

Physische und funktionelle Interaktionen
zwischen den HERV-K(HML-2) Proteinen Rec
und Np9 und zellulären Proteinen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von
Miriam Denne

Saarbrücken, April 2007

Meiner Familie gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- 7. Saar-Lor-Lux Meeting on Virus Research 2004, Homburg, Deutschland
- Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für Virologie 2005, Hannover, Deutschland
- 8. Saar-Lor-Lux Meeting on Virus Research 2005, Luxemburg, Luxemburg
- Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für Virologie 2006, München, Deutschland
- Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses 2006, New York, USA
- Workshop Endogenous Retroviruses & Retroelements 2006, Mystic, USA

Wesentliche Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht in:

Denne M., Sauter M., Armbruster V., Licht J. D. , Roemer K. and Mueller-Lantzsch N. (2007). Physical and Functional Interaction of Human Endogenous Retrovirus Proteins Np9 and Rec with the Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein. Journal of Virology, in press

Vorwort

Herrn Prof. Dr. Müller-Lantsch danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die fortwährende Unterstützung bei der Entwicklung neuer Ideen und für die Möglichkeit, Teile dieser Arbeit auf internationalen Kongressen vorzustellen.

Ganz herzlich danke ich Dr. Marlies Sauter, die mich während der gesamten Arbeit hervorragend betreut und unterstützt hat und sich immer Zeit für Diskussionen und wertvolle Ratschläge genommen hat.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Klaus Römer für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit und seine stete Hilfsbereitschaft.

Danken möchte ich besonders meinen Mitarbeiterinnen Frau Diplom Biologin Sabine Kaufmann und Frau Diplom Biologin Madeleine Herrmann für das überragende Arbeitsklima, ihre ständige Hilfsbereitschaft in jeder Situation und nicht zuletzt für ihre Freundschaft.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Frau Barbara Best bedanken, für ihre zahlreichen praktischen Tipps und ihre Hilfe.

Den Mitarbeitern der Virologie und der Arbeitsgruppe Römer danke ich ebenfalls für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima.

Von ganzem Herzen danke meinem Mann Markus, der mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet hat und immer für mich da war.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei den besten Eltern der Welt, die mich immerwährend liebevoll unterstützt und mich ermutigt haben.

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	V
III	VERZEICHNIS DER TABELLEN	VI
IV	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	VII
1	EINLEITUNG	1
1.1	Viren	1
1.2	Retroviren	2
1.2.1	Klassifikation der Retroviren	2
1.2.2	Virion- Struktur	4
1.2.3	Genomstruktur, Integration, Proteinsynthese und Reifung	5
1.2.3.1	<i>Genomstruktur</i>	6
1.2.3.2	<i>Penetration und Integration</i>	6
1.2.3.3	<i>Proteinsynthese und Reifung neuer Virionen</i>	7
1.3	Humane endogene Retroviren (HERV`s)	8
1.3.1	Entstehung und Verbreitung im Genom	8
1.3.2	Klassifizierung	10
1.3.3	Biologische Relevanz endogener Retroviren	12
1.3.3.1	<i>Vorteile retroviraler Insertionen für den Wirtsorganismus</i>	12
1.3.3.2	<i>Nachteile retroviraler Insertionen für den Wirtsorganismus</i>	13
1.4	Die HERV-K(HML-2) Familie	15
1.4.1	Identifikation und Unterteilung	15
1.4.2	Expression in humanen Geweben	17
1.4.2.1	<i>Expression von Partikeln</i>	17
1.4.2.2	<i>Expression von Transkripten</i>	17
1.4.2.3	<i>Expression von Proteinen</i>	18
1.4.3	Die Genprodukte des HERV-K(HML-2)	19
1.4.4	Das akzessorische Protein Rec	21
1.4.5	Das HERV-K Gen <i>np9</i>	22
1.5	Die Interaktionspartner	24
1.5.1	Der Transkriptionsrepressor PLZF	24
1.5.2	Der humane Spleißfaktor 61K	26
1.6	Ziele der Arbeit	28

2.	MATERIAL	30
2.1	Puffer	30
2.2	Enzyme und dNTP`s	31
2.3	Molekulargewichtsmarker	31
2.4	Bakterienstämme und Nährmedien	31
2.5	Zelllinien	32
2.6	Zellkulturmedien für Säugerzellen	33
2.7	Antikörper	34
2.7.1	Monoklonale Antikörper	34
2.7.2	Polyklonale Antikörper	34
2.7.3	Peroxidase(POX)- gekoppelte Zweitantikörper	34
2.8	Chemikalien und andere Reagenzien	35
2.8.1	Chemikalien	35
2.8.2	„Kits“ und Transfektionsreagenzien	35
2.8.3	Photochemikalien	35
2.8.4	Radiochemikalien	36
2.9	Membranen	36
2.10	Oligonukleotide	36
2.11	Vektoren, Reporterplasmide und Konstrukte	38
2.11.1	Parentale Vektoren	38
2.11.2	Reporterplasmide	40
2.11.3	Konstrukte	40
2.12	Mikroskope, Computersoftware und Internetseiten	46
3.	METHODEN	47
3.1.	Kultivierung von <i>E.coli</i> -Stämmen	47
3.2	Blue/White Screening	47
3.3	DNA-Techniken	48
3.3.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	48
3.3.2	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	49
3.3.3	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	49
3.3.4	Spaltung von DNA durch Restriktionendonukleasen	50
3.3.5	Phosphatasebehandlung von Vektoren	50
3.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten	51

3.3.7	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	51
3.3.8	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	52
3.3.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	52
3.4	Protein-Techniken	53
3.4.1	Herstellung von Proteinextrakten	53
3.4.1.1	<i>Zellaufschluss unter nativen Bedingungen</i>	53
3.4.1.2	<i>Zellaufschluss unter reduzierenden Bedingungen</i>	53
3.4.1.3	<i>Proteinsynthese durch in vitro Transkription und Translation</i>	54
3.4.2	Techniken zum Nachweis von Proteinen	54
3.4.2.1	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	54
3.4.2.2	<i>Westernblot</i>	55
3.4.2.3	<i>Nachweis von Proteinen im SDS-Gel</i>	56
3.4.2.4	<i>Nachweis radioaktiv- markierter Proteine durch Autoradiographie</i>	56
3.4.3	Techniken zum Nachweis der subzellulären Proteinlokalisierung	57
3.4.3.1	<i>Detektion autofluoreszierender Proteine durch Fluoreszenz- mikroskopie</i>	57
3.4.3.2	<i>Anfärben von zellulärer DNA mit dem DAPI- Reagenz</i>	57
3.4.4	Methoden zur Detektion und Analyse von Protein-Protein Interaktionen	58
3.4.4.1	<i>GST- pulldown Analysen und Acetylierungsassay</i>	58
3.4.4.2	<i>Ko-Immunpräzipitation</i>	59
3.4.4.3	<i>Kolokalisationsassay</i>	59
3.5	Zellkultur- Techniken	60
3.5.1	Kultivierung und Lagerung von Säugerzelllinien	60
3.5.2	Zellzahlbestimmung durch Durchflusszytometrie	60
3.5.3	Zellwachstums-Assay	61
3.5.4	Luziferase-Reportergen-Assay	62
3.6	Transformation von Zellen	62
3.6.1	Transformation von Bakterienzellen	62
3.6.2	Transformation von Säugerzellen	63
3.6.2.1	<i>Transfektion mit FuGENE-6</i>	63
3.6.2.2	<i>Transfektion mit NanofectinI</i>	64
3.6.2.3	<i>Herstellung stabiler Zelllinien durch Elektroporation</i>	64

