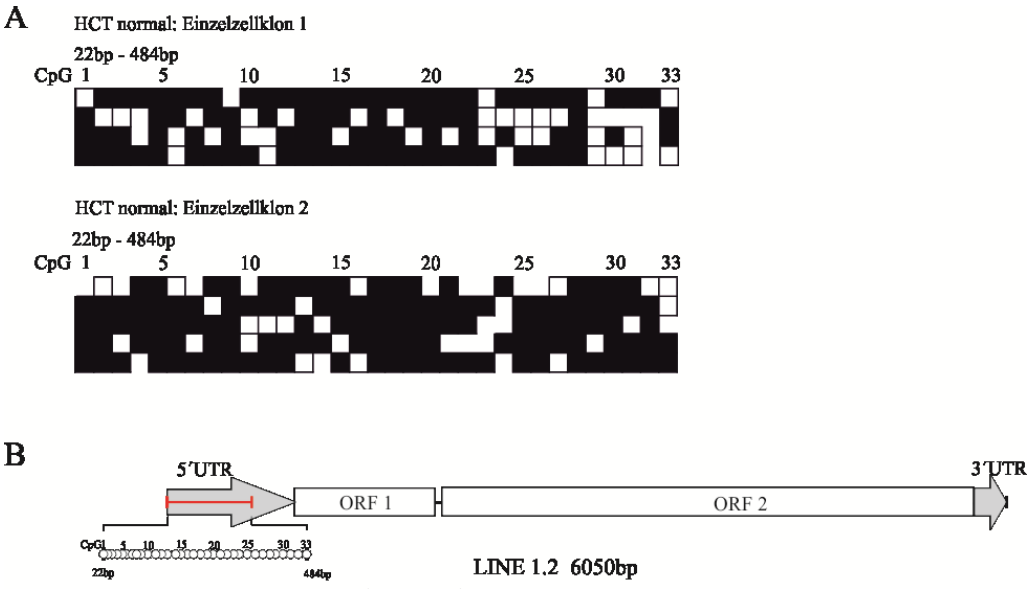

Abbildung 17: LINE 1: Methylierungsmuster von nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

A) Methylierungsmuster der analysierten Region von zwei Kontroll- Einzelzellklonen

B) Karte des LINE1.2 (M80343) mit dem untersuchten Bereich; Die Region für die Untersuchung des Methylierungsstatus der CpG- Dinukleotide (als Kreise dargestellt) sind mit roten Balken markiert. ORF1 kodiert ein für ein RNA- Bindeprotein und ORF2 für ein Protein mit einer Domäne für eine Endonuklease und der reversen Transkriptase.

In Abbildung 17A sind die Methylierungsmuster von zwei nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen (HCT normal) dargestellt, die als Kontrollen für den DNA- Methylierungsstatus vor der Integration fremder DNA dienten. In der untersuchten Region (22- 484bp) sind insgesamt 33 CpG- Dinukleotide enthalten. Im Einzelzellklon 1 waren 88 von insgesamt 120 analysierten CpG- Folgen methyliert. Im zweiten Einzelzellklon waren 124 von den insgesamt 146 untersuchten CpG- Folgen methyliert. Vereinzelte CpG- Folgen waren in beiden Einzelzellklonen zu TpA mutiert.

5.1.12 LINE 1: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

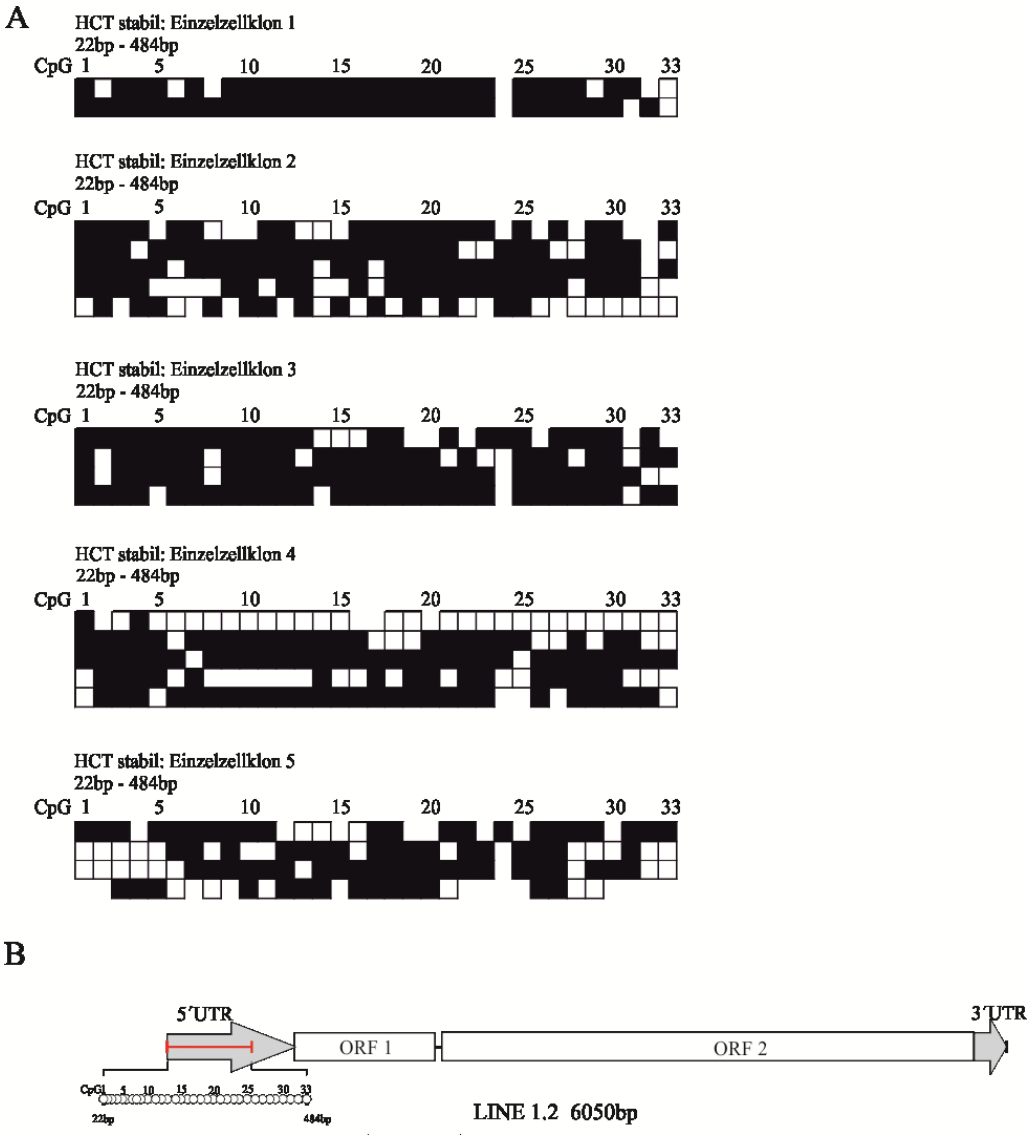

Abbildung 18: LINE 1: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

A) Methylierungsmuster der analysierten Region von fünf Einzelzellklonen

B) Karte des LINE1.2 (M80343) mit dem untersuchten Bereich und der analysierten CpG- Folgen

In Abbildung 18A sind die Methylierungsmuster von fünf stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen (HCT stabil) dargestellt. In der untersuchten Region (22- 484bp) sind insgesamt 33 CpG- Dinukleotide enthalten. Im Einzelzellklon 1 waren 56 von insgesamt 88 analysierten CpG- Folgen methyliert. Im zweiten Einzelzellklon waren 111 von den insgesamt 141 untersuchten CpG- Folgen methyliert. Einzelzellklon 3 hatte von insgesamt 118 analysierte CpG- Folgen 107 methyliert und Einzelzellklon 4 von 152 untersuchten CpG- Folgen 101 methyliert. Der Einzelzellklon 5 hatte im untersuchten Bereich 79 methylierte CpG- Folgen von insgesamt 109 analysierten CpG- Dinukleotiden. Vereinzelte CpG- Folgen waren in allen Einzelzellklonen zu TpA mutiert.

5.1.13 LINE 1: Methylierungsmuster von stabil mit in vitro methyliertem Plasmid transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

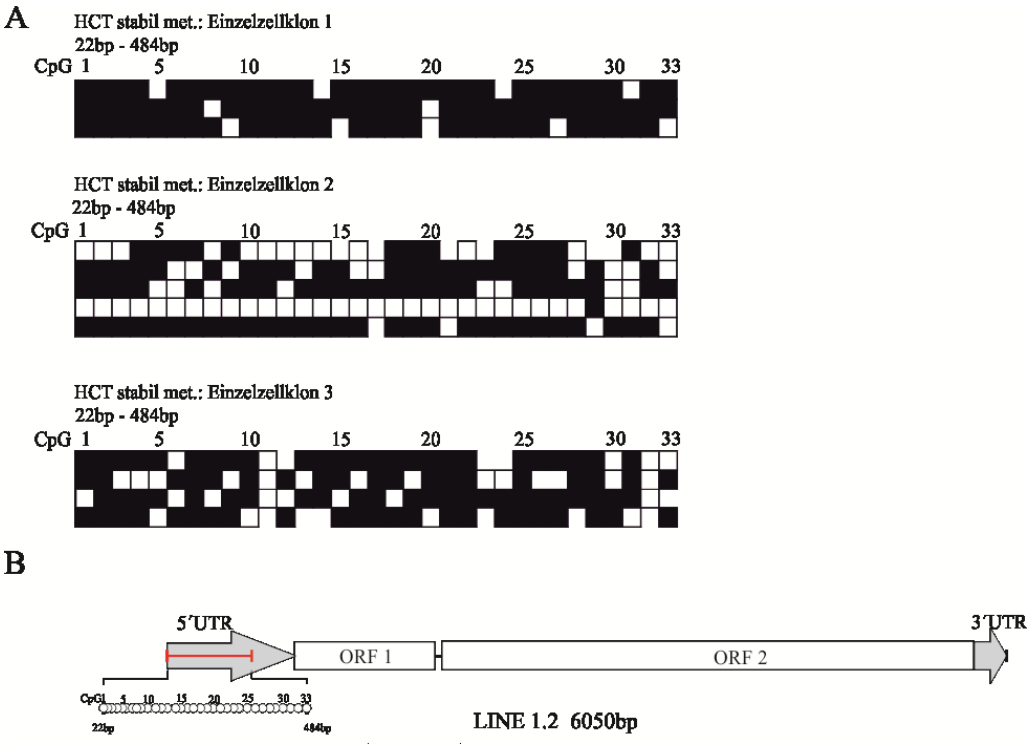

Abbildung 19: LINE 1: Methylierungsmuster von stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen mit *in vitro* methyliertem Plasmid

A) Methylierungsmuster der analysierten Region von drei Einzelzellklonen
B) Karte des LINE1.2 (M80343) mit dem untersuchten Bereich und den analysierten CpG- Folgen

Abbildung 19A zeigt das Methylierungsmuster der drei stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklone mit *in vitro* stabil integriertem Plasmid. In der untersuchten Region (22- 484bp) sind insgesamt 33 CpG- Dinukleotide enthalten. Im Einzelzellklon 1 waren 89 von insgesamt 94 analysierten CpG- Folgen methyliert. Im zweiten Einzelzellklon waren 91 von den insgesamt 158 untersuchten CpG- Folgen methyliert. Einzelzellklon 3 hatte von insgesamt 120 analysierte CpG- Folgen 91 methyliert. Die Auswertung der DNA- Sequenzen zeigte vereinzelte CpG- Folgen, die zu TpA mutiert waren in allen Einzelzellklonen.

Das Retrotransposon LINE1.2 zeigte nach Integration von Fremd- DNA keine Veränderungen im DNA- Methylierungsmuster.

5.1.14 Quantifizierung der Gesamt- DNA- Methylierung: Vergleich trans- genomische mit nicht trans- genomischen Zellen

In den ausgewählten Retroelementen war nach der Integration von Fremd- DNA in das Wirtsgenom keine Veränderung im DNA- Methylierungsmuster fest zu stellen. Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, ob es überhaupt zu Änderungen in der DNA- Methylierung kommt, wurde die Gesamt-Methylierung in den HCT- 116 Einzelzellklone gemessen. Für die Quantifikation wurde das „Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit“ verwendet. Dazu wurde die genomische DNA der Einzelzellklone auf Mikrotiter- Streifen gebunden und die methylierte DNA durch einen 5-mC- Antikörper nachgewiesen. In einer ELISA- ähnlichen Reaktion wurden die DNAs in einem Mikrotiterplatten- Lesegerät quantifiziert. Die Menge der methylierten DNA war proportional zur Stärke der oD_{450}.
Die Kalkulation der Gesamt- DNA- Methylierung erfolgte durch folgende Formel:

$$\text{Methylierung (\%)} = \frac{\text{oD (Probe - Negativkontrolle) / 2}}{\text{oD (Positivkontrolle- Negativkontrolle)}} \times 100\ \%$$

Die Positivkontrolle war eine vollständig methylierte DNA, die vom Hersteller mitgeliefert wurde. Als Negativkontrolle wurde der DNA- Bindungspuffer verwendet. Die Ergebnisse von vier unabhängig durchgeführten Experimenten sind in Abbildung 20 zusammengefasst.

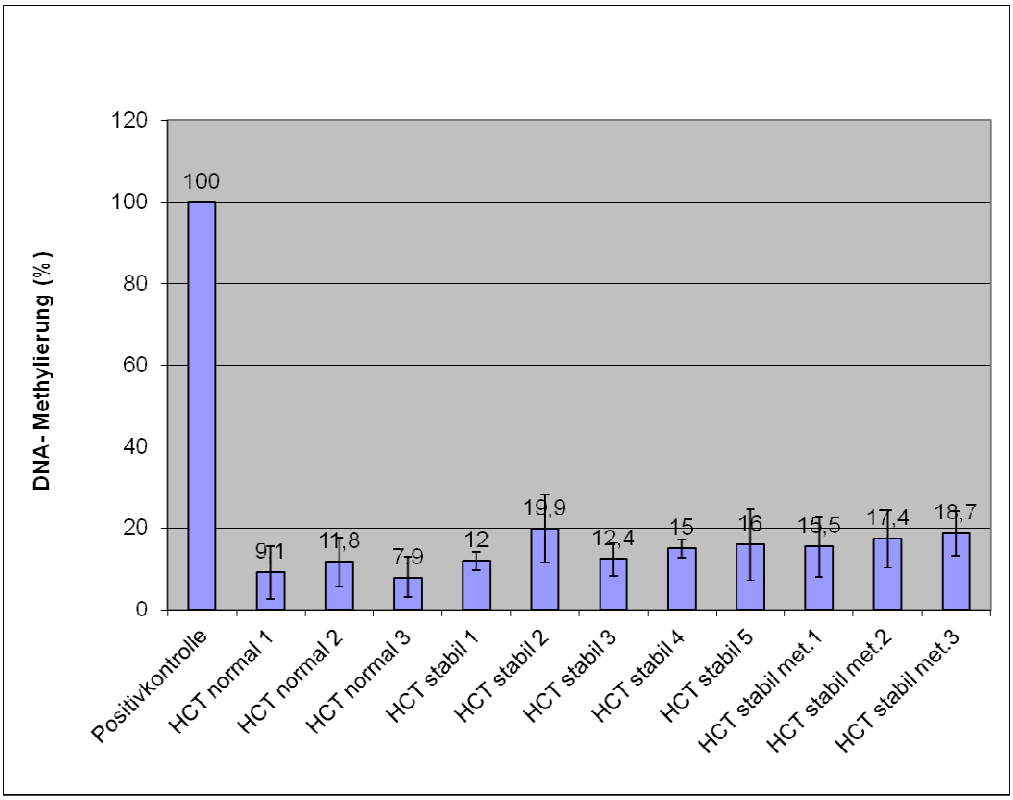

Abbildung 20: Zusammenfassung der globalen DNA- Methylierung aus vier unabhängigen Experimenten.

Um eine Veränderung in der Gesamt- DNA- Methylierung in der Tumorzelllinie HCT- 116 zu detektieren, musste zunächst die globale DNA- Methylierung in Einzelzellklonen ohne stabil transfiziertes Plasmid bestimmt werden (HCT normal 1- 3) und dann mit dem Methylierungsniveau in den Einzelzellklonen mit integrierter Fremd- DNA verglichen werden. Die Einzelzellklone mit stabil transfizierten Plasmid sind als HCT stabil 1 bis 5 im Diagramm bezeichnet. HCT stabil met. 1 bis 3 bezeichnen Einzelzellklone mit *in vitro* methylierten Plasmid. In einigen stabil transfizierten Einzelzellklonen (HCT stabil 2,4,5 sowie HCT stabil met. 1- 3) wurden gering erhöhte Werte für die globale DNA- Methylierung beobachtet, die aber keine statistische Relevanz hatten (Überprüfung der Daten durch t- Test).

5.1.15 GeneChip® Expressions Array: Vergleich trans- genomische mit nicht trans-genomischen Zellen

Um einen Hinweis zu bekommen, ob und wo es zu Veränderungen bei der Transkription im Genom kommt, wurde eine Microarray- Expressionanalyse durchgeführt. Dazu wurde im Duplikat aus zwei unterschiedlichen Einzelzellklonen Gesamt- RNA isoliert und an das Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) nach Regensburg geschickt, die die weiteren Arbeiten übernommen haben. Für die Expressionsanalyse wurde der „ Human Gene 1.0 ST“ Array verwendet. Die Untersuchung seitens des KFB erfolgte blind.

Anhand der Microarray- Daten wurden die Transkriptionsaktivität der nicht- transfizierten mit den stabilen, transgenen Einzelzellklone verglichen. Bei der Auswertung wurden nur die Gene berücksichtigt deren Transkriptionsaktivität deutlich mehr als zweifach erhöht oder reprimiert war. Tabelle 13 zeigt eine Auswahl der am stärksten exprimierten Genomabschnitte.

