



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Isolierung und Charakterisierung proteinkodierender retroviraler
Transkripte aus der Mammakarzinomzelllinie T47D**

Autor: Norbert Georg Schwarz
Institut / Klinik: III. Medizinische Klinik
Doktormutter: Prof. Dr. C. Leib-Mösch

Die menschliche Brustkrebszelllinie T47D setzt nach Behandlung mit Steroidhormonen retrovirus-ähnliche Partikel frei, die mit einer reversen Transkriptase-Aktivität assoziiert sind. Alle bisher aus diesen Partikeln isolierten humanen endogenen retroviralen Sequenzen (HERVs) weisen jedoch zahlreiche Punktmutationen auf, die proteinkodierende Bereiche inaktivieren. Die freigesetzten Partikel sind daher wahrscheinlich Pseudotypen, die durch Komplementation verschiedener HERVs gebildet werden. Im mRNA-Pool der T47D-Zellen sollten demnach weitere retrovirale Sequenzen enthalten sein, die die genetischen Informationen für die Synthese der Strukturproteine und Enzyme *in trans* zur Verfügung stellen, aber aufgrund eines defekten Verpackungssignals selbst nicht in die Partikel verpackt werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollten aus zwei λ -Phagen-cDNA-Banken, die den mRNA-Pool der Brustkrebszelllinie T47D repräsentieren, Klone isoliert werden, die endogener retroviraler Herkunft sind und offene Leserahmen für potentiell funktionelle Proteine aufweisen. Dazu wurden die cDNA-Banken mit Sonden aus HERV-K-T47D hybridisiert, einem mit dem Mausmammatumovirus (MMTV) verwandten HERV, das ursprünglich aus den T47D-Partikeln isoliert worden war. Von 29 HERV-K-T47D-verwandten Klonen wurden die Inserts durch PCR-amplifiziert und in einem *in vitro*-Transkriptionstranslationssystem nach offenen Leserahmen abgesucht. Fünf der untersuchten Klone (G26, G59, P60, G64 und P3) enthielten offene Leserahmen und wurden daher sequenziert und genauer charakterisiert. Klon G26 erwies sich als nicht retroviral. Zwei Klone waren identisch und wurden als G59/P60 bezeichnet. Diese Klone repräsentieren ein chimäres Transkript, das HERV-K-T47D-verwandte *gag*- und *prt*-Sequenzen in entgegengesetzter Orientierung zu einer 1077 bp langen Sequenz des humanen Initiationsfaktors 4B enthält. Retrovirale Sequenzen, die mit zellulären Genen in chimären Transkripten assoziiert sind, haben häufig regulative Funktionen in der transkriptionellen Initiation oder Termination.

Der vierte Klon, G64, enthält den 3'-Bereich von *gag*, das gesamte *prt*-Gen, sowie die für die reverse Transkriptase kodierenden Sequenzen des *pol*-Gens und ist zu etwa 76% zu HERV-K-T47D homolog. Die 3' Hälfte von G64 ist nahezu identisch mit den ersten 934 Nukleotiden des fünften der isolierten Klone, P3, der ein komplettes retrovirales *pol*-Gen umfaßt und zu 75% mit der entsprechenden HERV-K-T47D-Sequenz identisch ist. P3 enthält zwei große offene Leserahmen (ORF A: 1016 bp und ORF B: 1538 bp), die durch eine Leserasterverschiebung getrennt sind. Die Entfernung einer Adeninbase würde ausreichen, um einen durchgehenden offenen Leserahmen zu generieren, der das gesamte *pol*-Gen kodiert. Überdies konnten in dieser Sequenz alle für eine aktive reverse Transkriptase essentiellen Motive identifiziert werden. Die Klone P3 und G64 leiten sich sehr wahrscheinlich vom gleichen retroviralen Transkript ab und repräsentieren dasselbe Provirus. Die geringen Unterschiede in den überlappenden Sequenzen könnten, wie auch die Insertion nur einer Adeninbase im *pol*-Leserahmen, auf Fehler bei den PCR-Reaktionen zurückzuführen sein. Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, daß das in dieser Arbeit identifizierte Provirus zumindest für einige der retroviralen Proteine kodieren könnte, die für die Partikelbildung und die reverse Transkriptaseaktivität in T47D-Zellen verantwortlich sind.