4.	ERGEBNISSE	65
4.1	Interaktion von HERV-K-Rec und dem Promyelozytischen leukämischen Zink Finger Protein	65
4.1.1	Studien zu Bindungsstellen von Rec und PLZF in Gluthation-S-Transferase (GST)- Pulldown Experimenten	66
4.2	Interaktion von HERV-K-Np9 und dem PLZF Protein	69
4.2.1	Np9 und PLZF kolokalisieren in transient transfizierten Cos-1 und Tera-1 Zellen	70
4.2.2	Bestätigung der Np9/PLZF Interaktion und Eingrenzung der Bindungsstellen von Np9 und PLZF in GST-Pulldown Experimenten	71
4.2.3	PLZF wird mit Np9 koimmunpräzipitiert	74
4.2.4	Np9 oder Rec/PLZF Bindung ist nicht von der PLZF Azetylierung abhängig	75
4.3	NP9 und Rec beeinflussen die Tumorigenese über den PLZF/c- Myc Pathway	77
4.3.1	PLZF reprimiert den <i>c-myc</i> Promotor	78
4.3.2	Np9 und Rec beeinflussen die Repression des <i>c-myc</i> Promotors durch PLZF	80
4.3.3	Rec beeinflusst das endogene c-Myc über PLZF	82
4.3.4	Die Expression <i>c-myc</i> regulierter Gene wird von Rec beeinflusst	86
4.3.5	Zellwachstum in Abhängigkeit der Rec Expression	88
4.3.6	Apoptoserate in Abhängigkeit der Rec Expression	89
4.4	HERV-K-Rec und Np9 assoziieren mit dem humanen Spleißfaktor 61K	91
4.4.1	Bestätigung der Rec/61K Interaktion und Eingrenzung der Bindungsstellen durch GST-Pulldown Analysen	92
4.4.2	Np9 und 61K kolokalisieren in transient transfizierten Zellen	94
4.4.3	Bestätigung der Np9/61K Interaktion und Eingrenzung der Bindungsstellen durch GST-Pulldown Analysen	95
5.	DISKUSSION	97
5.1	Rec interagiert mit dem Transkriptionsrepressor PLZF	99

5.2	Np9 interagiert mit dem Transkriptionsrepressor PLZF	101
5.3	Np9 oder Rec/PLZF Bindung ist nicht von der PLZF Azetylierung abhängig	105
5.4	Funktionelle Interaktion zwischen Rec/Np9 und PLZF	106
5.5	Rec beeinflusst c-Myc regulierte Gene über PLZF	108
5.6	Zellproliferation und Apoptose in Abhängigkeit von der Rec Expression	110
5.7	Rec und Np9 assoziieren mit dem humanen Spleißfaktor 61K	111
6.	ZUSAMMENFASSUNG	115
7.	LITERATURVERZEICHNIS	117

II VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1.1	Aufbau eines Retroviruspartikels am Beispiel des HIV-1	5
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Proviren HERV-K101 und HERV-K(HML-2.HOM)	16
Abb. 1.3	Schematische Darstellung des PLZF Proteins: Funktionelle Domänen und Bindungsstellen	26
Abb. 4.1	Schematische Darstellung des PLZF-Proteins, der Lage der Zink Finger Domäne, sowie der eingesetzten Deletionsmutanten des PLZF Proteins.	66
Abb. 4.2	Nachweis der Bindung zwischen Rec und des PLZF Proteins und der Deletionsmutanten	68
Abb. 4.3	Nachweis der Bindung zwischen PLZF und Rec und den Deletionsmutanten	69
Abb. 4.4	Kolokalisation von EGFP-PLZF und Ds-Red-Np9 im Zellkern	71
Abb. 4.5	Nachweis der Bindung zwischen Np9 und des PLZF Proteins und der PLZF- Deletionsmutanten	72
Abb. 4.6	Nachweis der Bindung zwischen PLZF und Np9 und der Np9- Deletionsmutanten	73
Abb. 4.7	Ko-Immunpräzipitation von PLZF durch matrixassoziiertes	75

	GST-Np9 Protein	
Abb. 4.8	Nachweis der Bindung von Rec und Np9 an azetyliertes als auch unazetyliertes PLZF	76
Abb. 4.9	PLZF reprimiert den <i>c-myc</i> Promotor	79
Abb. 4.10	Np9 und Rec heben den reprimierenden Effekt von PLZF auf <i>c-myc</i> auf	81
Abb. 4.11	Western Blot zum Nachweis der PLZF, Rec und Np9 Expression in den stabilen Zelllinien U937:PLZF; U937:PLZF-Rec, U937:PLZF-Np9 und U937:PLZF-CMV	83
Abb. 4.12	Rec reguliert das endogene c-Myc über PLZF	85
Abb. 4.13	Rec reguliert c-Myc regulierte Proteine über PLZF und c-Myc	87
Abb. 4.14	Zellwachstum in Abhängigkeit der Rec Expression	89
Abb. 4.15	Apoptoserate in An- und Abwesenheit von Rec	90
Abb. 4.16	Schematische Darstellung des 61K-Protein, der Lage des Brustkrebsantigens NY-BR-9, sowie der eingesetzten Deletionsmutanten von dem 61K Protein	92
Abb. 4.17	Nachweis der Bindung zwischen Rec und des 61k Protein und der Deletionsmutanten	93
Abb. 4.18	Kolokalisation von EGFP-61K und Red-Np9 im Zellkern	95
Abb. 4.19	Nachweis der Bindung zwischen Np9 und des 61KD Proteins und der Deletionsmutante 61K-Mitte	96
Abb. 5.1	Schematische Darstellung des PLZF Proteins	98
Abb. 5.2	Schematische Zusammenfassung der Interaktionen von Np9 und Rec zu PLZF	104
Abb.5.3	Schematische Zusammenfassung der Expressionslevel von c-Myc in Anwesenheit von PLZF und von PLZF und Rec	109

III VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1	Charakteristische Vertreter der Retroviren	3
Tab. 2	Wichtigste Vertreter der humanen endogenen Retroviren	11

IV VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

α	alpha- oder anti- (z.B.: Antiserum)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS, aa	Aminosäure, <i>amino-acid</i>
APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BLV	<i>bovine leukemia virus</i>
bp	Basenpaar
CA	Kapsidprotein
Chr.	Chromosom
CHX	Cycloheximid
CLSM	<i>confocale laserscanning- microscopy</i>
CMV	Cytomegalie-Virus
cORF	<i>central open reading frame</i>
C-term	Carboxyterminus
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP`s	Desoxynucleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
EBNA-2	<i>epstein- barr- nuclear- antigen 2</i>
EBV	Epstein Barr Virus
ECL	<i>enhanced- chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
ENV	<i>envelope protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERV	endogenes Retrovirus
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum

g	Gramm
Gag	gruppenspezifisches Antigen
GST	Glutathion-Sepharose-Transferase
h	Stunde
HERV-K	humanes endogenes Retrovirus K
HFV	humanes Foamy Virus
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HML	<i>human MMTV- like</i>
HTLV	humanes T-Zell Leukämie Virus
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo-
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
LNx	<i>ligand of Numb protein X</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	milli-
MA	Matrixprotein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Mdm-2	<i>mouse double minute-2</i>
Min	Minute
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
MoMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MPMV	<i>mason pfizer monkey virus</i>
μ	micro-
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n	nano-
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NC	Nukleokapsid
Np9	<i>nuclear protein of 9 kDa</i>
N-term	Aminoterminus
OD	optische Dichte