Veränderungswerte stabil vs. normal	p- Wert	Gensymbol	Beschreibung	Lokalisation
8,67	**0,0057**	MSX2	msh homeobox 2	5q34-q35
5,20	**0,0007**	DNER	delta/notch-like EGF repeat containing	2q36.3
5,15	**0,0022**	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	10p15-p14
4,61	**0,0040**	HSPB8	heat shock 22kDa protein 8	12q24.23
4,35	**0,0049**	AQP3	aquaporin 3	9p13
4,34	**0,0006**	PRF1	perforin 1	10q22
4,21	**0,0021**	CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	20q13
4,07	**0,0312**	SEMA3C	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	7q21-q31
3,93	**0,0292**	CNTN1	contactin	12q11-q12
3,85	**0,0069**	MAP2	microtubule-associated protein 2	2q34-q35

Tabelle 13: Überexprimierte Genomabschnitte beim Vergleich der Expressionsprofile von nicht- transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen und den stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

Von insgesamt 28.829 Genomabschnitten waren 144 Gene im Vergleich zu der Transkription der Kontroll- Einzelzellklone über exprimiert und 198 Gene herunter reguliert. Die zehn am stärksten reprimierten Gene sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die Veränderungswerte (engl.: fold change) nehmen für herunter regulierte Gene einen negativen Wert ein. Ergebnisse mit p- Werten < 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

Veränderungswerte stabil vs. normal	**p- Wert**	**Gensymbol**	**Beschreibung**	**Lokalisation**
-8,19	**0,0013**	CHAC1	ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli)	15q15.1
-6,89	**0,0018**	NR2F1	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	5q14
-6,84	**0,0235**	KLRK1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	12p13.2-p12.3
-5,94	**0,0375**	KLRC4	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4	12p13.2-p12.3
-5,76	**0,0074**	F3	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	1p22-p21
-5,53	**0,0211**	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	4q28-q32
-5,49	**0,0019**	ARRDC3	arrestin domain containing 3	5q14.3
-4,64	**0,0334**	CALB1	calbindin 1, 28kDa	8q21.3-q22.1
-4,43	**0,0005**	KIAA0040	KIAA0040	1q24-q25
-4,16	**0,0030**	C12orf36	chromosome 12 open reading frame 36	12p13.1

Tabelle 14: Reprimierte Genomabschnitte beim Vergleich der Expressionsprofile von normalen HCT- 116 Einzelzellklonen und den stabil transfizierten HCT- 116 Einzelzellklonen

Zur Kontrolle der Microarray- Daten der Einzelzellklone mit und ohne integrierte Fremd- DNA, wurden die Expressionsprofile der normalen, nicht mit Plasmid transfizierten Einzelzellklone miteinander verglichen. Damit sollte sichergestellt werden, dass die beobachteten Veränderungen in der Transkriptionsaktivität nicht auf die biologische Variabilität der Kontrollen zurückzuführen sind. Für dieses Experiment wurden aus fünf nicht- transfizierten Einzelzellklonen im Duplikat Gesamt- RNA isoliert und mit dem „ Human Gene 1.0 ST“ Array analysiert. Auch bei diesem Versuch war die Fragestellung für das Labor in Regensburg nicht bekannt. Ein Auszug der Ergebnisse der Transkriptionsanalyse ist in Tabelle 15 dargestellt. In den 28.536 analysierten Genomabschnitten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im RNA- Expressionsprofil zwischen den untersuchten nicht- transfizierten Einzelzellklonen.

		RNA- Expressionsprofil									
Gensymbol	**Zugangsnummer**	**EZ 1a**	**EZ 1b**	**EZ 2a**	**EZ 2b**	**EZ 3a**	**EZ 3b**	**EZ 4a**	**EZ 4b**	**EZ 5a**	**EZ 5b**
OR4F17	NM001005240	**2,99**	**2,86**	**3,02**	**3,01**	**2,84**	**2,82**	**2,90**	**2,99**	**3,40**	**2,78**
14. Sep	ENST00000388975	**6,22**	**5,65**	**6,16**	**5,70**	**5,43**	**5,68**	**5,99**	**5,61**	**4,65**	**6,12**
OR4F16	NM001005277	**4,83**	**3,91**	**5,40**	**3,87**	**4,84**	**4,64**	**3,95**	**4,84**	**4,08**	**4,22**
FAM87A	BC037297	**4,23**	**4,73**	**4,69**	**4,44**	**4,52**	**4,49**	**4,52**	**4,51**	**5,03**	**4,64**
SAMD11	NM152486	**6,28**	**6,51**	**6,63**	**6,96**	**6,55**	**6,32**	**6,58**	**6,48**	**7,20**	**6,58**
KLHL17	NM198317	**7,10**	**7,06**	**7,33**	**7,38**	**7,52**	**7,31**	**7,28**	**7,31**	**7,59**	**7,45**
PLEKHN1	NM032129	**6,79**	**6,53**	**6,49**	**6,95**	**6,79**	**6,65**	**6,61**	**6,77**	**7,09**	**6,66**
ISG15	NM005101	**7,00**	**7,11**	**7,07**	**6,74**	**7,12**	**7,11**	**7,15**	**7,62**	**7,35**	**6,94**
AGRN	NM198576	**7,58**	**6,84**	**7,20**	**7,76**	**6,82**	**6,60**	**7,10**	**7,36**	**7,19**	**6,85**
TTLL10	NM153254	**6,57**	**6,62**	**6,62**	**6,93**	**6,63**	**6,49**	**6,60**	**6,55**	**7,27**	**6,59**

Tabelle 15: Auszug aus den Ergebnissen der Expressionsprofile der fünf HCT- 116 Einzelzellklonen (EZ1-5a/b) ohne integrierte Fremd- DNA

Die beobachteten Unterschiede der Transkriptionsaktivität der HCT- 116 Einzelzellklone mit und ohne transfizierten Plasmid waren auf Veränderungen durch die Integration der Fremd- DNA in das Wirtsgenom zurückzuführen.

5.2 Methylierungsanalysen in proviralen HIV- 1 Genomen von Probanden in unterschiedlichen Infektionsstadien

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA- Methylierung in proviralen HIV- 1 Genomen in Patienten mit AIDS, mit und ohne Behandlung durch antiretrovirale Therapie, HIV- 1 infizierten Probanden in der Latenzphase (chronisch Infizierte ohne klinische Symptome), LTNPs und in Elite-Controllern (Daten der Probanden: Tabelle 1) untersucht, um festzustellen in wie weit die DNA-Methylierung, eine Rolle bei der Kontrolle der HIV- 1 Infektion spielt. Dazu wurden zwei Regionen im proviralen HIV- 1 Genom untersucht (Abbildung 21).

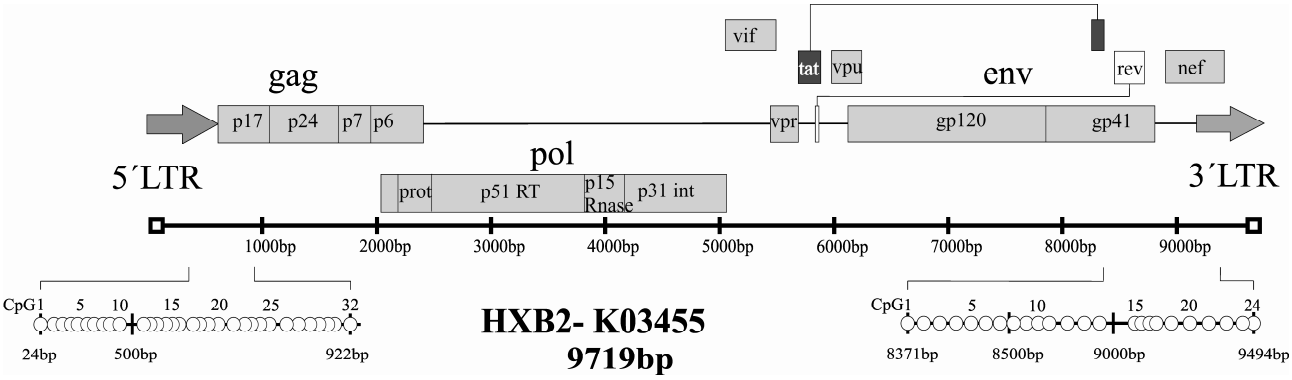

Abbildung 21: Karte des HIV- 1 proviralen Genoms mit den beiden analysierten Bereichen

Die erste Region (24- 922bp) beinhaltet 32 CpG- Folgen und umfasst das 5´LTR sowie einen Teilbereich des *gag*- Gens. Die erste CpG- Folge an Position 24 im ersten Bereich kann mit der Bisulfit- Sequenzierung nicht analysiert werden. Der zweite Bereich (8371- 9494bp) hat insgesamt 24 CpG- Folgen und umfasst die viralen Gene *tat*, *rev* und *nef* sowie das 3´LTR.

5.2.1 Nachweis von nicht integrierten HIV- 1 DNA- Formen

In der frühen Phasen der HIV- 1 Infektion wird das virale RNA- Genom zusammen mit der reversen Transkriptase ins Zytoplasma entlassen. Im Zytoplasma wird die virale RNA in lineare doppelsträngige DNA mit jeweils einer Kopie des LTR an beiden Enden (Abbildung 7) umgeschrieben und in den Nukleus transportiert. Normalerweise wird die virale DNA ins Zellgenom durch die Integrase eingebaut, was ein essentieller Schritt für den HIV- 1 Replikationszyklus darstellt. Allerdings kann es zu Fehlern beim Einbau in das Wirtschromosom kommen und es entstehen durch Zirkularisierung der cDNA 1- LTR circles und 2-LTR circles (135;136). Diese Formen von nicht integrierter DNA sind unstabil und gehen nach kurzer Zeit verloren, aber ihr Vorhandensein ist ein Beweis für eine erhebliche transkriptionelle Aktivität (137;138). Mehrere Arbeitsgruppen haben die Anwesenheit von 2- LTR circles in einem großen Prozentsatz von HIV- 1 Patienten gezeigt, die eine starke antiretrovirale Therapie erhalten haben, trotz der Abwesenheit von nachweisbarer HIV- 1 RNA (129;139).
Um sicher zu gehen, dass in meinen Analysen nur provirale HIV- 1 DNA analysiert wurde, wurden im Vorfeld unterschiedlichen Patienten- DNAs auf Anwesenheit von 2-LTR circles durch PCR kontrolliert (140). Eine Zusammenfassung des Ergebnisses ist in Tabelle 16 aufgeführt.
Die Integration der proviralen HIV-1 DNA wurde durch eine Alu- Gag PCR nachgewiesen. Die erste PCR wurde dabei mit einem für das virale *gag*- Gen spezifischen Primer und einem für das Alu- Element spezifischen Primer durchgeführt. Der Alu- Primer dient dabei als Anker im menschlichen Genom. Die anschließende zweite PCR wurde mit einem Primerpaar für die virale 5´LTR- Region durchgeführt (141).

DNA	2- LTR circles	DNA	2- LTR circles
W- 1 06/ 1995	negativ	**W- 20 07/ 2006**	negativ
W- 1 05/ 1996	negativ	**W- 350 05/ 2002**	negativ
W- 1 04/ 2003	negativ	**W- 350 10/ 2002**	negativ
W- 21 01/ 1997	negativ	**W- 351 03/ 2002**	negativ
W- 21 03/ 2001	negativ	**TR 15 03/ 2007**	**positiv**
W- 21 06/ 2006	negativ	**TR 16 12 /2006**	negativ
W- 360 07/ 1996	negativ	**W- 4 08/ 1999**	negativ
TR 19 03/ 2007	negativ	**W- 17 06/ 1999**	negativ
W- 20 09/ 1997	negativ		
W- 20 04/ 2006	negativ		

Tabelle 16: Nachweis von 2- LTR circles in Patienten- DNAs aus WIHS (Women´s Interagency HIV- 1 Study) und der Maple Leaf Clinic Cohort

Von den 19 analysierten DNAs, wurden nur bei Patient TR 15 2- LTR circles amplifiziert. Alle anderen HIV- 1 DNA- Sequenzen lagen nur in der integrierten proviralen Form vor.

5.2.2 Nicht- methylierte HIV- 1 provirale DNA in AIDS- Patienten

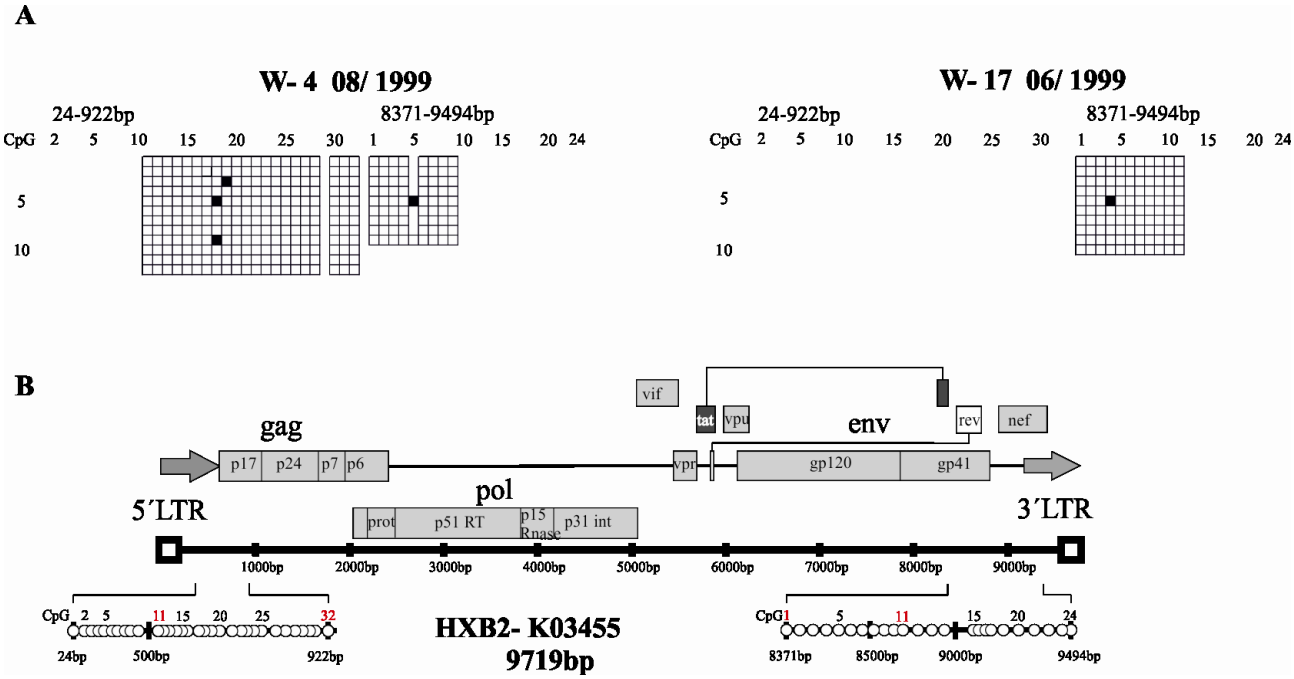

Abbildung 22: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in AIDS- Patienten

A) DNA- Methylierungsmuster von zwei AIDS- Patienten; Erklärung Methylierungsmuster siehe Kapitel 5.1.3

B) Karte HIV- 1 mit den beiden analysierten Regionen; Die roten Zahlen grenzen jeweils die Bereiche der untersuchten CpG- Folgen ein.

Für die Analyse wurde genomische DNA aus PBMCs (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells) von zwei AIDS- Patienten isoliert und nach Bisulfit- Behandlung auf CpG- Methylierung untersucht.

In der ersten untersuchten Region der Probandin W- 4 sind die CpG- Folgen 11 bis 32 nicht methyliert. Für die Probandin W- 17 konnte kein Methylierungsmuster der ersten Region erstellt werden, aufgrund von Amplifikationsproblemen. Der zweite analysierte Bereich zeigte in den CpG- Folgen 1 bis 10 bei beiden Probanden nicht methylierte CpG- Folgen. Die vereinzelten methylierten CpG- Folgen sind vermutlich das Ergebnis einer nicht ganz vollständigen Bisulfit- Konversion einzelner CpG- Folgen.

5.2.3 Nicht- methylierte HIV- 1 provirale DNA in chronisch infizierten Patienten

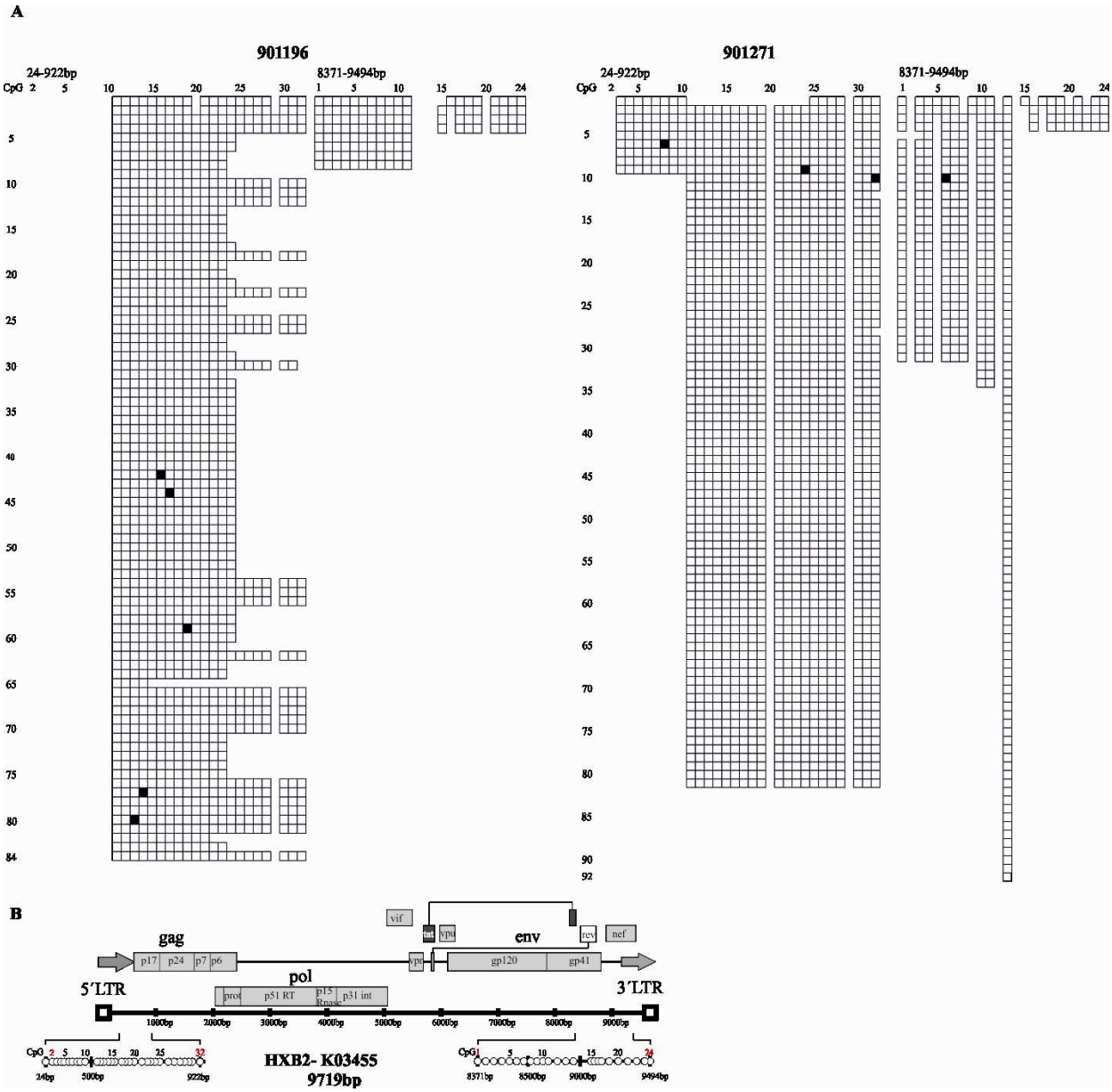

Abbildung 23: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in chronisch infizierten Patienten I

A) DNA- Methylierungsmuster von zwei Patienten; Erklärung Methylierungsmuster siehe Kapitel 5.1.3

B) Karte HIV- 1 mit den beiden analysierten Bereichen

Die Abbildung 23 zeigt das Methylierungsmuster von zwei chronisch mit HIV- 1 infizierten Probanden. In der ersten untersuchten Region des Patienten 901196 sind die CpG- Folgen 11 bis 32 nicht methyliert. Der Patient 901271 hatte ebenfalls in der ersten Region nicht methylierte CpG- Folgen. In der zweiten Region waren alle CpG- Folgen der beiden Probanden nicht methyliert.
Die vereinzelten methylierten CpG- Folgen sind vermutlich das Ergebnis einer nicht ganz vollständigen Bisulfit- Konversion einzelner CpG- Folgen.