ORF	<i>open reading frame</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphat buffer saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIC	<i>preintegration complex</i>
PLZF	<i>promyelocytic leukemia zinc finger</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
Prt	Protease
RAR- α	<i>retinoic acid receptor alpha</i>
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleasen
RSV	<i>rous sarcoma virus</i>
RT	reverse Transkriptase/reverse Transkription/ Raumtemperatur
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulfat</i>
siRNA	<i>small interference RNA</i>
ss	<i>single-strand</i>
Tab.	Tabelle
TE	Tris/EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylisothiocyanat
U	<i>unites</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Viren

Viren sind obligat intrazelluläre Parasiten, die weder proteinproduzierende Strukturen (Ribosomen) besitzen noch einen energiegenerierenden Mechanismus. Außerhalb einer Zelle sind sie nicht in der Lage sich durch Teilung wie z.B. Bakterien zu vermehren. Sobald sich aber das Virus oder die virale Nukleinsäure Zutritt in eine lebende Zelle verschafft hat, erfolgt dessen Replikation. Im Laufe der Evolution haben Viren unterschiedliche Strategien entwickelt, wie sie die Wirtszelle infizieren und sich deren Proteinsynthese und Replikationszyklus zu nutze machen. Sie sind in der Lage, zelluläre Prozesse umzusteuern und so für den optimalen Ablauf ihrer Vermehrung zu modifizieren.

Die Virionen, wie die Viruspartikel auch genannt werden, bestehen aus Proteinen, die bei einigen Virustypen von einer Lipidmembran, dem Envelope, umgeben sind. Sie besitzen ein Genom bestehend aus RNA oder DNA, die entweder einzel- oder doppelsträngig vorliegt. Die Nukleinsäure kann linear, ringförmig oder segmentiert sein. Das Genom liegt als Nukleokapsid vor. Dieser Nukleinsäure Protein Komplex kann von einem Kapsid, welches aus partikulären Proteinstrukturen besteht, umgeben sein. Diese Kapside und auch die Nukleokapside sind sphärische oder stäbchenförmige Gebilde. Neben der Erbinformation für die Strukturkomponenten, besitzen Viren Gene für regulatorisch aktive Proteine und Enzyme.

Je nach Virustyp hat die Infektion für die Wirtszelle unterschiedliche Folgen: Die Wirtszelle stirbt nach der Infektion, sie wird chronisch infiziert und produziert damit kontinuierlich geringe Mengen an Viren oder bei einer latenten Infektion ist die Expression von viralen Proteinen über längere Zeit unterdrückt, z.B. Retroviren.

1.2 Retroviren

Retroviren kommen bei einer Vielzahl von Lebewesen vor und sind mit unterschiedlichen Krankheiten assoziiert. Wichtige humanpathogene Vertreter wie HIV und HTLV-1 führen zur Ausbildung zahlreicher klinisch relevanter Krankheitsbilder und die Erforschung der viralen Lebenswege ist essenziell, um Impfstrategien oder neue Therapeutika gegen diese Pathogene zu entwickeln. Daher bilden heute die Vertreter der Familie der Retroviren die wohl am meisten beachtete virale Familie in der biologisch/medizinischen Forschung.

Neben den infektiösen exogenen gibt es auch endogene Retroviren. Diese integrieren sich in das Wirtsgenom und werden so Bestandteile dieses und werden vertikal über die Keimbahn vererbt.

Die Retroviren sind benannt nach dem Enzym Reverse Transkriptase (RT). Seine Funktion ist die Umschreibung der viralen RNA in ein komplementäres DNA-Intermediat, das als Provirus in die genomische DNA der Wirtszelle integrieren kann. Bei der Infektion von Keimbahnzellen wird dadurch das virale Genom zu einem konstitutiven Bestandteil des humanen Genoms, das von diesem Zeitpunkt an auf alle nachfolgenden Generationen weitervererbt wird. Im Folgenden wird zunächst eine Auswahl der wichtigsten Vertreter der Retroviridae vorgestellt und der morphologische Aufbau, die genetische Organisation sowie die charakteristischen Eigenschaften dieser Familie am Beispiel des humanen Immundefizienz Virus (HIV) erläutert.

1.2.1 Klassifikation der Retroviren

Die taxonomische Einteilung der Familie *Retroviridae* basiert auf Unterschieden in der Morphologie, der Genomsequenz, den antigenen Eigenschaften, der Wirtsspezifität und der Pathogenese. Aktuell unterscheidet man sieben Genera: *Alpharetroviren*, *Betaretroviren*, *Gammaretroviren*, *Deltaretroviren*, *Epsilonretroviren*, *Spumaviren* und *Lentiviren* (s.Tab.1). Weiterhin unterscheidet man zwischen exogenen und endogenen Retroviren. Einige Mitglieder der α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren besitzen die Fähigkeit

Tumore zu induzieren. In der Unterfamilie der Spumaviren sind pathogene Retroviren zusammengefasst, die persistierende Infektionen auslösen können. Die Gruppe der Lentiviren beinhaltet hingegen retrovirale Vertreter, die zu Beginn inapparente, langsam fortschreitende Immundefizienz verursachen, die jedoch im Laufe der Infektion meist tödlich für den Wirtsorganismus enden.

Tab. 1: Charakteristische Vertreter der Retroviren (nach Modrow et al., 2003, modifiziert)

Virusfamilie	Genus Unterfamilie	Mensch/ Tier	Typ	Belegbare oder mutmaßlich assoziierte Erkrankungen
Retroviridae	α -Retroviren	RSV	exogen	Sarkome
	β -Retroviren	HERV-K MMTV	endogen exogen/ endogen	Keimzelltumore
	γ -Retroviren,	ERV-3 FeLV Mo-MLV	endogen exogen exogen	unbekannt
	δ -Retroviren	HTLV-1/2 HRES-1 BLV	exogen endogen exogen	Leukämie Leukämie
	ϵ -Retroviren	Fischretroviren	exogen	
	Lentivirus	HIV-1/HIV-2 SIV	exogen	Immundefizienz
	Spumavirus	Affenspumavirus	exogen	

RSV: *Rous-Sarkomvirus*; HERV-K: *humanes endogenes Retrovirus-K*; MMTV: *Maus-Mammatumor-Virus*; ERV-3: *endogenes Retrovirus 3*; FeLV: *felines Leukämievirus*; MoMLV: *Moloney-Mausleukämievirus*; HTLV: *humanes T-Zell Leukämievirus*; BLV: *bovines Leukosevirus*; HIV: *humanes Immundefizienzvirus*; SIV: *Affenimmundefizienzvirus*

1.2.2 Virion Struktur

Der typische Aufbau eines retroviralen Partikels wurde anhand des humanen Immundefizienzvirus Typ1 (HIV-1) in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. Das Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 100-120 nm und ist von einer Lipoproteinhülle umgeben. Eingebettet in diese Hülle sind 72 etwa 10 nm große *env*-Glykoproteinkomplexe, die aus einem externen Anteil, der Oberflächendomäne (*surface domain*, SU) und einem Transmembranprotein (*transmembrane domain*, TM) bestehen (Chan et al., 1997). Bei HIV besteht die SU-Domäne aus einem 120 kDa (gp120) und die TM-Domäne aus einer 41-kDa großen Glykoprotein (gp41). Gp120 ist für die Bindung des Virus an die CD4-Rezeptoren der Zielzellen von entscheidender Bedeutung. Da die Hülle des HI-Virus aus der Membran der Wirtszelle entsteht, befinden sich in ihr ebenfalls verschiedene Proteine der Wirtszelle, z. B. HLA Klasse I und II Moleküle sowie Adhäsionsproteine. Das HIV- Kapsid besitzt eine konische Form, während es bei anderen Retroviren auch sphärisch-ikosaedrisch aufgebaut sein kann. Die Kapsidproteine (p24) werden zusammen mit den Matrixproteinen (p17) und dem Nukleokapsidprotein (p7) als gruppenspezifische Antigene (Gag-Proteine) zusammengefasst. Die einzelsträngige HIV-RNA liegt in zwei Kopien im Viruskapsid vor, die mit den Proteinen des Nukleokapsids komplexiert vorliegen. Im Genom befinden sich die für die Vermehrung notwendigen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase und Protease. Das HI-Virus gehört zu den komplex aufgebauten Retroviren (Coffin et al., 1997). Daher ist das Genom deutlich umfangreicher als das anderer Retroviren. Neben den drei üblichen retroviralen Genen (*gag*, *pol*, *env*) besitzt das HI-Virus sechs zusätzliche (akzessorische) Gene (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef*), die hauptsächlich regulatorische Funktionen besitzen.

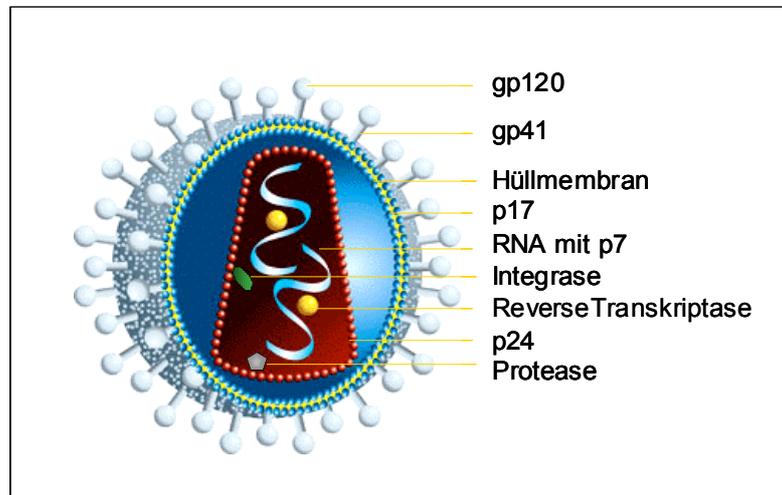


Abb. 1.1: Aufbau eines Retroviruspartikels am Beispiel des HIV-1 (nach Genoma modifiziert, 2002 www.laboratorioigenoma.it/writable/hiv_art.gif)

1.2.3. Genomstruktur, Integration, Proteinsynthese und Reifung

Aufgrund des Genoms sowie der Anzahl der Genprodukte unterscheidet man einfache und komplexe Retroviren (Coffin et al., 1997). Die so genannten einfachen Retroviren, besitzen meist nur die offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORF`s) *gag*, *pol* und *env*. Zur Bildung infektiöser Partikel müssen intakte Gene für die Hüllproteine im *env*- Leserahmen, die viralen Enzyme des *prt*- und *pol*-Leserahmen sowie ein offener Leserahmen für die Gruppe der virus-spezifischen Antigene des *gag*- Leserahmens zur Verfügung stehen. In superinfizierten Zellen oder unter Verwendung von Genprodukten endogener Elemente können sich auch neue rekombinante Viruspartikel aus den Genprodukten verschiedener Viren komplementieren (Tönjes et al., 1999). Bei den komplexen Retroviren findet man ferner eine Vielzahl kleiner offener Leserahmen für regulatorische Proteine oder andere akzessorische Genprodukte (Mertz et al., 2004; Löwer et al., 1995; Armbruster et al., 2002).

1.2.3.1 Genomstruktur

Der Aufbau des Genoms eines infektiösen Viruspartikels (Virion) unterscheidet sich signifikant von der in das Wirtsgenom eingebauten proviralen Form (Provirus). Das Genom des Virions besteht aus einer einzelsträngigen RNA in „+“-Orientierung, das im reifen Partikel in doppelter Ausführung vorliegt. Das 5´Ende ist durch eine Cap-Struktur vor dem Abbau durch zelluläre Nukleasen geschützt und das 3´ Ende wird polyadenyliert um die Translationsmaschinerie der eukaryotischen Wirtszelle zu nutzen. Somit weist das Genom des Virions alle Eigenschaften einer eukaryotischen mRNA auf. Die Genomgröße kann je nach Virustyp unterschiedlich groß sein. Das Genom der C-Typ Viren umfasst minimal 7 kb und erreicht bei dem komplexen HIV-Genom eine maximale Größe von 12 kb. Die für die retroviralen Proteine kodierenden Bereiche werden von regulatorischen Kontrollelementen flankiert, die Promotorsequenzen und Bindungssequenzen für transaktivierende zelluläre und/oder virale Proteine beinhalten. Ferner sind diese Bereiche essenziell für die Abläufe während der reversen Transkription des Genoms und für die erfolgreiche Integration des Provirus in das Wirtsgenom. Diese Sequenzelemente bilden im Verlauf der reversen Transkription, d.h. der Umschreibung des ss-+-RNA-Genoms in die dsDNA Form des Provirus, die sogenannten *long terminal repeats* (LTR's). Diese kodierenden Bereiche des 3´LTR- und des identischen 5´-LTR-Elements, die sich jeweils in eine U3, eine R und eine U5 Domäne unterteilen, flankieren das Provirus.

1.2.3.2 Penetration und Integration

Die An- bzw. Abwesenheit eines geeigneten Rezeptors auf der Zielzelle legt fest, ob die Zelle von einem bestimmten Virus befallen werden kann oder nicht. Ist ein spezifischer Oberflächenrezeptor vorhanden, bindet die SU-Domäne des in die Virionhülle eingelagerten Env-Proteins an diesen und initiiert damit die Penetration der Retroviruspartikel. Bei HIV wurde gezeigt, dass für die effiziente Bindung der SU-Domäne an den CD4-Rezeptor ferner eine Konformationsänderung der TM-Domäne erforderlich ist (Hildinger et al., 2001). Die Konformationsveränderung der Env-Proteine führt dann bei HIV zur