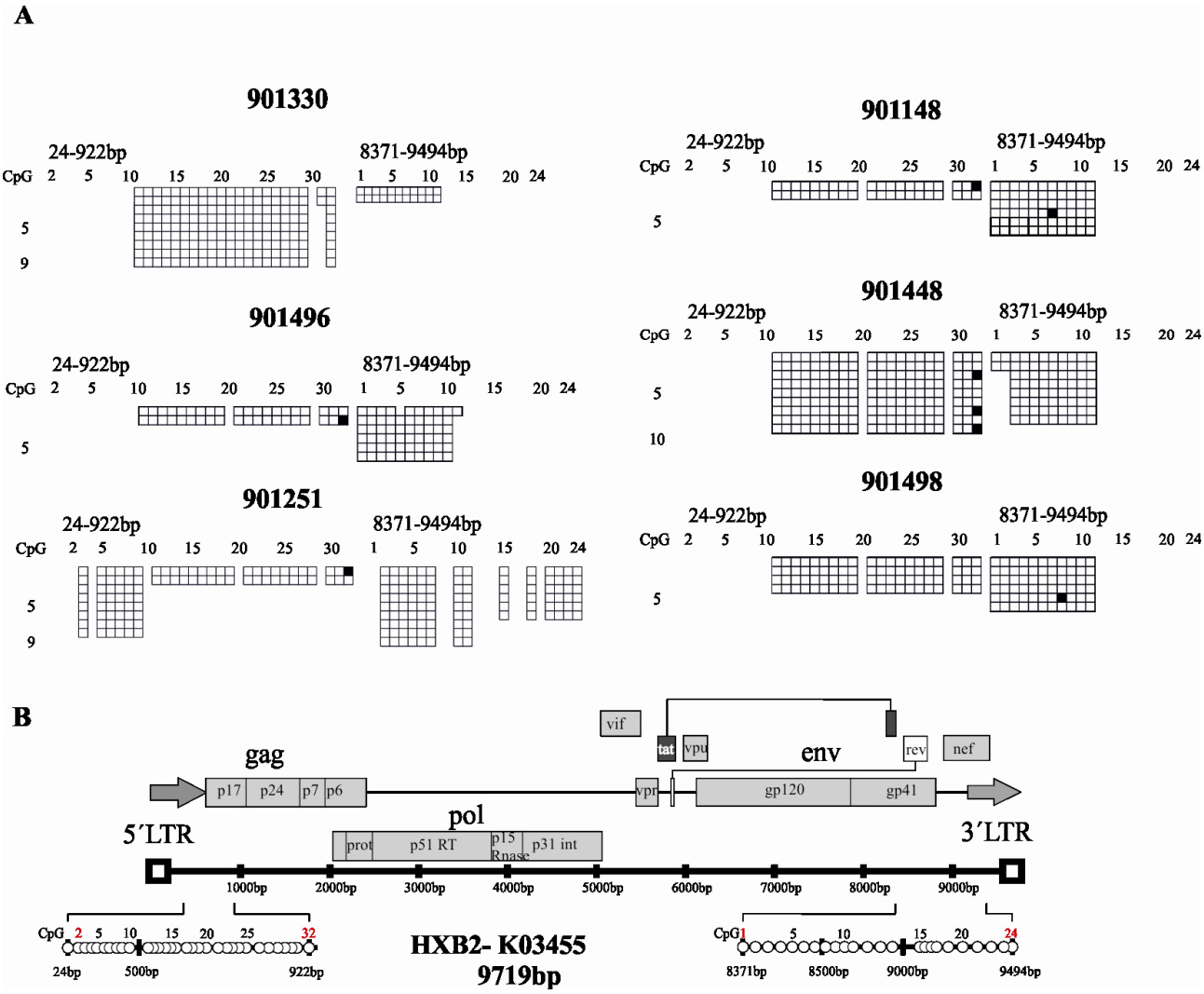

Abbildung 24: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in chronisch infizierten Patienten II

A) DNA- Methylierungsmuster von sieben Patienten; Erklärung Methylierungsmuster siehe Kapitel 5.1.3

B) Karte HIV- 1 mit den beiden analysierten Bereichen

Die Abbildung 24 zeigt die DNA- Methylierungsmuster proviraler HIV- 1 DNA aus sechs chronisch mit HIV- 1 infizierten Probanden. Im ersten untersuchten Bereich sind die CpG- Folgen in allen Probanden nicht methyliert. Ebenso sind in der zweiten untersuchten Region die CpG- Folgen in allen Probanden nicht methyliert.

5.2.4 Teilweise methylierte provirale HIV- 1 DNA in LTNPs

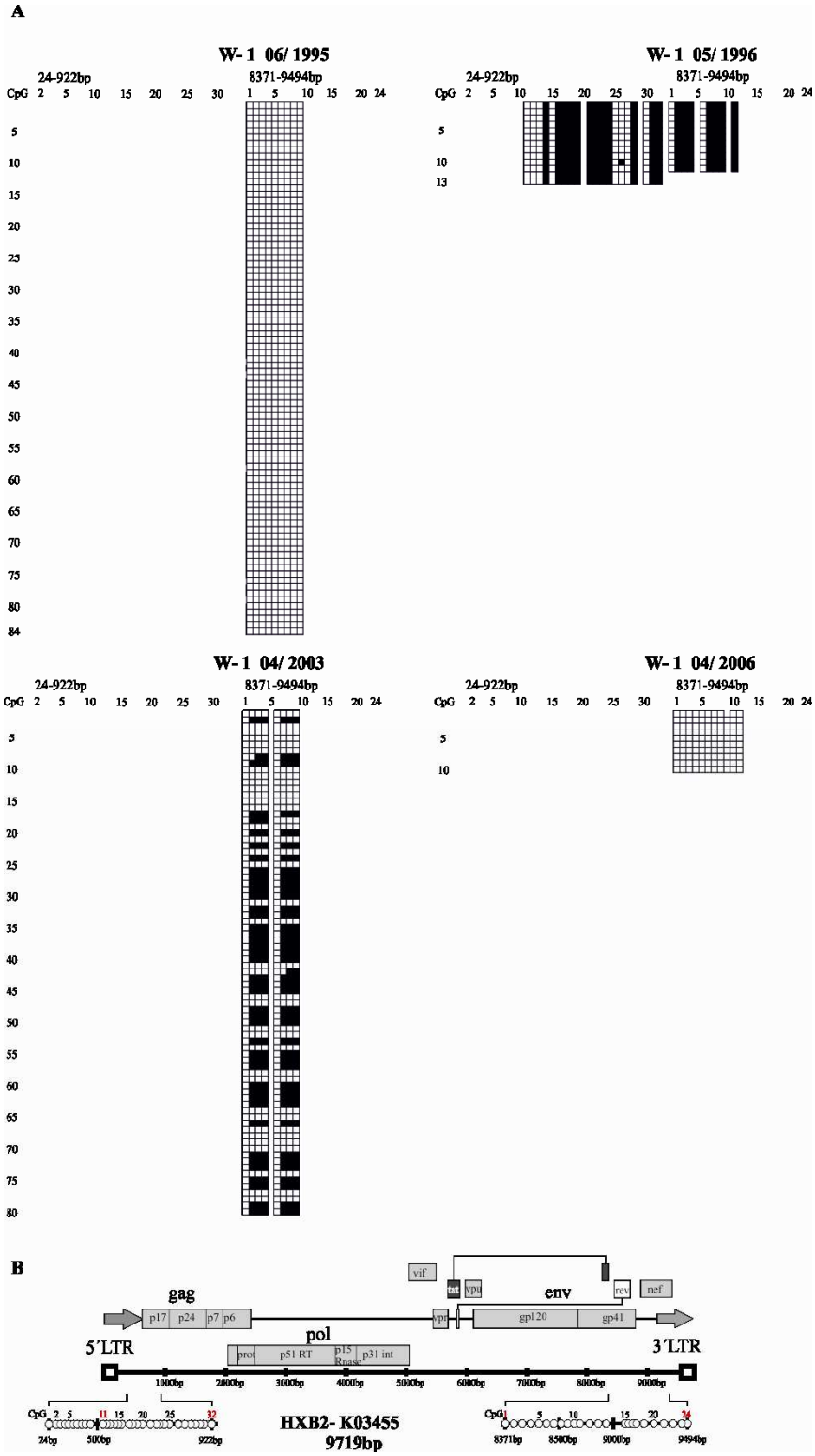

Abbildung 25: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in LTNP I

A) DNA- Methylierungsmuster von verschiedenen Zeitpunkten von Patient W- 1; Erklärung siehe Kapitel 5.1.3

B) Karte HIV- 1 mit den beiden analysierten Bereichen

In der Abbildung 25 ist das DNA- Methylierungsmuster der Probandin W- 1, einer LTNP, zu vier verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Die Zeitpunkte erstrecken sich über einen Zeitraum von 11 Jahren. Im ersten Zeitpunkt 06/ 1995 waren die CpG- Folgen 1 bis 9 in der zweiten analysierten Region vollständig nicht methyliert. Im zweiten Zeitpunkt 05/ 1996 waren die CpG- Folgen 11 bis 32 in der ersten Region zu 65% methyliert. In der zweiten Region waren die CpG- Folgen 1 bis 11 zu 72% methyliert. Sieben Jahre später, 04/ 2003, waren die CpG- Folgen 1 bis 9 in der zweiten Region noch zu 32% methyliert. Im letzten Zeitpunkt waren die CpG- Folgen 1 bis 11 in der zweiten Region vollständig nicht methyliert.

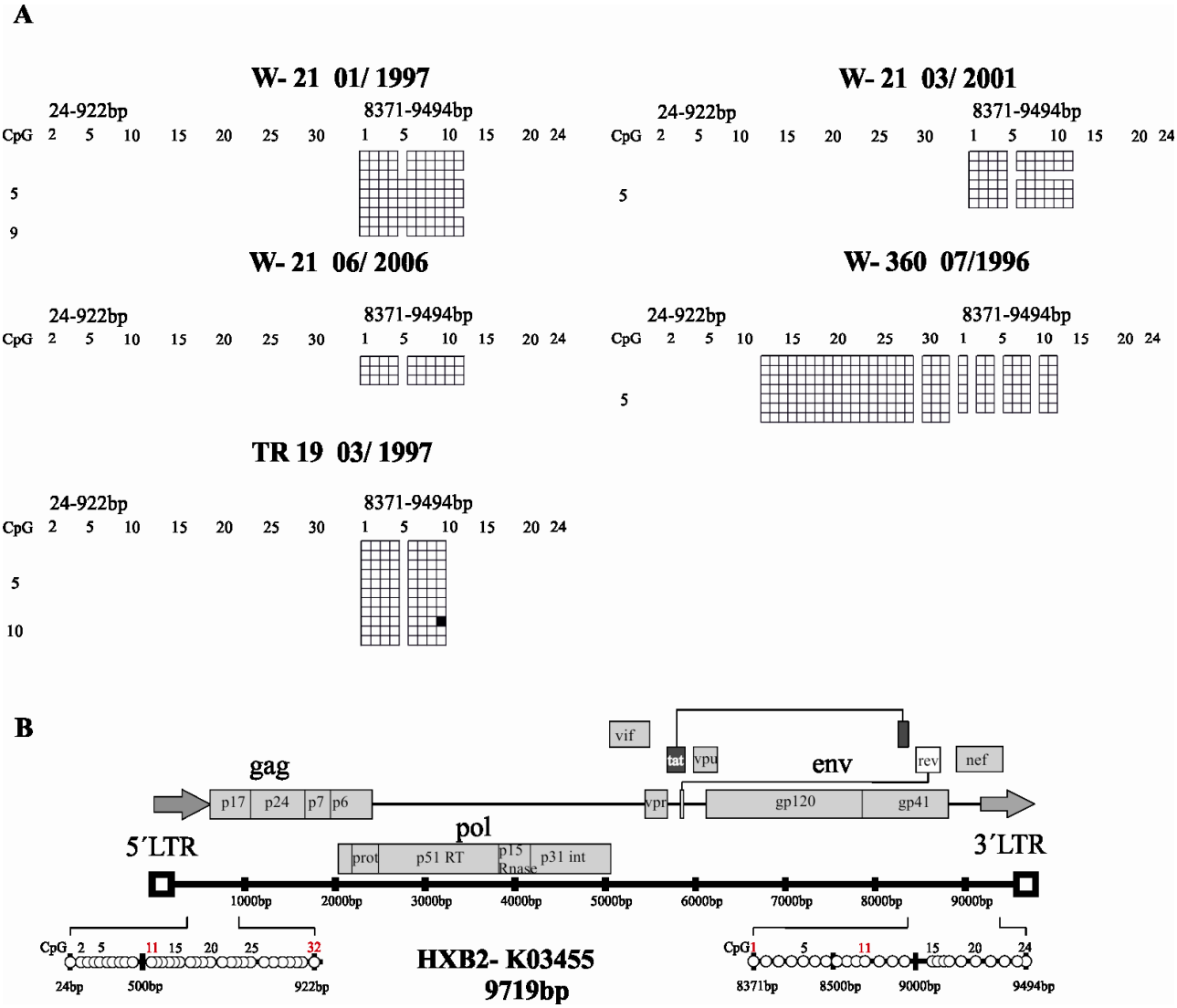

Abbildung 26: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in LTNP II

A) DNA- Methylierungsmuster von LTNPs; Erklärung Methylierungsmuster siehe Kapitel 5.1.3

B) Karte HIV- 1 mit den beiden analysierten Bereichen

In der Abbildung 26 sind die DNA- Methylierungsmuster von proviraler HIV- 1 DNA aus PBMCs von drei LTNPs dargestellt. Die zweite untersuchte Region war in der Probandin W- 21 in allen drei Zeitpunkten in den CpG- Folgen 1 bis 11 nicht methyliert. Die untersuchten CpG- Folgen in den beiden Bereichen der proviralen HIV- 1 DNA der Probandin W- 360 waren nicht methyliert. Die untersuchte Region mit den CpG- Folgen 1 bis 9 war im Proband TR 19 nicht methyliert.

5.2.5 Komplett nicht methylierte HIV- 1 provirale Genome in Elite- Controllern

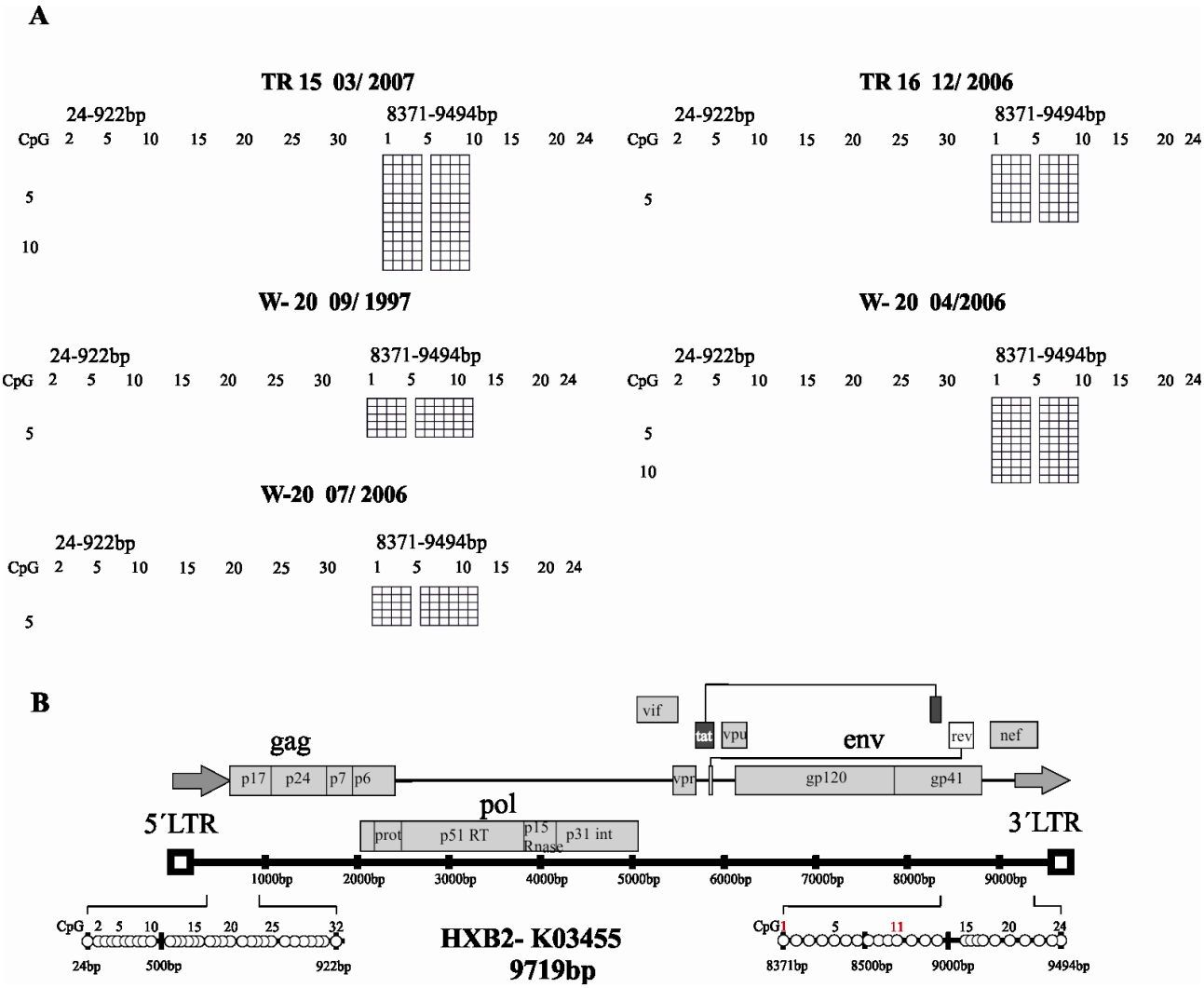

Abbildung 27: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in Elite- Controller I

A) DNA- Methylierungsmuster von Elite- Controllern; Erklärung Methylierungsmuster siehe Kapitel 5.1.3

B) Karte HIV- 1 mit den beiden analysierten Bereichen

Elite- Controller, mit einer Viruslast unter der Nachweisgrenze, nehmen eine Sonderstellung in der Gruppe der LTNPs ein. Die Abbildung 27 zeigt das DNA- Methylierungsmuster von drei Elite- Controllern. Im untersuchten Bereich waren die CpG- Folgen 1 bis 9 bzw. 11 vollständig nicht methyliert.