Verschmelzung der beteiligten Proteine und resultiert letztendlich in der Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran der neuen Wirtszelle (Hunter in Coffin et al., 1997). Kurz nach der Infektion findet noch innerhalb des Kapsids der Prozess der reversen Transkription statt. Unter Verwendung der im Kapsid mitgeführten viralen Enzyme (Reverse-Transkriptase mit Ribonuklease- H Aktivität) und mit einer tRNA aus der vorherigen Wirtszelle als Primer erfolgt die Umschreibung des viralen RNA- Genoms in die provirale dsDNA Form. Der Präintegrationskomplex (*pre-integration complex*, PIC), bestehend aus dem viralen RNA-Genom, den Enzymen RT und IN, sowie dem Matrix Protein und Vpr (Farnet et al., 1991), dockt durch Vpr zielgerichtet an die Kernmembran an (Popov et al., 1998) und gelangt durch die Kernporen in den Nukleus (Haffar et al., 2005), unabhängig von der Teilungsaktivität der Zellen (Bukrinsky und Haffar, 1999). Im Gegensatz dazu erfordert die Translokation des PIC`s der Onkoviren die Auflösung der Kernmembran während der Mitose, so dass bei diesen Viren die genomische Integration nur in teilungsaktiven Zellen erfolgen kann (Lewis und Emerman, 1994; Roe et al., 1993). Durch die IN wird die lineare, doppelsträngige DNA des Präintegrationskomplex in das Wirtsgenom integriert (Bushmann et al., 2002). Die Integrase spaltet erst 2 Basen an den 3`-Enden der viralen dsDNA und erzeugt damit ein überhängendes C-A- Motiv, das für alle transponierbaren Elemente charakteristisch ist (Coffin et al., 1997). Weiterhin schneidet die Integrase die zelluläre DNA an einer beliebigen Stelle, so dass überhängende 5`-Enden entstehen. Diese 5`-Enden der genomischen DNA werden mit den viralen 3`-Enden verbunden. Die einzelsträngigen Lücken werden durch die der zelluläre Reparaturmaschinerie aufgefüllt. Aufgrund dieses Mechanismus befinden sich immer 4-6 bp große, duplizierte DNA- Bereiche flankierend zu der inserierten Provirus- DNA (Coffin et al., 1997).

1.2.3.3 *Proteinsynthese und Reifung neuer Virionen*

Die Expression der viralen Proteine erfolgt ausschließlich von der proviralen inserierten DNA-Sequenz. Die Provirus-DNA wird durch die RNA-Polymerase II der Wirtszelle transkribiert. In der frühen Infektionsphase findet man überwiegend mehrfach gespleißte mRNA`s, die für die Proteine tat und rev

kodieren. Diese regulatorischen Proteine werden anschließend mittels spezifischer Kernimportsignale (*nuclear-localisation-signals*, NLS's) wieder in den Zellkern transloziert, wo sie die Expressionsrate der viralen Proteine transaktivieren bzw. den Export ungespleißter oder einfach gespleißter mRNA ins Zytoplasma anregen (Coffin et al., 1997). Die Env-Proteine werden über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche, wo Env von einer zellulären Protease in den externen und den transmembranen Teil gespalten wird, transportiert. Haben sich genügend Gag und Gag/Pol Proteine an der Zellmembran angehäuft (assembly), knospt das unreife Virion unter der Mitnahme des zellulären Membrananteils aus (budding).

Bei vielen Retrovirustypen erfolgt der Zusammenbau des Kapsids simultan zur Abknospung an der Wirtsmembran. Bei B- und D-Typ Retroviren findet hingegen die Bildung des Kapsids im Zytoplasma statt und führt dort zunächst zur Ausbildung sogenannter A-Partikel, die später ebenfalls mit der Zytoplasmamembran assoziieren und ausknospen (Coffin et al., 1997). Der Maturationsprozess des Partikels zu einem infektiösen Virion erfolgt erst außerhalb der Zelle. Hierfür sind strukturelle Veränderungen, wie die Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease notwendig.

1.3 Humane endogene Retroviren (HERV's)

1.3.1 Entstehung und Verbreitung im Genom

Die ersten Hinweise auf die Existenz endogener Retroviren stammen aus den 50-70er Jahren. Damals entwickelten Zellen, die zuvor nicht mit einem exogenen Virus infiziert worden waren, unter bestimmten Bedingungen (Strahlung; Karzinogene) infektiöse Partikel (Gross, 1970). Zunächst Hybridisierungsexperimente unter geeigneten Bedingungen, später die Polymerase Kettenreaktion (PCR) machten die Detektion immer weiterer proviraler Sequenzen möglich. Heute weiß man, dass mehr als acht Prozent des menschlichen Genoms aus retroviralen Sequenzen bestehen (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

Ein exogenes Retrovirus integriert als Provirus in das Genom einer Keimzelle des Wirts. Daher findet sich dieses Provirus in allen Körperzellen wieder und

wird an alle nachfolgenden Generationen weitervererbt. Sie können sich nach der Etablierung in einem als Retrotransposition bezeichneten Prozess durch Transkription, reverse Transkription und erneute Integration innerhalb der Zelle weitervermehren und dadurch in ihrem Wirt akkumulieren (Boeke und Stoye in Coffin et al., 1997).

Da zum Zeitpunkt der Integration beide LTR`s keine Sequenzunterschiede besitzen dürfen, kann man durch einen Vergleich der LTR-Sequenzen und der Mutationsrate für genomische, nicht kodierender Sequenzen (5×10^{-9} /nt/Jahr, Hayashida und Miyata, 1983) das Alter der heute im humanen Genom vorhandenen Elemente bestimmen. Diese Analysen zeigen, dass vor zirka 40 Millionen Jahren, zur Zeit der Abspaltung der Altweltprimaten von den Neuweltprimaten, viele exogene Retroviren Keimzellen der Altweltprimaten infizierten und seitdem stabil auf alle Nachkommen weitervererbt wurden (Dangel et al., 1995; Coffin et al., 1997; Wilkinson et al., 1994). Sobald ein Retrovirus derart in einer Population etabliert ist, dass es sich bei allen Vertretern findet, sollte durch Rezeptorinterferenz die exogene Form nicht mehr in der Lage sein, die Population zu infizieren, und unterliegt daher einem starken Selektionsdruck (Weiss in RNA-Tumoviren, 1985; Löwer, 1999). Je früher ein Provirus im Verlauf der Evolution in einer Spezies integriert, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die retrovirale Sequenz noch replikationskompetent ist. Oft kommt es zu homologen Rekombinationsereignissen zwischen einem 5`- und einem 3`- LTR, wodurch die dazwischen liegenden, kodierenden Sequenzen herausgeschnitten werden und man daher im Genom nur noch solitäre LTR`s findet (Wilkinson et al., 1994).

Diese Beobachtungen deuten an, welchen Einfluss neue Integrationen und Retrotranspositionsergebnisse innerhalb der Keimbahn auf die Evolution des humanen Genoms genommen haben und vermutlich bis heute noch ausüben (Leib-Mösch und Seifahrt, 1995; Hughes und Coffin, 2004).

1.3.2 Klassifizierung

Es hat sich in den letzten Jahren durchweg problematisch gestaltet eine übergreifende Nomenklatur gefunden retroviralen Elemente zu finden. Das liegt unter anderem daran, dass Homologieversuche sich meist auf definierte Sequenzabschnitte beschränken, die möglicherweise nicht in jedem Provirus vorhanden, nicht bekannt oder durch Mutationen nicht eindeutig erkennbar sind.

In Tabelle 2 ist eine Auswahl der wichtigsten HERV- Familien aufgeführt, gegebenenfalls mit den simultan verwendeten Bezeichnungen (nach Mager a und Medstrand, 1998, gekürzt und modifiziert). Die beim Menschen gefundenen retroviralen Elemente kann man in Vertreter der Gruppe I, II und III aufteilen. HERV's der Klasse I zeigen eine große Ähnlichkeit mit den C-Typ Retroviren, die heute auch als Gamma-Retroviren bezeichnet werden. Diese Viren nutzen zur Initiation der reversen Transkription tRNAs, die ein Glutamat-, Argin-, Isoleucin-, Histidin- oder Tryptophan-spezifisches Antikodon besitzen. Sie werden entsprechend HERV-E, -R, -I, -H oder -W bezeichnet. Klasse II HERV's sind eng verwandt mit den B-Typ oder Beta- Retroviren, dessen prominentester Vertreter MMTV ist, wodurch sich auch die Bezeichnung HML für *human MMTV-like* ableitet. Der Klasse III gehören die HERV-Familien an, die schwache Homologien zu den Spumaviren, ansonsten aber keine Übereinstimmungen aufweisen.