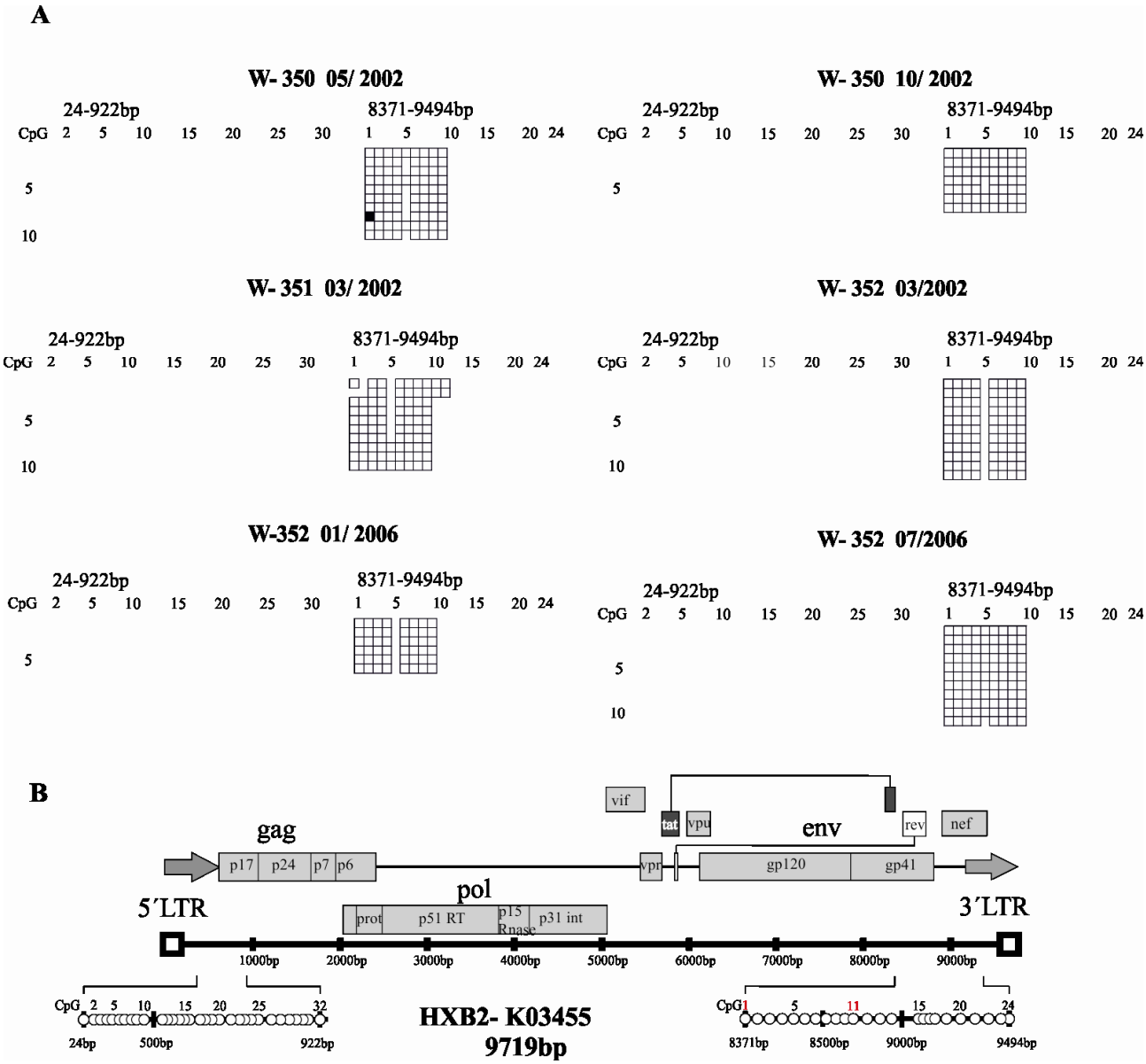

Abbildung 28: DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen in Elite- Controller II

A) DNA- Methylierungsmuster von Elite- Controllern; Erklärung Methylierungsmuster siehe Kapitel 5.1.3

B) Karte HIV- 1 mit den beiden analysierten Bereichen

In Abbildung 28 sind die DNA- Methylierungsmuster von drei weiteren Elite- Controllern dargestellt. Auch hier sind nur vollständig nicht methylierte CpG- Folgen im analysierten Bereich zu finden.

Durch Bisulfit Sequenzierung genomischer DNA wurden DNA- Proben von 20 HIV- 1 infizierten Probanden in unterschiedlichen Krankheitsstadien der HIV- 1 Infektion auf ihren CpG- Methylierungsstatus im HIV- 1 proviralen Genom untersucht. Die DNA- Proben waren aus den PBMCs von 10 Patienten mit chronischer HIV- 1 Infektion, mit und ohne Behandlung durch eine retrovirale Therapie; sechs Elite- Controllern und 4 LTNPs isoliert worden. In allen untersuchten DNA- Proben war die provirale HIV- 1 DNA in das Wirtsgenom integriert. Bei der Bisulfit

Sequenzierung genomischer DNA wurden bis zu 84 einzelne provirale HIV- 1 DNA- Moleküle analysiert, um die Möglichkeit von epigenetischen Variationen auszuschließen.
Die analysierten CpG- Folgen waren im 5´ und 3´LTR, in einem Teilbereich des *gag* Gens sowie in den akzessorischen Genen *tat*, *rev* und *nef* lokalisiert. Die provirale HIV- 1 DNA war in 19 der 20 HIV- 1 infizierten Probanden vollständig nicht methyliert. Im Gegensatz dazu, war das Methylierungsprofil der proviralen HIV- 1 DNA der Probandin W- 1, eine LTNP, komplexer. Während des Studienzeitraumes von 11 Jahren hatte die Probandin durchgängig eine geringe Viruslast (Tabelle 1). Die provirale HIV-1 DNA war in zwei Zeitpunkten komplett nicht methyliert, aber in zwei anderen teilweise methyliert in den untersuchten Bereichen. Die DNA- Methylierung des proviralen HIV- 1 Genoms in den zwei Zeitpunkten war nicht mit einer erhöhten Virusreplikation korreliert.

5.2.6 Kein 5- Hydroxymethylcytosin (5-hmC) in HIV- 1 Proviren

Bei der Analyse von Bisulfit- konvertierter DNA kann nach der Sequenzierung nicht zwischen 5-mC und 5- hmC unterschieden werden. Da bei einem LTNP in verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche CpG- Methylierungsniveaus gefunden wurden, sollte sichergestellt werden, dass es sich dabei um 5- mC und nicht um 5- hmC handelt, denn 5- hmC entsteht als Zwischenprodukt bei der DNA- Demethylierung (26;31;142). Dazu wurde das „MethylFlash™ Hydroxymethylated DNA Quantification Kit (Colorimetric)“ verwendet. Zur Quantifizierung wurde genomische DNA an Mikrotiter- Streifen gebunden und hydroxymethylierte DNA mit einem Capture- und einem Detektions- Antikörper nachgewiesen und in einem Mikrotiterplatten- Lesegerät vermessen. Die Menge von hydroxymethylierter DNA war dabei proportional zur Stärke der OD_{450}. Ein Nachteil dieser Technik ist, dass nicht zwischen individuellen CpG- Dinukleotiden unterschieden werden kann, sondern nur ein Durchschnittswert aller CpG- Folgen des Genoms quantifiziert wird. Für die Berechnung der Gesamt- Menge an 5- hmC wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{5- Hydroxymethylcytosine (\%)} = \frac{oD_{Probe} - oD_{Negativkontrolle\ II} \,/\, \text{DNA- Menge der Probe (ng)}}{(oD_{Positivkontrolle} - oD_{Negativkontrolle\ II}) \times 5 \,/\, \text{DNA- Menge der Positivkontrolle (ng)}} \times 100\ \%$$

In vier unabhängigen Experimenten wurden in DNA- Proben aus den PBMC´s von LTNP W- 1 in drei verschiedenen Zeitpunkten (05/ 1996, 03/ 2003, 04/ 2006) kein 5- hmC gefunden.

5.2.7 Spezifische Mutationen von CpG- Dinukleotiden in proviraler HIV- 1 DNA

Bei der Auswertung der Sequenzierung der Bisulfit- konvertierten DNA aus den PBMCs HIV-infizierten Patienten mit unterschiedlichem Infektionsverlauf fiel auf, dass bestimmte CpG- Folgen in der DNA- Sequenz aus der proviralen Patienten- DNA im Vergleich zum HIV- 1 Referenzstamm HXB2 (K03455) mutiert waren. Auch der Vergleich mit der DNA- Sequenz von anderen HIV-1 Referenzstämmen, wie AF033819, MN (M17449.1), JRFL (M38429.1), pNL4.3 (AF324492) und SF2 (K02007.1)zeigte Mutationen in spezifischen CpG- Folgen der Patienten- DNAs. Tabelle 17 zeigt eine Zusammenfassung.

Patient	Region 1: 24- 922bp					Region 2: 8371- 9494bp			
	CpG 2	CpG 4	CpG 10	CpG 20	CpG 29	CpG 2	CpG 5	CpG 9	CpG 20
W- 1 06/ 1995	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
W- 1 05/ 1996	n.b.	n.b.	n.b.	**13/13**	**13/13**	n.b.	**11/11**	n.b.	n.b.
W- 1 04/ 2003	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**79/79**	n.b.	n.b.
W- 1 04/ 2006	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**1/10**	n.b.
W- 21 01/ 1997	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**4/9**	n.b.	n.b.
W- 21 03/ 2001	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**6/6**	**1/6**	n.b.
W- 21 06/ 2003	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**3/3**	n.b.	n.b.
W- 360	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**7/7**	**6/6**	**6/6**	**6/6**	n.b.
TR 19	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**11/11**	n.b.	n.b.
W- 20 09/ 1997	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**5/5**	n.b.	n.b.
W- 20 04/ 2006	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**11/11**	n.b.	n.b.
W- 20 07/ 2006	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**5/5**	n.b.	n.b.
W- 350 05/ 2002	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**5/7**	n.b.	n.b.
W- 350 10/ 2002	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**7/10**	n.b.	n.b.
W- 351	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**7/10**	n.b.	n.b.
W- 352 03/ 2002	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**11/11**	n.b.	n.b.
W- 352 01/ 2006	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**6/6**	n.b.	n.b.
W- 352 07/ 2006	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**1/11**	n.b.	n.b.
TR 15	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**12/12**	n.b.	n.b.
TR 16	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**7/7**	n.b.	n.b.
W- 4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**12/12**	n.b.	**7/9**	n.b.	n.b.
W- 17	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
901148	n.b.	n.b.	n.b.	**2/2**	**2/2**	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
801196	n.b.	n.b.	n.b.	**2/84**	**26/84**	n.b.	n.b.	n.b.	**4/4**
901251	**8/8**	**8/8**	**8/8**.	**2/2**	**2/2**	n.b.	n.b.	**9/9**	n.b.
901271	**9/9**	n.b.	n.b.	**80/80**	**80/80**	**31/31**	**29/31**	**29/31**	**1/4**
901330	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
901448	n.b.	n.b.	n.b.	**9/9**	**9/9**	**6/6**	n.b.	n.b.	n.b.
901496	n.b.	n.b.	n.b.	**2/2**	**2/2**	n.b.	**1/6**	n.b.	n.b.
901448	n.b.	n.b.	n.b.	**4/4**	**4/4**	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 17: Wiederkehrende mutierte CpG- Folgen in den unterschiedlichen Patienten- DNAs

n.b. = nicht bestimmt

Im Bereich der *gag*- Region (565- 922bp) wurden die CpG- Folgen 20 und 29 häufig durch andere Dinukleotide ersetzt. Im *tat*- und *rev*- Genbereich (8371- 8585bp) waren die CpG- Dinukleotide in den Positionen 5 und 12 oft durch andere Dinukleotide ersetzt.

Durch Sequenzieren von nicht- Bisulfit- behandelter DNA wurden die Sequenzunterschiede in der DNA einiger Patienten bekräftigt. Die häufig betroffenen CpG- Folgen 20 und 29 im Bereich des *gag*- Gens (565- 922bp) und die CpG- Dinukleotide 5 und 12 im *tat*- und *rev*- Genbereich (8371- 8585bp) zeigten eine Vielfalt an Mutationen von nicht- CpG- Dinukleotiden, nämlich zu ApA, ApG, ApT, CpA, CpT, GpG, TpG und TpT. Eine Analyse von acht zufällig gewählten Sequenzen von HIV- 1 proviraler DNA aus der Los Alamos HIV- 1 Datenbank (143) zeigte Mutationen in denselben CpG- Dinukleotiden, wie die analysierten Patienten- Proben. Eine Zusammenfassung ist in der Tabelle 18 dargestellt. Biostatistische Analysen, durchgeführt von Christina Ramirez Kitchen von der University of California, Los Angeles CA, USA, zeigten, dass diese Mutationen nicht zufällig sind (p- Wert <0.001). Es wurde ein Chi- Quadrat- Test und die Anderson- Darling Methode angewandt, um zu untersuchen, ob diese Veränderungen statistisch signifikant sind. Beide zeigten, die Veränderungen in den CpG- Folgen in beiden untersuchten Regionen treten häufiger als erwartet auf.

Region1: 24- 928bp

CpG	A04321	AB078005	AB221005	AB221125	AB253432	AB286955	AB287363	AB287364
01	n.b.	n.b.	**ApA**	**ApA**	**ApA**	**ApA**	**ApA**	**ApA**
02	n.b.	CpG	CpG	**CpA**	CpG	**CpA**	**CpA**	**CpA**
03	n.b.	CpG	**ApC**	CpG	**ApC**	**ApG**	**ApG**	**ApG**
04	n.b.	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
05	n.b.	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
06	n.b.	CpG	**TpG**	CpG	**TpG**	**CpA**	CpG	CpG
07	n.b.	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
08	n.b.	CpG	CpG	**TpG**	CpG	**TpG**	CpG	**TpG**
09	n.b.	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
10	n.b.	CpG	CpG	**CpT**	CpG	CpG	CpG	CpG
11	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
12	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
13	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	**TpG**
14	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	**TpG**	CpG
15	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
16	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
17	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
18	CpG	CpG	**ApG**	CpG	**ApG**	CpG	CpG	CpG
19	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
20	CpG	CpG	CpG	**CpA**	CpG	**CpA**	CpG	**CpA**
21	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
22	**ApG**	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	**ApG**
23	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
24	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
25	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG

26	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
27	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
28	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
29	CpG	**ApG**	**ApG**	**ApA**	**ApG**	**ApG**	**ApA**	**ApA**
30	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
31	CpG	CpG	**ApG**	CpG	**ApG**	CpG	CpG	CpG
32	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	**TpG**	CpG

Region 2: 8371- 9494bp

CpG	**A04321**	**AB078005**	**AB221005**	**AB221125**	**AB253432**	**AB286955**	**AB287363**	**AB287364**
01	CpG	CpG	CpG	**TpG**	CpG	**CpA**	**CpA**	**CpA**
02	CpG	**ApG**	CpG	CpG	CpG	**ApG**	CpG	**ApG**
03	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
04	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
05	CpG	**CpC**	**TpC**	**ApG**	**TpC**	CpG	**GpT**	**CpA**
06	CpG	CpG	CpG	**TpG**	CpG	**TpG**	CpG	**TpG**
07	CpG	**GpG**	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	**ApG**
08	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
09	CpG	CpG	CpG	**CpA**	CpG	CpG	**CpA**	CpG
10	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	**ApG**	CpG	CpG
11	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	**CpA**	CpG	CpG
12	CpG	**CpT**	**CpT**	**CpT**	**CpT**	**CpT**	**CpT**	**CpT**
13	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	**ApG**	CpG	**ApG**
14	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG

Tabelle 18: Zusammenfassung von CpG- Mutationen in Sequenzen von 8 zufällig ausgewählten proviralen DNAs aus der Los Alamos HIV- 1 Datenbank

VI. Diskussion

6.1 Veränderungen im DNA- Methylierungsmuster nach Integration von Fremd-DNA in Retroelementen im menschlichen Genom

6.1.1 Keine Veränderungen im Methylierungsmuster nach Integration von fremder DNA in Retroelementen im menschlichen Genom

Vorarbeiten in Hamsterzellen, die Adenovirus Typ 12 DNA- Sequenzen chromosomal integriert halten, haben gezeigt, dass es zum Teil zu erheblichen Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster endogener retroviraler DNA- Sequenzen von IAPs kommt. Im Hamstergenom existieren ca. 900 Kopien der IAP Retrotransposons, die vorwiegend auf den kurzen Armen der Chromosomen vorkommen (144;145). Neben einer Veränderung im DNA- Methylierungsmuster der Retrotransposons hat die Integration von fremder DNA auch Auswirkungen auf das DNA-Methylierungsmuster von Genen in der Nähe und entfernt von der Insertionsstelle auf anderen Chromosomen (66;69;70).
Um zu untersuchen, ob es zu Veränderungen nach der Integration von fremder DNA im menschlichen Wirtsgenom kommt, wurden Einzelzellklone mit und ohne Transgenom durch Bisulfit- Sequenzierung genomischer DNA auf ihre DNA- Methylierung in den endogenen Retroviren HERV- K und HERV- W, sowie dem Retrotransposon LINE 1 untersucht. Ein Vergleich mit den Kontroll- Einzelzellklonen ohne Integrat zeigte, dass es in den ausgewählten Retroelementen zu keiner Veränderung im DNA- Methylierungsmuster gekommen ist. Beide Gruppen der Einzelzellklone, ob mit oder ohne Transgenom, zeigten überwiegend methylierte CpG-Folgen in den untersuchten Regionen (Abbildungen 11- 19). Auch eine Quantifizierung der Gesamt- Methylierung in den Einzelzellklonen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 20).