Tab. 2: Wichtigste Vertreter der humanen endogenen Retroviren (nach Mager und Medstrand, *Encyclopedia of the human Genome*, 2003; gekürzt und modifiziert)

Übliche Bezeichnung Genom	Weitere Namen	Kopien/haploidem Genom (Anzahl der solitären LTRs)
<u>Klasse I HERV's</u>		
HERV-I	RTLVI	250 (1000)
HERV-E		250 (1000)
HERV-R	ERV-3	100 (125)
HERV-W	MSRV	40 (1100)
HERV-9	ERV-9	300 (5000)
HERV-H	RTLVI-H, RGH	1000 (1000)
<u>Klasse II HERV's</u>		
HML-1	NMWW6	70 (350)
HERV-K(HML-2)	HERV-K, HERV-K10	60 (2500)
HML-3	HTDV, NMWW1, NMWW5	150 (700)
HML-4	HERV-K(T47D)	10 (800)
HML-5	NMWW2	100 (600)
HERV-K(HML-6)	NMWW4	50 (400)
HML-7	NMWW7	20 (140)
HML-8	NMWW3	60 (600)
HML-9	NMWW9	10 (40)
HERV-K(C4)	HML-10	10 (100)
<u>Klasse III HERV's</u>		
HERV-L		200 (6000)
HERV-S		50 (150)

1.3.3 Biologische Relevanz endogener Retroviren

1.3.3.1 *Vorteile retroviraler Insertionen für den Wirtsorganismus*

Welche Funktionen die konservierten endogenen Sequenzen besitzen ist noch in den meisten Fällen ungeklärt. Allerdings lässt die Aufrechterhaltung einer funktionellen viralen Sequenz erwarten, dass die Insertion von Vorteil für den Wirtsmechanismus ist.

Dass regulatorische Elemente endogener Viren die Steuerung einiger humaner Gene positiv beeinflussen, konnte hingegen bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden. Ting et al. konnten beispielsweise in transgenen Mäusen zeigen, dass die Expression des Amylasegens in der Speicheldrüse gewebsspezifisch von einem HERV-E LTR aktiviert wird (Ting et al., 1992). Der Selektionsvorteil zeigt sich, indem kohlenhydrathaltige Nahrung durch den süßen Geschmack erkannt werden kann. Die Arbeit von Biech et al. beschreibt die von einem HERV-E LTR- vermittelte gewebsspezifische Expression eines Gens der Insulinsuperfamilie (INSL4) in der Plazenta (Bieche et al., 2003). Mittlerweile sind mehrere Beispiele über promotor- und enhancerunabhängige regulatorische Effekte bekannt, wie beispielsweise die Bereitstellung von Polyadenylierungssignalen zur Expression zellulärer Gene bzw. Spleißvarianten (Mager et al., 1999; Baust et al., 2000; Hughes, 2001).

Mit der HERV-W Familie wurde eine HERV-Familie entdeckt, der man einen selektiven Vorteil für den Wirt zuschreibt. HERV-W ist in der Lage das Env-Protein zu exprimieren. Das als Syncytin bezeichnete Genprodukt erhält seinen Namen durch die Expression in der Plazenta und seine in verschiedenen Zelllinien nachgewiesene Fähigkeit, Syncytien zu bilden. Außerdem konnte in der Zellkultur gezeigt werden, dass anti-HERV-W-Env Antikörper die Fusionseigenschaften der Trophoblasten aufheben. Damit ist Syncytin vermutlich bei der humanen Plazenta-Morphogenese von Bedeutung (Blond et al., 1999; Mi et al., 2000). Frendo et al. konnte zeigen, dass die Inhibition von HERV-W Env Protein durch antisense Oligonukleotiden zur Abnahme der Trophoblastenfusion und Differenzierung führt (Frendo et al., 2003).

Ein weiterer Vorteil der Insertionen der humanen retroviralen Sequenzen könnte der Schutz des Wirtes vor exogenen Viren sein. Allerdings ist eine

solche Rezeptorinterferenz bisher nur im Tierreich bekannt. Bestimmte Mäusestämme exprimieren ein unter der Kontrolle eines zellulären Rezeptor stehenden *env*-Gen (*Fv-4*). Das entstehende Fv4-Protein schützt die Zellen vor einer MLV-Infektion, da es an dessen Rezeptor bindet (Limjoco et al., 1993). Jedoch könnte das Fehlen exogener Pendanten zu den zahlreichen HERV-Familien als Hinweis gesehen werden, dass endogen gewordene Retroviren zum Schutz vor exogenen Infektionen gedient und daher zur Auslöschung der exogenen Viren, die ohne Wirt nicht existieren können, geführt haben (Löwer, 1999).

1.3.3.2 Nachteile retroviraler Insertionen für den Wirtsorganismus

Alleine durch ihre Fähigkeit in das Genom der Wirtszelle zu integrieren, besitzen replikationskompetente Retroviren ein mutagenes Potential. Viele bekannten endogenen Retroviren des Menschen sind jedoch im Laufe der Evolution durch Mutationen und Replikationen replikationsinkompetent geworden (Kazazian, 1998). Erst die Studien der letzten Jahre lassen erahnen, welchen potenziellen Einfluss diese Sequenzen für die humane Evolution oder die Entstehung von Krebs oder Störungen des Immunsystems besitzen. Viele dieser Assoziationen werden heute jedoch noch kontrovers diskutiert. Im Vergleich dazu ist die Beteiligung endogener Retroviren an apparenten Krankheitsbildern in Hühnern, Mäusen und Schafen besser charakterisiert und unumstritten (Vogt und Friis, 1971; Fields et al., 1996). Die endogenen Vertreter des MLV (*murine leukemia virus*) und des MMTV (*mous mammary tumor virus*) rufen in ihren Wirten Leukämien bzw. Mammakarzinome hervor (Coffin et al., 1997). Erst kürzlich wurde dem Env Protein des JSRV (*Jaagsiekte Sheep Retrovirus*) ein onkogenes Potential zugeschrieben, indem es in der Lage ist, in Schafen Lungentumore zu induzieren (Caporale et al., 2006).

Die Möglichkeit, dass HERV kodierte Proteine zur Entwicklung der Tumorigenese beitragen können, wird vor allem in der Arbeit von Galli et al. (2005) gezeigt. Hier konnte die vermutete Assoziation zwischen der Entstehung von Keimzelltumoren und der Expression des *rec*-Gens von

HERV-K(HML-2) bestätigen werden. Transgene *rec* exprimierende Mäuse entwickelten, im Gegensatz zu den *rec* negativen Kontrollmäusen, *Carcinoma in Situ* (Cis).

Aber auch sonst scheint die Expression der Transkripte des *env*-Leserahmens mit dem Auftreten neoplastischer Gewebe wie Keimzelltumore, Mammakarzinome oder mit Leukämien zu korrelieren (Etkind et al., 1997; Wang-Johanning et al., 2001; Armbruester et al., 2002; Wang-Johanning et al., 2003; Buscher et al., 2005). Erst kürzlich konnte von Buscher et al. (2005) gezeigt werden, dass auch in Melanom-Patienten Expression von HERV-K-Genen vorhanden ist. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in 45% der metastatischen Melanom-Biopsien und in 44% der melanomen Zelllinien *rec* und *env* exprimiert wurde. Außerdem konnten zum ersten Mal Antikörper gegen HERV-K Proteine in Melanom- Patienten nachgewiesen werden.