6.1.2 Vergleich trans- genomische mit nicht trans- genomischen Zellen durch Microarray- Expressionsanalyse

Ein Vergleich von trans- genomischen mit nicht trans- genomischen Zellen durch eine Microarray-Expressionsanalyse zeigte, dass von insgesamt 28.829 untersuchten Genomabschnitten 144 Gene signifikant über exprimiert und 198 Gene signifikant herunter reguliert waren (Tabelle 13, 14). Die Kontrolle der Expressionsprofile von Einzelzellklonen ohne Integrat (Kontroll- Einzelzellklone) (Tabelle 15) zeigte, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen gab. Die beobachteten Veränderungen in der Transkriptionsaktivität waren somit nicht auf die biologische Variabilität der Kontrollen, Einzelzellklone ohne Transgenom, zurückzuführen, sondern auf Veränderungen nach der Integration von fremder DNA.

Die beobachteten Veränderungen stellen die Grundlagen für weiterführende Untersuchungen dar, wie zum Beispiel Genomweite DNA- Methylierungsanalysen, die Hinweise darauf geben könnten, wie massiv sich eine Integration auf das menschliche Genom auswirkt.

6.2 Epigenetische Analyse von proviralen HIV- 1 Genomen in Patienten in unterschiedlichen Krankheitsstadien

6.2.1 Molekulare Biologie der HIV- 1 Latenz

AIDS ist die bisher meist unvermeidbare Konsequenz einer HIV- 1 Infektion. Der fortschreitende Abbau der $CD4^+$- T- Zellen beeinträchtigt das Immunsystem soweit, dass opportunistische Infektion, die normalerweise meist harmlos sind, zum Tod der infizierten Menschen führen.
Intensive antiretrovirale Therapie kann die Virusreplikation soweit unterdrücken, dass sie mit den gängigen diagnostischen Methoden nicht mehr nachweisbar ist. Die Lebensspanne von HIV- 1 positiven Menschen wird dadurch erheblich verlängert. Eine vollständige Entfernung des Virus aus dem Wirtsorganismus ist mit diesem Therapieansatz nicht möglich. Wird die antiretrovirale Therapie unterbrochen, replizieren die latenten Viren wieder (146-148). Makrophagen spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der viralen Replikation während der antiretroviralen Therapie, weil HIV-1 weniger zytotoxisch auf diese Zellen wirkt und auch die verabreichten HIV-Medikamente vergleichsweise weniger wirksam sind (149-153). Das Hauptreservoir der latenten HI- Viren sind $CD4^+$- T- Gedächtniszellen. HIV- 1 infizierte T- Gedächtniszellen haben eine extrem lange Lebenszeit von vielen Jahren und produzieren sehr effektiv infektiöse HI- Viren. Aber nur eine kleine Population dieser Zellen ist Träger von latenten HIV- 1 Proviren, geschätzt eine von 10^6 Zellen (154;155). Die integrierten Proviren sind vor antiretroviralen Medikamenten geschützt, die nur replizierende Viren angreifen können. Außerdem kann das wirtseigene Immunsystem infizierte nicht von nicht- infizierten Zellen unterscheiden, weil es keine virale Aktivität gibt. Das provirale Reservoir wird im frühen Stadium der Infektion etabliert (156), ist extrem dauerhaft mit durchschnittlich 44 Monaten Halbwertszeit (157) und kann während einer akuten Phase der Virusreplikation wieder regeneriert werden (158). Die latenten HIV- 1 Proviren bilden damit eine nahezu unerschöpfliche Quelle von Replikations- kompetenten Viren.
Die Replikation von HIV- 1 Proviren ist abhängig von einer produktiven Transkription. Die Transkription wiederum ist abhängig von der Wirtszell- Maschinerie und dem Transaktivator-Protein Tat. Das HIV- 1 nutzt sein 5´LTR als viralen Promotor. Der HIV- 1 Promotor besitzt drei Tandem SP1- Bindestellen (159), eine Bindestelle für das TATA- Box- Bindeprotein (TBP) (160), TBP- assoziierte Faktoren und eine Initiator- Sequenz (161). In der Initiator- Sequenz sind überlappende Bindestellen für NFκB und NFAT (engl. nuclear factor of activated T cells) vorhanden. Eine Bindung von NFκB und NFAT verstärkt die Transkription von HIV- 1 in Zusammenarbeit mit SP1 und rekrutierten HATs (162;163). Neben dem Kern- Promotor benutzt HIV- 1 eine Signal- abhängige Verstärker- Region (engl. Enhancer- region) (164). Der HIV- 1 Promotor ist im Gegensatz zu zellulären Promotoren im höchsten Maße abhängig vom viralen Transaktivatorprotein Tat (165;166). Die Wirkung von Tat wird durch folgendes Modell erklärt.

Der Komplex der zellulären RNA- Polymerase II (RNAPII) bindet sich zusammen mit Transkriptionsfaktoren an den 5´LTR- Promotor des Provirusgenoms und initiiert die RNA- Synthese. Die gebildeten Produkte sind kurz und enthalten die 5´terminalen Sequenzen der TAR (engl. trans- activation response)- Elemente. TAR ist ein regulatorisches Element, lokalisiert stromabwärts der Initiationsstelle der Transkription (167;168). Die TAR- Elemente interagieren mit TRP1 (TAR- RNA- Bindeprotein 1) und die Elongation der mRNA- Synthese ist blockiert. Die gebildeten kurzen Transkripte sind instabil und werden bis auf die TAR- Regionen abgebaut, die im Zytoplasma akkumulieren. Ist Tat im Zellkern vorhanden, bindet es an das TAR- Element und verhindert den Abbruch der Polymerisation. Dazu rekrutiert Tat P- TEFb (engl. positive transcription elongation factor b). P- TEFb hyperphosphoryliert die C- terminale Domäne der RNAPII, die dadurch aktiviert wird (169-172). Der Initiationskomplex wird stabilisiert und translatierbare Transkripte werden gebildet. Zugleich verstärkt Tat die HIV- 1 Transkription und erhöht die Transkriptionsrate auf mehr als das Hundertfache.
Jede Störung im Prozess der HIV- 1 Transkription, sei es bei der Initiation oder der Elongation, führt zu latenten Proviren. Dabei spielen eine Reihe von Transkriptionfaktoren, wie NFκB, NFAT und P- TEFb, eine wichtige Rolle. Die HIV- 1 Transkription wird durch An- oder Abwesenheit dieser Transkriptionsfaktoren in ruhenden primären T- Zellen stark beeinflusst und kann so zum Latenzzustand von HIV- 1 in diesen Zellen führen. (173-176).

6.2.2 Die Rolle der Epigenetik bei der HIV- 1 Latenz

Die Genexpression jedes zellulären Gens inklusive des integrierten HIV- 1 Provirus ist von spezifischen epigenetischen Modifikationen abhängig. Nach der Integration des HIV- 1 Genoms in das Wirtschromosom scheint sich eine besondere Nukleosomenstruktur um das Provirus auszubilden, unabhängig vom Ort der Integration (177;178). Die epigenetischen Modifikationen an zwei Nukleosomen am LTR- Promotor spielen eine große Rolle bei der Kontrolle der HIV- 1 Genexpression (178-180). Auch DNA- Methylasen sind an der HIV- 1 Transkription und dem Erhalt der Latenz beteiligt (121;122;181).
Viele der Enzyme, die epigenetische Modifikationen steuern, haben keinen direkten Zugang zur DNA und müssen direkt vom LTR durch verschiedene DNA- Bindeproteine rekrutiert werden. Beispiele solcher Proteine sind CBF-1 (engl. latency- C- promoter binding factor 1), YY1/LSF (engl. YinYang 1/ late SV40 factor), P50 Homodimer, APA4 (engl. activating enhancer- binding protein 4), CTIP2 (engl. COUP- TF- interacting protein 2) und der Thyroidhormon- Rezeptor. Jedes einzelne von diesen Proteinen kann Chromatin- modifizierende Enzyme in Form von Multiproteinkomplexen für das HIV- 1 5´LTR rekrutieren (182-187). CBF-1 zum Beispiel induziert eine repressive Chromatinstruktur, die die HIV- 1 Latenz in primären $CD4^+$- T- Zellen fördert (182). EZH2, eine Histonmethylase und Komponente des PcG- Komplexes (engl. polycomp group corepressor) induziert ebenfalls eine repressive Chromatinstruktur während der HIV- 1 Latenz (188). PcG- Komplexe beinhalten multiple Chromatin- modifizierende Enzyme, die bekannt sind für eine Repression von zellulären Genen durch Induzieren von hemmenden epigenetischen Modifikationen von Histonen und DNA sind. Werden die repressiven epigenetischen

Modifikationen entfernt oder inhibiert, so führt das zur Reaktivierung der latenten HIV- 1 Proviren (189-191).
Um das Reservoir an latenten HIV- 1 Proviren auszulöschen, wurde in Zellkulturexperimenten mit primären $CD4^+$ T- Zellen versucht das latente Virus zu reaktivieren, beispielweise durch aktivierende Transkriptionsfaktoren oder Manipulation von Histonmodifikationen, und dann gezielt mit einer antiretroviralen Therapie zu bekämpfen. Diese Art der Strategie ist bekannt als „shock and kill". „Shock" bedeutet das Reaktivieren des latenten HIV- 1 Provirus und „kill" die Behandlung der reaktivierten Viren durch antiretrovirale Medikamente (192;193).
Eine Studie aus dem Jahr 2012 beschreibt die „Shock" Behandlung von HIV-1 infizierten Patienten mit dem HDAC- Inhibitor Vorinostat, bekannt aus der Krebstherapie. Dazu wurden zunächst 16 Patienten durch Leukopherese weiße Blutzellen entnommen und daraus die $CD4^+$ T- Zellen isoliert. Nach einer Behandlung der Zellen mit Vorinostat zeigten sich in acht, der aus den Patienten isolierten $CD4^+$ T- Zellen eine Zunahme der HIV- 1 RNA. Um die Wirkung von Vorinostat *in vivo* zu testen, erhielten diese Patienten zunächst eine niedrige Dosis (200mg) des Medikaments um die Verträglichkeit zu testen. Nach ein paar Wochen wurde die Dosis auf 400mg gesteigert und in einem Zeitfenster von 6 Stunden nach der Verabreichung $CD4^+$ T- Zellen isoliert und die Menge an HIV- 1 RNA gemessen. Es zeigte sich auch hier eine Zunahme der HIV- 1 RNA (194). Allerdings muss auch erwähnt werden, dass fünf der 16 getesteten HIV- 1 Patienten überhaupt nicht auf das Medikament Vorinostat reagiert haben. Die Studie gibt einen ersten Einblick, wie eine „Shock" Behandlung des proviralen HIV-1 Genoms funktionieren kann. Für eine Anwendung in der Praxis sind allerdings noch weitere Untersuchungen nötig.

6.2.3 Zellkultur- Modelle für die HIV- 1 Latenz

Die DNA- Methylierung ist essentiell für die normale Entwicklung in Säugetieren und ist involviert in der Stilllegung von Genen (195). Transkriptionelle Repression durch DNA- Methylierung kann durch zwei grundlegende Mechanismen herbei geführt werden. Die DNA- Modifikation kann erstens die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihr entsprechendes DNA- Motiv verhindern. Viele Transkriptionsfaktoren aus Säugern binden an GC- reiche DNA- Motive mit CpG- Folgen (196). Ist die Bindestelle methyliert, können einige von den Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden (197). Zweitens, Methylierte CpG- Folgen werden speziell durch MBDs erkannt und die können zum Beispiel den NuRD (engl. nucleosome remodeling and histone deacetylation)-Komplex rekrutieren (55;198).
DNA- Methylierung des HIV- 1 LTR wurde *in vitro* durch die Verwendung von Reporter- Plasmid-Systemen und durch latent- infizierte transformierte Zelllinien untersucht (120;199-201). Derzeit gibt es zwei Modelle für die Untersuchung der HIV- 1 Latenz in Zellkultur.
Das *in vitro* Jurkat- Latenz (J- Lat) Modell der HIV- 1 Latenz wurde mit einer infizierten menschlichen T- Zell- Leukämie- Zelllinie (Jurkat-Zelllinie) entwickelt, die mit dem rekombinanten HIV- 1 Klon HIV- 1- R7/ E^-/ GFP infiziert worden ist. HIV- 1- R7/ E^-/ GFP kodiert anstelle des *nef*- Gens das grüne fluoreszierende Protein (GFP), das durch eine Leserasterverschiebung im *env*-Gen des HIV- 1- R7/ 3/ GFP eingeführt wurde. HIV- 1- R7/ 3/ GFP ist ein Derivat des HIV- 1

Isolates HXB2 (202). Durch die Mutation findet nur eine einmalige Infektion in den Zellen statt. Das defekte HIV- 1 Hüllprotein wird durch die Pseudotypisierung mit VSV- G (Vesicular Stomatitis Virus- Glykoprotein) kompensiert, das separat auf einem Plasmid kodiert ist. Vier Tage nach der Infektion werden die Jurkat- Zellen auf die Expression von GFP analysiert und GFP-negative Zellen durch FACS (engl. Fluorescence- Activated Cell Sorting) aussortiert. Die so infizierten Zellen sind in zwei unterschiedliche Populationen aufgeteilt. Zum einen, die latent infizierten Zellen und die nicht infizierten Zellen. Um die infizierten von den nicht infizierten Zellen zu unterscheiden, werden die Zellen mit dem TNFα- Antagonist behandelt. Die latent infizierten Zellen (ca. 2%) exprimieren nach der Behandlung GFP und werden anschließend im FACS von den nicht infizierten Zellen getrennt und weiter kultiviert zu latent infizierten Zelllinien. Die Bisulfit- Analyse von CpG- Folgen im HIV- 1 5´LTR in den J- Lat- Zellklonen, die kein GFP mehr exprimierten, zeigte eine Hypermethylierung (122). Im Gegensatz dazu, zeigten J- Lat- Zellen mit exprimierten GFP eine Hypomethylierung im Promotor und eine produktive Infektion. Die Behandlung von J- Lat- Zellklonen mit 5-Aza-2'-desoxycytidin kann eine Hypomethylierung induzieren und das HIV- 1 Provirus aktivieren (121;122). Für das J- Lat- Modell wurden eine bereits durch HTLV transformierte Zelllinie verwendet, die wahrscheinlich schon vor der Infektion Abweichungen in ihrem zellulären Genom trugen (203). Um diese Diskrepanz zu umgehen, wurde das primäre T- Zell Latenz Modell (engl. Primary T- cell latency model) entwickelt. Dazu wurden, anstatt einer transformierten Zelllinie, $CD4^+$ T- Zellen von gesunden Blutspendern isoliert und durch aktivierende bzw. differenzierende Konditionen in der Zellkultur zu T_H1- Helferzellen (Typ1- T- Helferzellen), T_H2- Helferzellen (Typ2- T- Helferzellen) und NP $CD4^+$ T- Zellen (engl. non-polarized central memory T- cells) modifiziert (204;205). Die einzelnen Zellpopulationen wurden in Zellkulturmedium mit Interleukin- 2 kultiviert und mit einem defekten HIV- 1 Klon ohne funktionierendes *env*- Gen infiziert (206). Durch die Leserasterverschiebung im *env*- Gen findet nur eine einmalige Infektion in den Zellen statt. Das ermöglicht die Detektion von latent infizierten Zellen und unterbindet eine fortlaufende produktive Infektion und eine Virus- induzierte Apoptose der Zellen. Das defekte *env*- Gen wurde durch ein, auf einem separaten Plasmid kodierten, Hüllprotein ersetzt. Drei Tage nach der Infektion wurden die Zellen auf eine produktive Virusinfektion durch intrazelluläres Färben des viralen $p24^{gag}$ Protein untersucht. Einen hoher Gehalt an $p24^{gag}$ Protein ist ein Kennzeichen einer aktiven Infektion mit HIV- 1. Zellen mit einer aktiven Virusreplikation starben innerhalb der nächsten fünf Tage an Virus- induzierter Apoptose. Nur nicht- infizierte und latent infizierte Zellen überlebten die weitere Kultivierung. Sieben Tage nach der Infektion wurden die Zellen mit αCD3/ αCD28- Antikörper stimuliert und der $p24^{gag}$ Protein- Gehalt erneut gemessen. Zellen, die einen hohen $p24^{gag}$ Protein- Gehalt aufwiesen, waren latent mit HIV- 1 infiziert. Die Analyse der drei unterschiedlichen Populationen, T_H1- Helferzellen, T_H2- Helferzellen und NP $CD4^+$ T- Zellen, zeigten, dass die NP $CD4^+$ T- Zellen Population den höchsten Anteil an latent infizierten Zellen aufwiesen (203). NP $CD4^+$ T- Zellen zeigten in der DNA- Methylierung im 5´LTR signifikant mehr methylierte Proviren als die NP $CD4^+$ T- Zellen mit einer aktiven Infektion (122).