Ferner wird ein Zusammenhang zwischen einem von HERV-K18 (entspricht HERV-K110 der HERV-K(HML-2) Familie) kodierten Superantigen mit Typ1 Diabetes (Conrad et al., 1997; Marguerat et al., 2004) oder die Expression von MSRV- Produkten (gehört zur HERV-W- Familie) in Patienten mit Multipler Sklerose oder rheumatischer Arthritis kontrovers diskutiert (Perron et al., 2001; Clerici et al., 1999; Komurian-Pradel et al., 1999; Nakagawa et al., 1997; Gaudin et al., 2000). Von anderen Arbeitsgruppen werden immunsuppressive Eigenschaften des *env*- Gens von HERV-H Proviren diskutiert (Mangenev et al., 2001; deParseval et al., 2001). Bei allen beschriebenen Assoziationen mit humanen Erkrankungen sind jedoch weitere Studien notwendig, um die zwingende Beteiligung der HERV-Produkte an der Etablierung dieser Krankheiten zu bestätigen.

1.4 Die HERV-K(HML-2) Familie

1.4.1 Identifikation und Unterteilung

HERV-K10(+) wurde 1986 von Ono et al. als ein neuer Vertreter der HERV-K-Gruppe beschrieben. Im Gegensatz zu den anderen humanen retroviralen Vertretern, die starke Mutationen und Deletionen aufweisen, zeigt dieses Virus relativ wenige Mutationen. Jeweils ein Stopkodon führt zu einer vorzeitigen Unterbrechung der funktionellen Leserahmen für Gag, Pol und Env (Ono et al., 1986). Bei Sequenzanalysen wurden verschiedene Sequenzen nachgewiesen, die sich durch eine 290 bp große Deletion am *pol-env*-Übergang unterschieden. Die als ursprüngliches Provirus angesehene Variante enthielt nicht die 290 bp große Deletion. Bereits 1993 konnten jedoch verschiedene HERV-K10 abgeleitete RNA-Produkte oder DNA-Sequenzen nachgewiesen werden, die für vollständige Produkte von *gag*, *prt*, *pol* und *env* kodierten (Mueller-Lantzsch et al., 1993; Löwer et al., 1993). Ein Vergleich mit der von Ono publizierte Sequenz zeigte, außer einigen Basensubstitutionen, 2 weitere bp, die im *pol*-Bereich von HERV-K10(+) durch Mutationen zustande kamen. Diese beiden Basenpaare führten zu einem vollständig offenen Leserahmen für *env*. Durch eine weitere Insertion eines Basenpaares im Gag Leserahmen kam es zu einem vollständig offenen Leserahmen für *gag* (Müller-Lantzsch et al., 1993). Von Löwer et al. (1993,1995) wurde eine neue Bezeichnung eingeführt, die die Variante ohne die Deletion als Typ2 und analog die deletierte Form als Typ1 benannte. Insgesamt hat man im menschlichen Genom 30-50 Kopien von HERV-K-10 verwandten Proviren gefunden (Meese et al., 1996). Sequenzanalysen von Medstrand und Blomberg (1993) zeigten ferner 6 unterschiedliche Subfamilien von HERV-K, die sie von 1-6 nummerierten und bei denen die von Ono et al. und Löwer et al. charakterisierten HERV-K Sequenzen zur Familie HML-2 gezählt werden. Diese 6 Subfamilien wurden 1999 um vier neue Vertreter erweitert (siehe Tab. 2)(Andersson et al., 1999). Die zusätzliche Bezeichnung HML bezieht sich hier wiederum auf die Homologie dieser Familie zu MMTV (*human MMTV-like*).

Bisher wurden 10 verschiedene HERV-K(HML-2) Typ 1 und 11 verschiedene Typ 2 Proviren genauer charakterisiert von denen jeweils 2 repräsentative Vertreter in Abbildung 1.2 dargestellt sind (Barbulescu et al., 1999; Costas

2001; Sugimoto et al., 2001; Turner et al., 2001). Altersbestimmungen, die auf der gefundenen LTR- Sequenzdivergenz eines Elementes basieren, wiesen auf eine Parallelentwicklung beider Provirusstypen hin, da man ebenso evolutionär „alte“ wie „junge“ Typ1 Proviren im menschlichen Genom finden kann (Barbulescu et al, 1999). Das erste Auftreten der 292 bp Deletion wird nach Arbeiten von Mayer et al. (1998) auf einen Zeitraum nach der Trennung der Orang-Utan Linie von den anderen Menschenaffen datiert. Die meisten HERV-K- Phylogenetiker gehen dann von einer parallelen Weiterentwicklung der beiden Gene nach dem „*master- gene model*“ aus (Medstrand und Mager, 1998). Costas et al. postulierte jedoch 2001 aufgrund seiner „*neighbor- joining tree*“ Analyse mit 14 verschiedenen vollständigen Proviren die Hypothese, dass zwei vermeintlich phylogenetisch alte Typ 1 Sequenzen aus einer Rekombination zwischen einem alten Typ 2 Provirus und einem jungen Typ 1 Virus hervorgegangen sind. Nach dieser Hypothese fand die Manifestation der HERV-K(HLM-2) Typ 1 Elemente wesentlich später als bisher angenommen statt und lange nach den ersten Integrationsereignissen von Typ 2 Proviren.

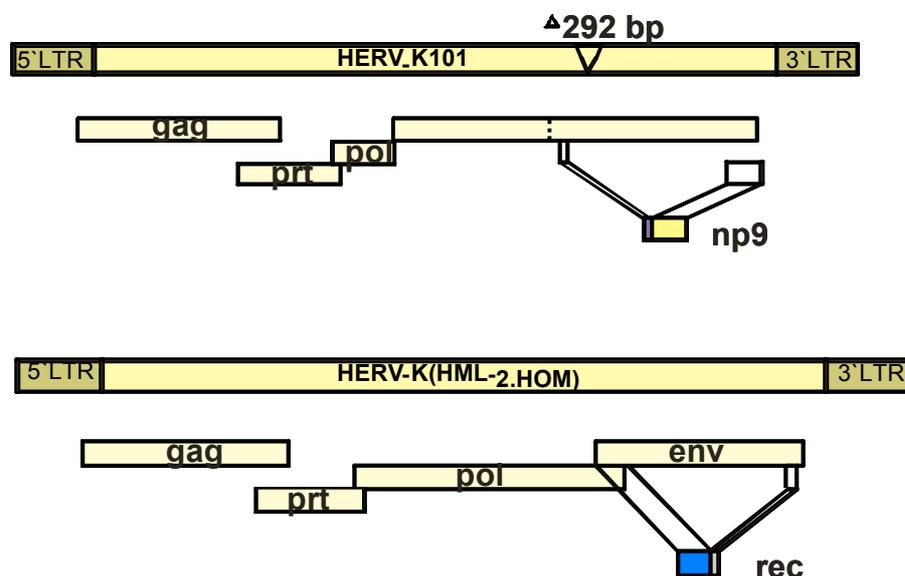


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Proviren HERV-K101 und HERV-K(HML-2.HOM). Die Abbildung zeigt die beiden Proviren mit allen anhand der Sequenzen von Barbulescu et al., 1999 und Mayer et al. 1999 abgeleiteten, offenen Leserahmen der bisher charakterisierten Gene. HERV-K101 stellt hierbei einen Repräsentanten der Typ 1 Proviren und HERV-K(HML-2.HOM) der Typ 2 Proviren dar.