6.2.4 DNA- Methylierungsprofile von HIV- 1 proviralen Genomen in PBMC´s von HIV- 1 infizierten Probanden

Derzeit gibt es, außer meinen 2008 begonnenen Untersuchungen, drei Arbeiten zur DNA-Methylierung in HIV- 1 infizierten Menschen im HIV- 1 5´LTR.
Die erste Studie (121) zeigte, dass latent infizierte $CD4^+$ T- Zellen, isoliert aus avirämischen HIV- 1 Patienten, HIV- 1 Proviren mit methylierten CpG- Folgen im 5´LTR Promotor besaßen.
Eine weitere Studie bestätigte das Ergebnis in HIV- 1 infizierten Probanden, die mit antiretroviralen Medikamenten behandelt werden (123). In LTNPs und EC wurden einzelne methylierte CpG-Folgen im 5´LTR gefunden. In avirämischen Patienten unter antiretroviraler Therapie waren alle CpG- Folgen von HIV-1 proviralen Genomen im 5´LTR vollständig unmethyliert (126).
Im Gegensatz zu den bereits veröffentlichten Arbeiten (121;123;126), wurden in der Dissertation eine größere Gruppe von HIV- 1 infizierten Probanden mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf auf ihren CpG- Methylierungsstatus nicht nur im Bereich des 5´LTR untersucht, sondern auch im 3´LTR und in Teilbereichen des *gag* und *env*, sowie in den akzessorischen Genen *nef*, *rev* und *tat*. Die Studiengruppe setze sich aus 10 Frauen und 10 Männern zusammen. Sechs der Probanden waren EC, vier waren LTNPs und 10 waren in der chronischen Phase der HIV- 1 Infektion oder hatten bereits AIDS entwickelt.
In 19 der 20 Probanden wurden nicht methylierte CpG- Folgen in allen analysierten Bereichen gefunden (Abbildungen 22- 24, 26- 28). Die Ergebnisse bestätigen die Daten der anderen drei Studien für den 5´LTR (121;123;126), gehen aber in den Daten über andere Genombereiche über die veröffentlichten Ergebnisse hinaus. Die Ergebnisse aus der DNA von PBMCs implizieren, dass es andere nicht epigenetische Mechanismen geben muss, um die Latenz aufrecht zu erhalten. Nicht methylierte CpG- Dinukleotide können Immunantworten auslösen (207;208). Oligonukleotide, die nicht methylierte CpG- Dinukleotide enthalten, können als Antagonisten für den TLR9 (engl. Toll-like receptor 9) dienen (209-211). Der Polymorphismus des TLR9 spielt eine Rolle im Fortschreiten der HIV- 1 Erkrankung (212). TLR9 induziert die Interferon- alpha Produktion durch Plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) in HIV- 1 infizierten Patienten (213;214). Zudem schützen CpG- Folgen Monozytäre Zellen gegen eine von *vpr* geleitete Apoptose unabhängig von TLR9 (215). Nicht methylierte CpG- Folgen können dadurch am Überleben und der Persistenz des infizierten Monozytären Zellreservoirs mitarbeiten. Demzufolge spielen nicht methylierte CpG-Folgen im HIV- 1 Genom verschiedene Rollen in der HIV- 1 Immunpathogenese.
Die Probandin W- 1, eine LTNP, die seit den späten 1980- er Jahren HIV- 1 infiziert zu sein scheint, zeigte eine komplexere Situation in ihrem DNA- Methylierungsprofil (Abbildung 25). In zwei Zeitpunkten nach ihrer HIV- 1 Infektion waren zum Teil methylierte CpG- Folgen zu sehen, während die anderen zwei Zeitpunkte nur nicht methylierte CpG- Dinukleotide enthielten. Die zwei Zeitpunkte mit methylierten CpG- Folgen enthielten kein 5- hmC. Die Anwesenheit von 5- hmC wäre ein Hinweis für eine Demethylierung des HIV- 1 Provirus gewesen. Es ist möglich, das diese Diskrepanzen in der DNA- Methylierung durch die Integration des Virus an unterschiedlichen Stellen im Wirtsgenom zu verschiedenen Zeiten entstehen. In embryonischen Stammzellen der Maus ist die *de novo* Methylierung eines integrierten Plasmids vom Integrationsort abhängig (216).

Diese Aussage wird gestützt durch den Befund, dass die DMT CpG- Dinukleotide in bestimmten Sequenzen oder konformativer Umgebung *de novo* nicht methylieren kann (217).

6.2.5 HIV- 1 Latenz im Zellkulturmodell verglichen mit HIV- 1 Probanden

Die Zellkultur- Modelle zeigen, dass die DNA- Methylierung eine Rolle in der Latenz- Erhaltung von HIV- 1 infizierten Zellen spielt zumindestens unter den beschriebenen Bedingungen (120-122;181;199;200;212;218-223). Im Gegensatz dazu, lassen die Daten aus HIV- 1 infizierten Probanden erkennen, dass andere nicht epigenetische Prozesse wichtig für die HIV- 1 Latenz sind (121;123;126;224). Diese Diskrepanz kann durch die Annahme erklärt werden, dass spezifische CpG- Methylierungsprofile in HIV- 1 Genomen unter dem Druck der natürlichen Selektion in HIV-1 infizierten Menschen stehen. In Zellkultur gehaltene provirale Genome unterliegen dagegen nicht dem Druck des menschlichen Immunsystems.

6.2.6 Spezifische Mutationen von CpG- Folgen im HIV- 1 Provirus

CpG- Dinukleotide sind im HIV- 1 Genom fünffach unterrepräsentiert (116;208). Das Defizit an CpG- Dinukleotiden in Genomen ist durch die spontane Deaminierung von 5- mC zu TpG zu erklären (225).
Die Ergebnisse der Bisulfit- Sequenzierung der HIV- 1 infizierten Probanden zeigte, dass spezifische CpG- Folgen im Vergleich zur verwendeten HXB2 Sequenz, aufgrund von Mutationen, nicht mehr vorhanden waren. Im ersten untersuchten Bereich, der sich vom 5´LTR bis zu den ersten 132 Nukleotiden des *gag*- Gens erstreckte, waren die CpG- Folgen 20 und 29 häufig durch andere Dinukleotide ersetzt. Im zweiten analysierten Bereich, der die akzessorischen Gene *tat*, *rev* und *nef*, sowie das 3´LTR umfasst, wurden in der Mehrheit der untersuchten Probanden die CpG- Folgen 5 und 12 mutiert vorgefunden. Weitere Mutationen in anderen CpG- Positionen wurden weniger häufig beobachtet. Das Sequenzieren von nicht Bisulfit- behandelter DNA zeigte, dass die benachbarten Sequenzen nicht von Mutationen betroffen waren. Die beobachteten Mutationen sind in allen Probanden gefunden worden und wurden bestätigt durch Sequenzieren der gleichen DNA Proben mit dem normalen Sequenzierungsverfahren. Die Mutationen sind also nicht von der Anwendung der Bisulfit Methode abhängig oder verursacht. Das Screening von 12 zufällig gewählten proviralen LTR- Sequenzen aus der Los Alamos HIV- 1 Datenbank (143) zeigte Mutationen an denselben Positionen. Der Sequenzvergleich mit unterschiedlichen HIV- 1 Referenzstämmen (AF033819, HXB2 (K03455), pNL4-3 (AF324492), MN (M17449.1), JRFL (M38429.1), SF2 (K02007.1)) stellte sicher, dass die CpG- Verteilung in allen HIV- 1 Stämmen identisch war. Die beobachteten Mutationen waren somit nicht aufgrund der Verwendung des HXB2- Referenzstammes gefunden worden. Statistische Analysen bestätigten, dass die Mutation nicht zufällig sind ($p < 0{,}001$). Die CpG- Folgen könnten besonders empfindliche Stellen für das Überleben des HIV- 1 Provirus im Wirtsgenom darstellen und deswegen mutiert worden sein.

VII. Zusammenfassung

Die Integration fremder DNA in ein Wirtszellgenom ist ein häufiges Ereignis in der Natur, kann aber auch künstlich herbei geführt werden.
Etwa 45% des menschlichen Genoms bestehen aus fremder DNA. Die Integration von Fremd-DNA kann sich dabei funktionell sowohl auf das Wirtsgenom wie auch auf das Transgenom auswirken. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher der Einfluss der Integration von Fremd- DNA in ein menschliches Wirtsgenom untersucht. Als Modell wurden Einzelzellklone der Tumorzelllinie HCT- 116 mit stabil integriertem Plasmid zunächst auf Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster der endogenen Retroviren HERV- K und HERV- W sowie des Retrotransposons LINE 1 im Vergleich zu nicht transfizierten HCT- 116 Zellen untersucht. Da bei den drei ausgewählten Retroelementen keine signifikanten Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster im Vergleich zu Einzelzellklonen ohne Integrat beobachtet wurden, sind vertiefende GeneChip®Expressions Analysen durchgeführt worden. Die Transkriptionsaktivität der nicht transgenen wurde mit den transgenen Zellen verglichen. Bei 144 der 28.829 analysierten Genomabschnitte konnte eine Überexpression und bei weiteren 198 eine deutlich verminderte Genexpression beobachtet werden. Die Expressionsanalyse von fünf nicht transgenen Einzelzellklonen zeigte, dass die beobachteten Veränderungen in der Transkriptionsaktivität nicht auf der biologischen Variabilität der Kontrollen zurückzuführen sind. Die Integration von Fremd-DNA führte in den transgenen Zellen zu einem veränderten Expressionsmuster.

Integrierte virale DNA wird oftmals *de novo* methyliert um eine transkriptionelle Stilllegung des Integrats und eine damit verbundene Stabilisierung des Wirtszellgenoms zu erreichen.
Im zweiten Teil der Arbeit wurden Periphere Blutmonozyten (PBMC) HIV- 1 infizierter Probanden daraufhin untersucht, ob ein Zusammenhang im DNA- Methylierungsmuster von HIV- 1 proviralen Genomen und der Progression der HIV- 1 Erkrankung zu AIDS besteht. Hierfür wurden PBMCs von HIV- 1 infizierten Probanden mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf (long term nonprogressors, Elite- Controllers, chronisch mit HIV- 1 infizierte Probanden und an AIDS erkrankte Patienten) mittels Bisulfit- Sequenzierung genomischer DNA auf Veränderungen im Methylierungsstatus untersucht. In den proviralen Genomen wurden die 5´LTR und 3´LTR-Regionen sowie Teilbereichen in den viralen Genen von *gag*, *env*, *nef*, *rev* und *tat* analysiert.
Bei 19 von 20 untersuchten Probanden wurden nur vollständig nicht methylierte CpG- Dinukleotide beobachtet. Lediglich bei einer Probandin aus der Gruppe der long term nonprogressors, variierte der CpG- Methylierungstatus zwischen 0 und 75% in einem Zeitraum von 11 Jahren nach der Infektion. Eine Korrelation zwischen Viruslast und den zeitweisen Schwankungen im Methylierungsstatus des proviralen Genoms konnte nicht beobachtet werden.
Bei der Sequenzanalyse der Bisulfit- behandelten DNA aus den Patienten fiel auf, dass bestimmte CpG- Folgen an spezifischen Stellen im proviralen Genom immer wieder mutiert waren. Auch der Sequenzvergleich mit 12 zufällig ausgewählten proviralen HIV- 1 Sequenzen aus der Los Alamos HIV- 1 Sequenzdatenbank zeigten Mutationen an denselben Stellen. Die beobachteten Mutationen

könnten auf Schwachstellen im proviralen Genom hinweisen, die das Überleben des Virus im Wirtsgenom sichern.

Das hauptsächliche Vorkommen nicht methylierter CpG- Folgen im proviralen HIV- 1 Genom, lässt darauf schließen, dass es andere nicht epigenetische Mechanismen zum Erhalt der Latenz des HIV- 1 Provirus im zellulären Genom geben muss.

VIII. Abstract

The integration of foreign DNA into cellular genomes occurs frequently, but could also be induced artificially. About 45% of the human genome contains foreign DNA. It is known that integration of foreign DNA has an effect on both the host genome as well as on the transgenome. In the first part of this study, the impact of foreign DNA integration into a human genome was analyzed. As a model, single-cell clones of the human tumor cell line HCT- 116 were stably transfected with plasmid DNA and changes in the DNA methylation patterns of the endogenous retrovirus HERV-K and HERV-W as well as of the retrotransposon LINE 1 were analyzed. In relation to non-transfected HCT- 116 single cell clones, genomic integration of foreign DNA did not affect the methylation patterns of the three retroviral elements. Furthermore, GeneChip®expression arrays were performed and gene expression patterns of native and stably transfected cell clones were compared. In total 28.829 genes were investigated. Whereas, the expression level of 144 genes was increased, the expression of 198 genes was down regulated due to DNA integration. The expression analysis of five non-transgenic single cell clones showed that the observed changes in transcriptional activity are not due to the biological variability of the controls. The data demonstrate, that integration of foreign DNA influences the transcription level of the host cell.

Integrated viral DNA often becomes *de novo* methylated leading to transcriptional inactivation. In the second part of the thesis peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of HIV- 1 infected individuals were investigated for a possible relationship between DNA methylation patterns of HIV- 1 proviral genomes and the progression of HIV- 1 disease to AIDS. The DNA was isolated from individuals with quite different courses of HIV- 1 infection: long term nonprogressors, elite controllers, progressors, patients with AIDS. DNA methylation patterns of the proviral HIV- 1 5´ and 3´LTR as well as of portions of the viral genes *gag*, *env*, *nef*, *rev*, and *tat* were then analyzed by the bisulfite sequencing technique. Whereas, the DNA specimens of 19 of the 20 HIV- 1 infected individuals indicated that the proviral DNA was completely unmethylated in all sequences analyzed, one long-term non-progressor could be identified whose DNA showed differences in the proviral methylation pattern. The overall percentage of methylated CpG´s in the proviral DNA of this donor varied between 0 and 75% at different times after infection. The analyses in this individual covered a time course of 11 years. Interestingly, no correlation between viral load and methylation rate could be observed. Surprisingly however, irrespective of the phenotype of disease progression, several CpG dinucleotides located at specific sites in the proviral HIV- 1 genome could be identified. These CpG's were mutated in the majority of patients. Comparative analyses of these nucleotide sequences to 12 randomly selected sequences in the Los Alamos HIV- 1 database verify these CpG´s as actual mutational hotspots. Taken together, the preferentially mutated CpG´s may indicate weak sites in the HIV- 1 proviral genome that might somehow secure the survival of the provirus in the host genome. Moreover, the data demonstrate that the degree of proviral DNA methylation may fluctuate temporally. The marked predominance of unmethylated CpG's in the HIV- 1 proviral genome indicates that proviral DNA methylation may not the dominant regulator of HIV- 1 gene silencing in PBMC's.

IX. Literaturverzeichnis

(1) Waddington CH. The epigenotype. 1942. Int J Epidemiol 2012 February;41(1):10-3.
(2) Liu L, Li Y, Tollefsbol TO. Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. Curr Issues Mol Biol 2008;10(1-2):25-36.
(3) Chong S, Whitelaw E. Epigenetic germline inheritance. Curr Opin Genet Dev 2004 December;14(6):692-6.
(4) Johnson TB, Coghill RD. Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methyl-cytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus. J Am Chem Soc 1925 November 5;47:2838-44.
(5) HOTCHKISS RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. J Biol Chem 1948 August;175(1):315-32.
(6) Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. Cell 1985 January;40(1):91-9.
(7) Antequera F, Bird A. CpG islands. EXS 1993;64:169-85.
(8) Doerfler W. DNA methylation and gene activity. Annu Rev Biochem 1983;52:93-124.
(9) Doerfler W. DNA methylation--a regulatory signal in eukaryotic gene expression. J Gen Virol 1981 November;57(Pt 1):1-20.
(10) Langner KD, Vardimon L, Renz D, Doerfler W. DNA methylation of three 5' C-C-G-G 3' sites in the promoter and 5' region inactivate the E2a gene of adenovirus type 2. Proc Natl Acad Sci U S A 1984 May;81(10):2950-4.
(11) Sutter D, Doerfler W. Methylation of integrated viral DNA sequences in hamster cells transformed by adenovirus 12. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1980;44 Pt 1,565-8.
(12) Vardimon L, Neumann R, Kuhlmann I, Sutter D, Doerfler W. DNA methylation and viral gene expression in adenovirus-transformed and -infected cells. Nucleic Acids Res 1980 June 11;8(11):2461-73.
(13) Chen T, Li E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. Curr Top Microbiol Immunol 2006;301:179-201.
(14) Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 June 21;102(25):8905-9.
(15) Yoder JA, Soman NS, Verdine GL, Bestor TH. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. J Mol Biol 1997 July 18;270(3):385-95.
(16) Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell 1992 June 12;69(6):915-26.
(17) Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. Development 2002 April;129(8):1983-93.
(18) Chedin F, Lieber MR, Hsieh CL. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 December 24;99(26):16916-21.
(19) Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. J Biol Chem 2004 June 25;279(26):27816-23.
(20) Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, Chedin F. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. J Cell Biochem 2005 August 1;95(5):902-17.
(21) Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A. Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. J Biol Chem 2005 April 8;280(14):13341-8.
(22) Kareta MS, Botello ZM, Ennis JJ, Chou C, Chedin F. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. J Biol Chem 2006 September 8;281(36):25893-902.
(23) Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. Mol Cell Biol 2003 August;23(16):5594-605.
(24) Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X et al. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. Science 2006 January 20;311(5759):395-8.
(25) Cheng X, Hashimoto H, Horton JR, Zhang X. Mechanisms of DNA Methylation, Methyl-CpG Recognition, and Demethylation in Mammals. In: Academic Press, editor. Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. 2010. p. 9-24.

(26) Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science 2009 May 15;324(5929):930-5.
(27) WYATT GR, COHEN SS. The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. Biochem J 1953 December;55(5):774-82.
(28) Wiberg JS. Amber mutants of bacteriophage T4 defective in deoxycytidine diphosphatase and deoxycytidine triphosphatase. On the role of 5-hydroxymethylcytosine in bacteriophage deoxyribonucleic acid. J Biol Chem 1967 December 25;242(24):5824-9.
(29) Anisymova NI, Gabrilovich IM, Soshina NV, Cherenkevich SN. 5-Hydroxymethylcytosine-containing Klebsiella bacteriophage. Biochim Biophys Acta 1969 September 17;190(1):225-7.
(30) Fleischman RA, Cambell JL, Richardson CC. Modification and restriction of T-even bacteriophages. In vitro degradation of deoxyribonucleic acid containing 5-hydroxymethylctosine. J Biol Chem 1976 March 25;251(6):1561-70.
(31) Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. Science 2009 May 15;324(5929):929-30.
(32) Szwagierczak A, Bultmann S, Schmidt CS, Spada F, Leonhardt H. Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids Res 2010 October;38(19):e181.
(33) Haffner MC, Chaux A, Meeker AK, Esopi DM, Gerber J, Pellakuru LG et al. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. Oncotarget 2011 August;2(8):627-37.
(34) Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X et al. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. Nat Biotechnol 2011 January;29(1):68-72.
(35) Yang H, Liu Y, Bai F, Zhang JY, Ma SH, Liu J et al. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. Oncogene 2013 January 31;32(5):663-9.
(36) Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science 2009 May 15;324(5929):930-5.
(37) Delhommeau F, Dupont S, Della V, V, James C, Trannoy S, Masse A et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med 2009 May 28;360(22):2289-301.
(38) Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. Nat Genet 2009 July;41(7):838-42.
(39) Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. Cell 2012 September 14;150(6):1135-46.
(40) Waalwijk C, Flavell RA. MspI, an isoschizomer of hpaII which cleaves both unmethylated and methylated hpaII sites. Nucleic Acids Res 1978 September;5(9):3231-6.
(41) Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A 1992 March 1;89(5):1827-31.
(42) Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. Nucleic Acids Res 1994 August 11;22(15):2990-7.
(43) Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. EMBO Rep 2002 March;3(3):224-9.
(44) Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. Nature 2000 January 6;403(6765):41-5.
(45) Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell 2009 February 20;136(4):642-55.
(46) Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. Science 2007 December 21;318(5858):1931-4.
(47) Vasudevan S, Steitz JA. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. Cell 2007 March 23;128(6):1105-18.
(48) Brenner C, Fuks F. DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. Curr Top Microbiol Immunol 2006;301:45-66.
(49) Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. Nature 2002 April 4;416(6880):556-60.

(50) Selker EU, Tountas NA, Cross SH, Margolin BS, Murphy JG, Bird AP et al. The methylated component of the Neurospora crassa genome. Nature 2003 April 24;422(6934):893-7.
(51) Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. Nucleic Acids Res 2003 May 1;31(9):2305-12.
(52) Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S et al. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. Curr Biol 2003 July 15;13(14):1192-200.
(53) Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. J Biol Chem 2003 February 7;278(6):4035-40.
(54) Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet 1998 June;19(2):187-91.
(55) Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature 1998 May 28;393(6683):386-9.
(56) TRENTIN JJ, YABE Y, TAYLOR G. The quest for human cancer viruses. Science 1962 September 14;137(3533):835-41.
(57) Doerfler W. The fate of the DNA of adenovirus type 12 in baby hamster kidney cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1968 June;60(2):636-43.
(58) Doerfler W. Integration of the deoxyribonucleic acid of adenovirus type 12 into the deoxyribonucleic acid of baby hamster kidney cells. J Virol 1970 November;6(5):652-66.
(59) Doerfler W. Adenoviral DNA integration and changes in DNA methylation patterns: a different view of insertional mutagenesis. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1993;46:1-36.
(60) Doerfler W, Orend G, Schubbert R, Fechteler K, Heller H, Wilgenbus P et al. On the insertion of foreign DNA into mammalian genomes: mechanism and consequences. Gene 1995 May 19;157(1-2):241-5.
(61) Orend G, Linkwitz A, Doerfler W. Selective sites of adenovirus (foreign) DNA integration into the hamster genome: changes in integration patterns. J Virol 1994 January;68(1):187-94.
(62) HUEBNER RJ, ROWE WP, LANE WT. Oncogenic effects in hamsters of human adenovirus types 12 and 18. Proc Natl Acad Sci U S A 1962 December 15;48:2051-8.
(63) YABE Y, TRENTIN JJ, TAYLOR G. Cancer induction in hamsters by human type 12 adenovirus. Effect of age and of virus dose. Proc Soc Exp Biol Med 1962 November;111:343-4.
(64) Schulz M, Freisem-Rabien U, Jessberger R, Doerfler W. Transcriptional activities of mammalian genomes at sites of recombination with foreign DNA. J Virol 1987 February;61(2):344-53.
(65) Hochstein N, Muiznieks I, Mangel L, Brondke H, Doerfler W. Epigenetic status of an adenovirus type 12 transgenome upon long-term cultivation in hamster cells. J Virol 2007 May;81(10):5349-61.
(66) Heller H, Kammer C, Wilgenbus P, Doerfler W. Chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage lambda) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments. Proc Natl Acad Sci U S A 1995 June 6;92(12):5515-9.
(67) Kuff EL, Mietz JA, Trounstine ML, Moore KW, Martens CL. cDNA clones encoding murine IgE-binding factors represent multiple structural variants of intracisternal A-particle genes. Proc Natl Acad Sci U S A 1986 September;83(17):6583-7.
(68) Meyer zu AG, Heller H, Wilgenbus P, Tjia ST, Doerfler W. Chromosomal distribution of the hamster intracisternal A-particle (IAP) retrotransposons. Chromosoma 1996;104(5):341-4.
(69) Remus R, Kammer C, Heller H, Schmitz B, Schell G, Doerfler W. Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. J Virol 1999 February;73(2):1010-22.
(70) Muller K, Heller H, Doerfler W. Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes. J Biol Chem 2001 April 27;276(17):14271-8.
(71) Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001 February 15;409(6822):860-921.
(72) Kazazian HH, Jr., Moran JV. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. Nat Genet 1998 May;19(1):19-24.
(73) Knippers R. Molekulare Genetik; 9. Auflage. Thieme; 2006.

(74) Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. 1970. Biotechnology 1992;24:51-6.
(75) Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. Nature 1970 June 27;226(5252):1209-11.
(76) Ono M. Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes. J Virol 1986 June;58(3):937-44.
(77) Lower R, Lower J, Kurth R. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. Proc Natl Acad Sci U S A 1996 May 28;93(11):5177-84.
(78) Holmes EC. Ancient lentiviruses leave their mark. Proc Natl Acad Sci U S A 2007 April 10;104(15):6095-6.
(79) Medstrand P, Blomberg J. Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues. J Virol 1993 November;67(11):6778-87.
(80) Seifarth W, Baust C, Murr A, Skladny H, Krieg-Schneider F, Blusch J et al. Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles. J Virol 1998 October;72(10):8384-91.
(81) Nelson PN, Hooley P, Roden D, Davari EH, Rylance P, Warren P et al. Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? Clin Exp Immunol 2004 October;138(1):1-9.
(82) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Nature 1998 July 23;394(6691):388-92.
(83) Ostertag EM, Goodier JL, Zhang Y, Kazazian HH, Jr. SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. Am J Hum Genet 2003 December;73(6):1444-51.
(84) Samuelson LC, Wiebauer K, Snow CM, Meisler MH. Retroviral and pseudogene insertion sites reveal the lineage of human salivary and pancreatic amylase genes from a single gene during primate evolution. Mol Cell Biol 1990 June;10(6):2513-20.
(85) Golovkina TV, Chervonsky A, Dudley JP, Ross SR. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. Cell 1992 May 15;69(4):637-45.
(86) DeMartini JC, Carlson JO, Leroux C, Spencer T, Palmarini M. Endogenous retroviruses related to jaagsiekte sheep retrovirus. Curr Top Microbiol Immunol 2003;275:117-37.
(87) Lower R, Boller K, Hasenmaier B, Korbmacher C, Muller-Lantzsch N, Lower J et al. Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. Proc Natl Acad Sci U S A 1993 May 15;90(10):4480-4.
(88) Mueller-Lantzsch N, Sauter M, Weiskircher A, Kramer K, Best B, Buck M et al. Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease. AIDS Res Hum Retroviruses 1993 April;9(4):343-50.
(89) Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. Nature 2000 February 17;403(6771):785-9.
(90) Frendo JL, Olivier D, Cheynet V, Blond JL, Bouton O, Vidaud M et al. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. Mol Cell Biol 2003 May;23(10):3566-74.
(91) Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S et al. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. J Virol 2000 April;74(7):3321-9.
(92) Gong R, Peng X, Kang S, Feng H, Huang J, Zhang W et al. Structural characterization of the fusion core in syncytin, envelope protein of human endogenous retrovirus family W. Biochem Biophys Res Commun 2005 June 17;331(4):1193-200.
(93) Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983 May 20;220(4599):868-71.
(94) Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science 1986 July 18;233(4761):343-6.
(95) hivbuch.de. Internet 2013;Available from: URL: http://hivbuch.de/category/teil-1-grundlagen/3-pathophysiologie-der-hiv-infektion/

(96) Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Molekulare Virologie; 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
(97) Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. Nature 1998 January 22;391(6665):397-401.
(98) Peter F. HIV nef: the mother of all evil? Immunity 1998 October;9(4):433-7.
(99) Miller RH, Sarver N. HIV accessory proteins as therapeutic targets. Nat Med 1997 April;3(4):389-94.
(100) Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. Nature 2008 January 24;451(7177):425-30.
(101) Kuhl A, Munch J, Sauter D, Bertram S, Glowacka I, Steffen I et al. Calcium-modulating cyclophilin ligand does not restrict retrovirus release. Nat Med 2010 February;16(2):155-6.
(102) Cullen BR. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. Cell 1998 May 29;93(5):685-92.
(103) Khan MA, Aberham C, Kao S, Akari H, Gorelick R, Bour S et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. J Virol 2001 August;75(16):7252-65.
(104) Metzger DS, Woody GE, O'Brien CP. Drug treatment as HIV prevention: a research update. J Acquir Immune Defic Syndr 2010 December;55 Suppl 1:S32-S36.
(105) Anzala OA, Nagelkerke NJ, Bwayo JJ, Holton D, Moses S, Ngugi EN et al. Rapid progression to disease in African sex workers with human immunodeficiency virus type 1 infection. J Infect Dis 1995 March;171(3):686-9.
(106) Khanlou H, Salmon-Ceron D, Sicard D. [Characteristics of rapid progressors in HIV infection]. Ann Med Interne (Paris) 1997;148(2):163-6.
(107) Buchbinder SP, Katz MH, Hessol NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. AIDS 1994 August;8(8):1123-8.
(108) Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. N Engl J Med 1995 January 26;332(4):201-8.
(109) Levy JA. HIV pathogenesis and long-term survival. AIDS 1993 November;7(11):1401-10.
(110) Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Elbeik T, Staprans SI, Feinberg MB et al. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses 1996 May 1;12(7):585-92.
(111) Poropatich K, Sullivan DJ, Jr. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. J Gen Virol 2011 February;92(Pt 2):247-68.
(112) Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. Immunity 2007 September;27(3):406-16.
(113) Okulicz JF, Lambotte O. Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers. Curr Opin HIV AIDS 2011 May;6(3):163-8.
(114) Nisole S, Stoye JP, Saib A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. Nat Rev Microbiol 2005 October;3(10):799-808.
(115) Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
(116) Karlin S, Doerfler W, Cardon LR. Why is CpG suppressed in the genomes of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses? J Virol 1994 May;68(5):2889-97.
(117) Shpaer EG, Mullins JI. Selection against CpG dinucleotides in lentiviral genes: a possible role of methylation in regulation of viral expression. Nucleic Acids Res 1990 October 11;18(19):5793-7.
(118) Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. Curr Opin Genet Dev 1993 April;3(2):226-31.
(119) Taniguchi Y, Nosaka K, Yasunaga J, Maeda M, Mueller N, Okayama A et al. Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. Retrovirology 2005;2:64.
(120) Ishida T, Hamano A, Koiwa T, Watanabe T. 5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals. Retrovirology 2006;3:69.
(121) Blazkova J, Trejbalova K, Gondois-Rey F, Halfon P, Philibert P, Guiguen A et al. CpG methylation controls reactivation of HIV from latency. PLoS Pathog 2009 August;5(8):e1000554.
(122) Kauder SE, Bosque A, Lindqvist A, Planelles V, Verdin E. Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. PLoS Pathog 2009 June;5(6):e1000495.

(123) Blazkova J, Murray D, Justement JS, Funk EK, Nelson AK, Moir S et al. Paucity of HIV DNA methylation in latently infected, resting CD4+ T cells from infected individuals receiving antiretroviral therapy. J Virol 2012 May;86(9):5390-2.
(124) Duverger A, Jones J, May J, Bibollet-Ruche F, Wagner FA, Cron RQ et al. Determinants of the establishment of human immunodeficiency virus type 1 latency. J Virol 2009 April;83(7):3078-93.
(125) Karn J. The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. Curr Opin HIV AIDS 2011 January;6(1):4-11.
(126) Palacios JA, Perez-Pinar T, Toro C, Sanz-Minguela B, Moreno V, Valencia E et al. Long-term nonprogressor and elite controller patients who control viremia have a higher percentage of methylation in their HIV-1 proviral promoters than aviremic patients receiving highly active antiretroviral therapy. J Virol 2012 December;86(23):13081-4.
(127) Weber S. Veränderungen im Methylierungsmuster endogener retroviraler DNA Sequenzen nach Integration fremder DNA in das Genom menschlicher Zellen 2007.
(128) O'Doherty U, Swiggard WJ, Jeyakumar D, McGain D, Malim MH. A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration. J Virol 2002 November;76(21):10942-50.
(129) Butler SL, Hansen MS, Bushman FD. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. Nat Med 2001 May;7(5):631-4.
(130) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. Biotechnology 1992;24:476-80.
(131) Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene 1990 November 30;96(1):23-8.
(132) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnology 1992;24:104-8.
(133) Weber S. Veränderungen im Methylierungsmuster endogener retroviraler DNA Sequenzen nach Integration fremder DNA in das Genom menschlicher Zellen 2007.
(134) Mayer J, Sauter M, Racz A, Scherer D, Mueller-Lantzsch N, Meese E. An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. Nat Genet 1999 March;21(3):257-8.
(135) Bukrinsky M, Sharova N, Stevenson M. Human immunodeficiency virus type 1 2-LTR circles reside in a nucleoprotein complex which is different from the preintegration complex. J Virol 1993 November;67(11):6863-5.
(136) Farnet CM, Haseltine WA. Circularization of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. J Virol 1991 December;65(12):6942-52.
(137) Sloan RD, Kuhl BD, Donahue DA, Roland A, Bar-Magen T, Wainberg MA. Transcription of preintegrated HIV-1 cDNA modulates cell surface expression of major histocompatibility complex class I via Nef. J Virol 2011 March;85(6):2828-36.
(138) Wu Y, Marsh JW. Gene transcription in HIV infection. Microbes Infect 2003 September;5(11):1023-7.
(139) Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, Grobler JA et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. Science 2000 January 28;287(5453):646-50.
(140) Friedrich B, Li G, Dziuba N, Ferguson MR. Quantitative PCR used to assess HIV-1 integration and 2-LTR circle formation in human macrophages, peripheral blood lymphocytes and a CD4+ cell line. Virol J 2010;7:354.
(141) Liszewski MK, Yu JJ, O'Doherty U. Detecting HIV-1 integration by repetitive-sampling Alu-gag PCR. Methods 2009 April;47(4):254-60.
(142) Jin SG, Kadam S, Pfeifer GP. Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. Nucleic Acids Res 2010 June;38(11):e125.
(143) Los Alamos HIV Sequence Database [computer program]. 2005.
(144) Lueders KK, Kuff EL. Sequences homologous to retrovirus-like genes of the mouse are present in multiple copies in the Syrian hamster genome. Nucleic Acids Res 1981 November 25;9(22):5917-30.
(145) Ono M, Ohishi H. Long terminal repeat sequences of intracisternal A particle genes in the Syrian hamster genome: identification of tRNAPhe as a putative primer tRNA. Nucleic Acids Res 1983 October 25;11(20):7169-79.
(146) Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. Nature 1997 May 8;387(6629):183-8.

(147) Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. Nat Med 1999 May;5(5):512-7.
(148) Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. Annu Rev Immunol 2000;18:665-708.
(149) Collman R, Hassan NF, Walker R, Godfrey B, Cutilli J, Hastings JC et al. Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types. J Exp Med 1989 October 1;170(4):1149-63.
(150) Orenstein JM, Fox C, Wahl SM. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. Science 1997 June 20;276(5320):1857-61.
(151) Ho DD, Rota TR, Hirsch MS. Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. J Clin Invest 1986 May;77(5):1712-5.
(152) Nicholson JK, Cross GD, Callaway CS, McDougal JS. In vitro infection of human monocytes with human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV). J Immunol 1986 July 1;137(1):323-9.
(153) Aquaro S, Calio R, Balzarini J, Bellocchi MC, Garaci E, Perno CF. Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir. Antiviral Res 2002 August;55(2):209-25.
(154) Chun TW, Davey RT, Jr., Engel D, Lane HC, Fauci AS. Re-emergence of HIV after stopping therapy. Nature 1999 October 28;401(6756):874-5.
(155) Davey RT, Jr., Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. Proc Natl Acad Sci U S A 1999 December 21;96(26):15109-14.
(156) Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. Proc Natl Acad Sci U S A 1998 July 21;95(15):8869-73.
(157) Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. Nat Med 2003 June;9(6):727-8.
(158) Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Large D, Semerjian A, Curlin ME et al. HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. J Clin Invest 2005 November;115(11):3250-5.
(159) Jones KA, Kadonaga JT, Luciw PA, Tjian R. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. Science 1986 May 9;232(4751):755-9.
(160) Garcia JA, Harrich D, Soultanakis E, Wu F, Mitsuyasu R, Gaynor RB. Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. EMBO J 1989 March;8(3):765-78.
(161) Zenzie-Gregory B, Sheridan P, Jones KA, Smale ST. HIV-1 core promoter lacks a simple initiator element but contains a bipartite activator at the transcription start site. J Biol Chem 1993 July 25;268(21):15823-32.
(162) Perkins ND, Edwards NL, Duckett CS, Agranoff AB, Schmid RM, Nabel GJ. A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. EMBO J 1993 September;12(9):3551-8.
(163) Garcia-Rodriguez C, Rao A. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). J Exp Med 1998 June 15;187(12):2031-6.
(164) Rittner K, Churcher MJ, Gait MJ, Karn J. The human immunodeficiency virus long terminal repeat includes a specialised initiator element which is required for Tat-responsive transcription. J Mol Biol 1995 May 5;248(3):562-80.
(165) Sodroski J, Patarca R, Rosen C, Wong-Staal F, Haseltine W. Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. Science 1985 July 5;229(4708):74-7.
(166) Sodroski J, Rosen C, Wong-Staal F, Salahuddin SZ, Popovic M, Arya S et al. Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. Science 1985 January 11;227(4683):171-3.
(167) Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J et al. HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. EMBO J 1990 December;9(12):4145-53.
(168) Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J et al. Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 1989 September;86(18):6925-9.

(169) Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. Cell 1998 February 20;92(4):451-62.
(170) Herrmann CH, Rice AP. Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. J Virol 1995 March;69(3):1612-20.
(171) Parada CA, Roeder RG. Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. Nature 1996 November 28;384(6607):375-8.
(172) Kim YK, Bourgeois CF, Isel C, Churcher MJ, Karn J. Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated transcriptional elongation. Mol Cell Biol 2002 July;22(13):4622-37.
(173) Liou LY, Herrmann CH, Rice AP. Transient induction of cyclin T1 during human macrophage differentiation regulates human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivation function. J Virol 2002 November;76(21):10579-87.
(174) Peterlin BM, Price DH. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. Mol Cell 2006 August 4;23(3):297-305.
(175) Tyagi M, Pearson RJ, Karn J. Establishment of HIV latency in primary CD4+ cells is due to epigenetic transcriptional silencing and P-TEFb restriction. J Virol 2010 July;84(13):6425-37.
(176) Colin L, Van LC. Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. Retrovirology 2009;6:111.
(177) Verdin E. DNase I-hypersensitive sites are associated with both long terminal repeats and with the intragenic enhancer of integrated human immunodeficiency virus type 1. J Virol 1991 December;65(12):6790-9.
(178) Verdin E, Paras P, Jr., Van LC. Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. EMBO J 1993 August;12(8):3249-59.
(179) Jordan A, Defechereux P, Verdin E. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. EMBO J 2001 April 2;20(7):1726-38.
(180) Jordan A, Bisgrove D, Verdin E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. EMBO J 2003 April 15;22(8):1868-77.
(181) Chavez L, Kauder S, Verdin E. In vivo, in vitro, and in silico analysis of methylation of the HIV-1 provirus. Methods 2011 January;53(1):47-53.
(182) Tyagi M, Karn J. CBF-1 promotes transcriptional silencing during the establishment of HIV-1 latency. EMBO J 2007 December 12;26(24):4985-95.
(183) Coull JJ, Romerio F, Sun JM, Volker JL, Galvin KM, Davie JR et al. The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. J Virol 2000 August;74(15):6790-9.
(184) Hsia SC, Shi YB. Chromatin disruption and histone acetylation in regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by thyroid hormone receptor. Mol Cell Biol 2002 June;22(12):4043-52.
(185) Williams SA, Chen LF, Kwon H, Ruiz-Jarabo CM, Verdin E, Greene WC. NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. EMBO J 2006 January 11;25(1):139-49.
(186) Marban C, Suzanne S, Dequiedt F, de WS, Redel L, Van LC et al. Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. EMBO J 2007 January 24;26(2):412-23.
(187) Imai K, Okamoto T. Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4. J Biol Chem 2006 May 5;281(18):12495-505.
(188) Friedman J, Cho WK, Chu CK, Keedy KS, Archin NM, Margolis DM et al. Epigenetic silencing of HIV-1 by the histone H3 lysine 27 methyltransferase enhancer of Zeste 2. J Virol 2011 September;85(17):9078-89.
(189) Choudhary SK, Margolis DM. Curing HIV: Pharmacologic approaches to target HIV-1 latency. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2011;51:397-418.
(190) Margolis DM. Histone deacetylase inhibitors and HIV latency. Curr Opin HIV AIDS 2011 January;6(1):25-9.
(191) Hakre S, Chavez L, Shirakawa K, Verdin E. Epigenetic regulation of HIV latency. Curr Opin HIV AIDS 2011 January;6(1):19-24.
(192) Bowman MC, Archin NM, Margolis DM. Pharmaceutical approaches to eradication of persistent HIV infection. Expert Rev Mol Med 2009;11:e6.

(193) Savarino A, Mai A, Norelli S, El DS, Valente S, Rotili D et al. "Shock and kill" effects of class I-selective histone deacetylase inhibitors in combination with the glutathione synthesis inhibitor buthionine sulfoximine in cell line models for HIV-1 quiescence. Retrovirology 2009;6:52.

(194) Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, Choudhary SK, Kuruc JD, Crooks AM et al. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. Nature 2012 July 26;487(7408):482-5.

(195) Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. Cell Mol Life Sci 2002 February;59(2):241-57.

(196) Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. Genes Dev 1988 September;2(9):1136-43.

(197) Wolffe AP. Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription. Trends Biochem Sci 1994 June;19(6):240-4.

(198) Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet 1998 June;19(2):187-91.

(199) Bednarik DP, Cook JA, Pitha PM. Inactivation of the HIV LTR by DNA CpG methylation: evidence for a role in latency. EMBO J 1990 April;9(4):1157-64.

(200) Schulze-Forster K, Gotz F, Wagner H, Kroger H, Simon D. Transcription of HIV1 is inhibited by DNA methylation. Biochem Biophys Res Commun 1990 April 16;168(1):141-7.

(201) Singh MK, Pauza CD. Extrachromosomal human immunodeficiency virus type 1 sequences are methylated in latently infected U937 cells. Virology 1992 June;188(2):451-8.

(202) Bieniasz PD, Cullen BR. Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells. J Virol 2000 November;74(21):9868-77.

(203) Bosque A, Planelles V. Induction of HIV-1 latency and reactivation in primary memory CD4+ T cells. Blood 2009 January 1;113(1):58-65.

(204) Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. Nat Immunol 2003 January;4(1):78-86.

(205) Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. J Exp Med 2004 September 20;200(6):725-35.

(206) Andersen JL, DeHart JL, Zimmerman ES, Ardon O, Kim B, Jacquot G et al. HIV-1 Vpr-induced apoptosis is cell cycle dependent and requires Bax but not ANT. PLoS Pathog 2006 December;2(12):e127.

(207) Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. J Immunol 2000 January 15;164(2):944-53.

(208) Krieg AM. Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. Trends Microbiol 1996 February;4(2):73-6.

(209) Malaspina A, Moir S, DiPoto AC, Ho J, Wang W, Roby G et al. CpG oligonucleotides enhance proliferative and effector responses of B Cells in HIV-infected individuals. J Immunol 2008 July 15;181(2):1199-206.

(210) Jiang W, Lederman MM, Mohner RJ, Rodriguez B, Nedrich TM, Harding CV et al. Impaired naive and memory B-cell responsiveness to TLR9 stimulation in human immunodeficiency virus infection. J Virol 2008 August;82(16):7837-45.

(211) Suwarti S, Yamazaki T, Svetlana C, Hanagata N. Recognition of CpG oligodeoxynucleotides by human Toll-like receptor 9 and subsequent cytokine induction. Biochem Biophys Res Commun 2013 January 25;430(4):1234-9.

(212) Pine SO, McElrath MJ, Bochud PY. Polymorphisms in toll-like receptor 4 and toll-like receptor 9 influence viral load in a seroincident cohort of HIV-1-infected individuals. AIDS 2009 November 27;23(18):2387-95.

(213) Kaushik S, Teque F, Patel M, Fujimura SH, Schmidt B, Levy JA. Plasmacytoid dendritic cell number and responses to Toll-like receptor 7 and 9 agonists vary in HIV Type 1-infected individuals in relation to clinical state. AIDS Res Hum Retroviruses 2013 March;29(3):501-10.

(214) Chung NP, Matthews K, Klasse PJ, Sanders RW, Moore JP. HIV-1 gp120 impairs the induction of B cell responses by TLR9-activated plasmacytoid dendritic cells. J Immunol 2012 December 1;189(11):5257-65.

(215) Saxena M, Busca A, Pandey S, Kryworuchko M, Kumar A. CpG protects human monocytic cells against HIV-Vpr-induced apoptosis by cellular inhibitor of apoptosis-2 through the calcium-activated JNK pathway in a TLR9-independent manner. J Immunol 2011 December 1;187(11):5865-78.

(216) Hertz JM, Schell G, Doerfler W. Factors affecting de novo methylation of foreign DNA in mouse embryonic stem cells. J Biol Chem 1999 August 20;274(34):24232-40.
(217) Jurkowska RZ, Ceccaldi A, Zhang Y, Arimondo PB, Jeltsch A. DNA methyltransferase assays. Methods Mol Biol 2011;791:157-77.
(218) Bednarik DP, Mosca JD, Raj NB. Methylation as a modulator of expression of human immunodeficiency virus. J Virol 1987 April;61(4):1253-7.
(219) Fang JY, Mikovits JA, Bagni R, Petrow-Sadowski CL, Ruscetti FW. Infection of lymphoid cells by integration-defective human immunodeficiency virus type 1 increases de novo methylation. J Virol 2001 October;75(20):9753-61.
(220) Gutekunst KA, Kashanchi F, Brady JN, Bednarik DP. Transcription of the HIV-1 LTR is regulated by the density of DNA CpG methylation. J Acquir Immune Defic Syndr 1993 June;6(6):541-9.
(221) Mok HP, Lever AM. Chromatin, gene silencing and HIV latency. Genome Biol 2007;8(11):228.
(222) Jeeninga RE, Westerhout EM, van Gerven ML, Berkhout B. HIV-1 latency in actively dividing human T cell lines. Retrovirology 2008;5:37.
(223) Tanaka J, Ishida T, Choi BI, Yasuda J, Watanabe T, Iwakura Y. Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle -dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR. AIDS 2003 January 24;17(2):167-75.
(224) Murphy B, Hillman C, Mok M, Vapniarsky N. Lentiviral latency in peripheral CD4+ T cells isolated from feline immunodeficiency virus-infected cats during the asymptomatic phase is not associated with hypermethylation of the proviral promoter. Virus Res 2012 October;169(1):117-26.
(225) Holliday R, Grigg GW. DNA methylation and mutation. Mutat Res 1993 January;285(1):61-7.

X. Anhang

10.1 Plasmidkarten

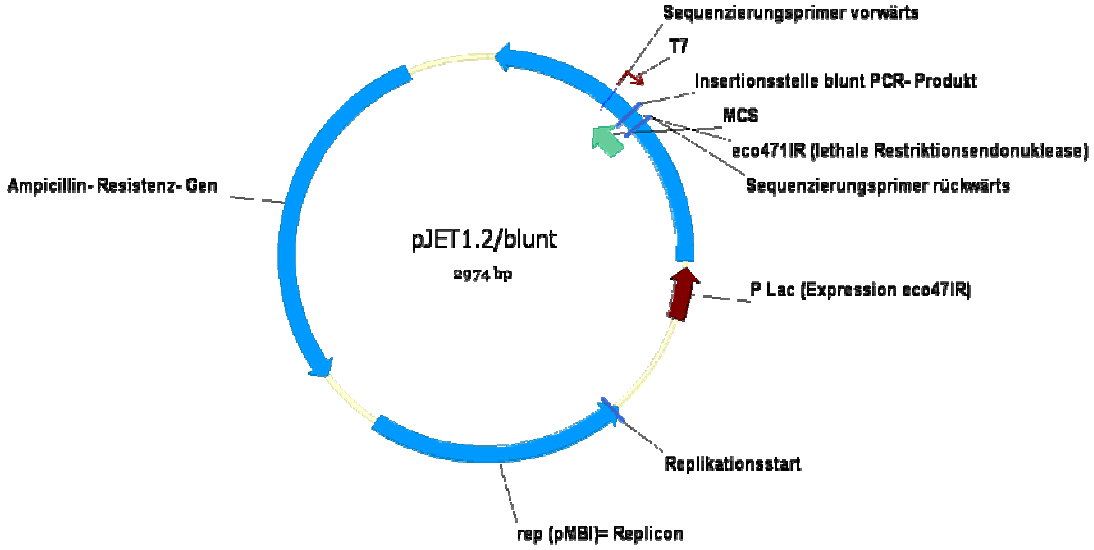

Abbildung 29: Plasmidkarte pJET1.2/ blunt von Fermentas

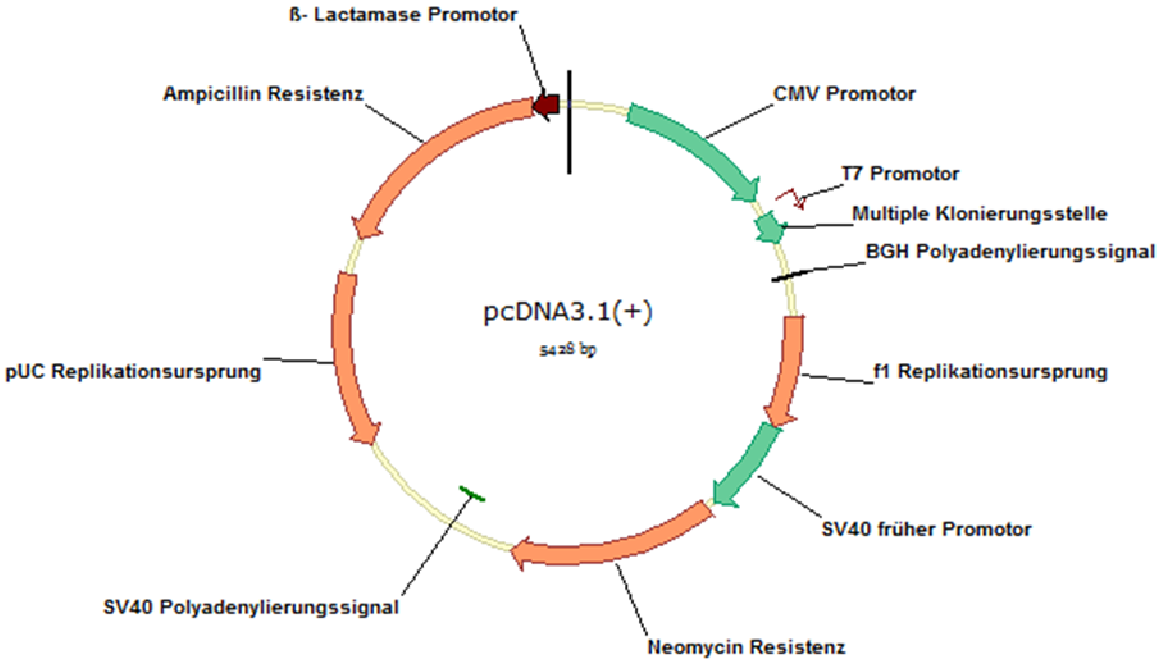

Abbildung 30: Plasmidkarte pcDNA3.1(+)

10.2 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie- abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen- noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Walter Doerfler betreut worden.

Erlangen im Mai 2013

Stefanie Weber

10.3 Veröffentlichungen

Teilpublikationen:

Weber, S., Weiser, B., Burger, H., Ramirez Kitchen, C., Kemal, K., Korn, K., Anastos, K., Kaul, R., Kovacs, C., and Doerfler, W. (2013)
„Epigenetic Analysis of HIV- 1 Proviral Genomes from Infected Individuals: Predominance of Unmethylated CpG´s" *Virology* under revision

Naumann, A., Hochstein, N., Weber, S., Fanning, E., and Doerfler, W.
"A Distinct DNA-Methylation Boundary in the 5'-Upstream Sequence of the *FMR1* Promoter Binds Nuclear Proteins and Is Lost in Fragile X Syndrome"
Am J Hum Genet. (2009) Nov;85(5): 606-16

Reviews:

Doerfler, W., Naumann, A., Hochstein, N., and Weber, S.
"DNA methylation profiles in the 5'-upstream region of the human *FMR1* promoter and in an adenovirus transgenome"
Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics (2010): 495-509

Naumann, A., Hochstein, N., Weber, S., and Doerfler, W.
„5-Methylcytosin als wichtiger Regulator in der Genetik"
BIOspektrum (2010) Feb;01: 29-32

Wissenschaftliche Beiträge:

Weber, S.,Burger, H., Kemal, K., Weiser, B., Korn, K., Anastos, K., and Doerfler, W.
„Epigenetic modifications of HIV- 1 proviral LTRs: potential targets for cure"
XIX International AIDS Conference, Washington D.C., 22.07.- 27.07.2012 (Vortrag)

10.4 Lebenslauf

Name:	Weber
Vorname:	Stefanie
Geburtsdatum:	21.08.1981
Geburtsort:	Leinefelde
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Ausbildung:

seit 12/2007	Doktorandin von Prof. Dr. Walter Doerfler am Institut für Genetik an der Universität zu Köln Titel der Doktorarbeit: „Fremde DNA im menschlichen Genom: Konsequenzen für das Wirts- und das Fremdgenom“
10/ 2007	Diplom Biologin Univ.
01/ 2007- 10/2007	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Walter Doerfler am Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Friedrich- Alexander- Universität Erlangen- Nürnberg mit dem Titel: „Veränderungen im Methylierungsmuster endogener retroviraler Sequenzen nach Integration fremder DNA in das Genom menschlicher Zellen“
10/ 2002- 10/ 2007	Biologiestudium an der Friedrich- Alexander- Universität Erlangen- Nürnberg mit den Studienschwerpunkten: Biochemie, Genetik, Mikrobiologie, Virologie
07/ 2000	Allgemeine Hochschulreife
09/ 1992- 07/ 2000	Gottfried- Wilhelm- Leibniz Gymnasium Leinefelde
09/ 1988- 07/ 1992	Staatliche Grundschule II in Leinefelde

Erlangen im Mai 2013

Stefanie Weber

10.5 Danksagung

Bei Prof. Dr. Walter Doerfler möchte ich mich ganz herzlich für die interessanten Themen, die exzellente Betreuung und für seine Geduld bedanken.

Für die fachliche Betreuung des HIV- Themas möchte ich mich bei Harold Burger und Barbara Weiser bedanken, die trotz der Distanz immer in der Nähe waren.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Jens Brüning für die Begutachtung der Arbeit und dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr. Siegfried Roth, ebenso der Beisitzerin Fr. Dr. Ursula Lichtenberg.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleckenstein möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Arbeit am Institut der Klinischen und Molekularen Virologie durchführen zu können.

Ein ganz dickes Dankeschön geht an meine Mitstreiterin und Freundin Fr. Dr. Anja Naumann, die immer für „spontane kurze Aktionen“ zu haben war und die mit mir die Katastrophen des Laboralltags durch den einen oder anderen Lachanfall überlebt hat, wenn mal wieder der „Griff ins Klo für die Tonne war“.

Ebenfalls ein dickes Dankeschön bekommt meine ehemalige Betreuerin des sagenumwobenen F2-Praktikums in der AG Reil und Freundin Fr. Dr. Susan Jung, die mich unter anderem in die Tiefenpsychologie der Herstellung und Klonierung von nicht immer kompetenten Baks. einweihte und die die Demolierung ihres antiken Couchtisches sowie diverser Gartenstühle durch mich mit Humor genommen hat.

Ich möchte ebenso zwei besonderen Begleitern in meinem Leben danken. Meinem ersten „Punkt“ Sally, die mir in unzähligen Spaziergängen beibrachte mich auf das Wesentliche zu konzentrieren und meiner jetzigen „Tüpfelzicke“ Arabella, die mich zum Bällchenexperten ausgebildet hat und mir mindestens einmal die Woche den Tag mit neuen Dekorationsideen für die Wohnung versüßt.

Ein ganz liebes Dankeschön geht an Ronny Juch, der mich mit seinem unerschütterlichen Optimismus schier in den Wahnsinn treibt, aber letztendlich Recht hat, das alles irgendwie gut wird.

Meinem Vater möchte ich für den einen und anderen etwas größeren „financial support“ danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen bedanken, die ein offenes Ohr für das eine oder andere größere Problem hatten und mir zur Seite gestanden haben.