1.4.2 Expression in humanen Geweben

1.4.2.1 *Expression von Partikeln*

HERV-K kodiert als einzige humane endogene retrovirale Familie retrovirale Partikel. Diese Partikel wurden erstmals in Teratokarzinomzelllinien nachgewiesen und in Anlehnung daran HTDV-Partikel (*human teratocarcinoma-derived particle*) genannt (Löwer et al., 1984). Dabei wurde auch eine Mg⁺-abhängige RT-Aktivität nachgewiesen. Boller et al. zeigte 1993, dass diese HTDV-Partikel von HERV-K(HML-2) kodiert werden. Bisher konnte jedoch keine Infektiosität HERV-K- abgeleiteter Partikel nachgewiesen werden (Tönjes et al., 1997).

1.4.2.2 *Expression von Transkripten*

Man findet komplexe Expressionsmuster aus ungespleißten sowie einfach und mehrfach gespleißten HERV-K Transkripten in HERV-K exprimierenden Zelllinien und Geweben, d.h. vorrangig in Brustkrebs- und Keimzelltumor-abgeleiteten Zellen (Löwer et al., 1993; Etkind et al., 1997; Wang-Johanning et al., 2001, Armbruester et al., 2002; Wang-Johanning et al., 2003). Über die Regulation der Transkription ist bislang relativ wenig bekannt. Akopov et al. identifizierte die bisher nicht näher charakterisierten LTR- bindenden Proteine Erf-1, Erf-2 und Erf-3 (Akapov et al., 1998). Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt eine Aktivierung der HERV-K- LTRs durch die Bindung des Transkriptionsfaktors YY1 an diese LTRs (Knößl et al., 1999).

Die regulatorischen Bereiche im LTR stellen eine Determinante der gewebsspezifischen Expression der HERVs dar. Casau et al. (1999) konnte zeigen, dass ein lacZ-Gen, das in einer transgenen Maus unter der Kontrolle eines HERV-K –LTRs steht, nahezu ausschließlich im Testisgewebe und in geringem Maße in Hirngewebe exprimiert wird. Ruda et al. (2004) zeigte ebenfalls eine zelltypspezifische Regulierung verschiedener HERV-K LTR`s in diversen Zelllinien und eine weitere Arbeit beschrieb eine vielfach erhöhte Expression von HERV-K Typ 1 *env*- Transkripten in Brustkrebsgeweben im Vergleich zu Typ 2 *env*-Transkripten (Etkind et al., 1997).

HERV-K RNA ist in den meisten Geweben nicht oder in peripheren Blutlymphozyten, Knochenmark und Plazenta nur mittels hoch sensitiver Methoden zu detektieren (Brodsky et al., 1993; Medstrand und Blomberg, 1993; Tönjes et al., 1996). Wohingegen in Keimzelltumoren und den hiervon abgeleiteten Zelllinien Transkripte des *env*-Leserahmens in großen Mengen nachzuweisen sind (Herbst et al., 1996; 1998; Wang-Johanning et al., 2001; Armbruester et al., 2002; Etkind et al., 1997).

1.4.2.3 *Expression von Proteinen*

In einem signifikanten Prozentsatz (63 %) von Patienten mit Keimzelltumoren (GCT), nicht jedoch in gesunden Kontrollpersonen oder in anderen Patienten, hat man hohe Antikörpertiter gegen die HERV-K Proteine Gag und Env nachweisen können (Sauter et al., 1995). Die Tumorbiopsien von Patienten mit nachweisbaren Antikörpertitern wurden hinsichtlich der Expression des HERV-K Gag untersucht. Weiterhin konnte man Gag-verwandte Proteine im Zytoplasma der Tumorzellen mittels Immunhistochemie feststellen, während das umliegende Gewebe, sowie das Gewebe Gesunder negativ blieb (Sauter et al., 1995). In der Zelllinie Tera-1 konnte Gag als 80 kDa Vorläuferprotein und in Form kleinerer Produkte nachgewiesen werden (Sauter et al., 1995), wohingegen in der Ovarialkarzinomzelllinie PA-1 nur das 80 kDa Vorläuferprotein detektierbar war (Götzinger et al., 1996).

Antikörper gegen Env waren in Seminomen noch häufiger nachweisbar (Sauter et al., 1996). Der Nachweis von endogenem Env- Protein konnte bislang einmal von Boller et al. (1993) erbracht werden. Das 1995 von Löwer et al. identifizierte Rec- Protein (ehemals cORF) konnte bislang nur in den Keimzelltumorzelllinien GH, Tera1 und Tera-2 auf Proteinebene nachgewiesen werden. Auch Protein des *env* Spleißprodukts vom HERV-K Typ 1, Np9 konnte bisher nicht in Zelllinien, soweit diese nicht mit dem Proteasomeninhibitor MG132 behandelt wurden, oder in Tumorgewebe nachgewiesen werden (Armbruester et al., 2002).

1.4.3 Die Genprodukte des HERV-K(HML-2)

HERV-K besitzt offene Leserahmen für die klassischen viralen Proteine Gag, Prt, Pol und Env, die wie bei exogenen Retroviren zunächst als Polyproteine translatiert und später in die einzelnen Komponenten gespalten werden. Zusätzlich findet man auf einer zweifach gespleißten mRNA des Typ 2 Virus einen weiteren offenen Leserahmen von dem das regulatorische Protein Rec (regulator of expression encoded by *corf*) exprimiert wird (Löwer et al., 1995). Bei dem Typ1 Virus wird ebenfalls von einer zweifach gespleißten mRNA das 9 kDA große Protein Np9 (*nuclear protein*) exprimiert (Armbruster et al., 2002).

Der *gag*- Leserahmen kodiert für die gruppenspezifischen Antigene zu denen die Matrix (MA)- Kapsid (CA)- und Nukleokapsidproteine (NC) gehören und befindet sich unmittelbar stromab des 5`-LTR`s (siehe Abb. 1.2). Im Folgenden werden die Gag-Proteine von HIV näher beschrieben, da diese besser charakterisiert sind als die Gag-Proteine von HERV-K. Außerdem geht man davon aus, dass ähnliche Prozesse beim Zusammenbau der HERV und HIV- Virionen in der Zelle stattfinden (Boller et al., 1993; Götzinger et al., 1996; Bieda et al., 2001).

Gag wird als Vorläuferprodukt an den freien Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert, von wo aus das Vorläuferprotein durch zelluläre Faktoren an die Zytoplasmamembran transportiert wird und dort mit den Fettsäuren interagiert. Dieser Vorläufer wird während der Reifung in abknospenden Viruspartikeln von der viralen Protease in seine Untereinheiten gespalten (Kräusslich und Welker, 1996). Nachdem sich das Matrixprotein an der Zellmembran angelagert und damit die Partikelbildung eingeleitet hat, bindet an den ausknospenden Membranbereich ein Komplex aus NC und CA, der das virale RNA-Genom unmittelbar umgibt (Yu et al., 1992; Sakalian und Hunter, 1998). Hierbei komplexiert das stark hydrophile NC-Protein direkt mit der RNA, und vermittelt dadurch die charakteristische Struktur des dimeren RNA-Genoms im reifen Virus. Dieser RNA-NC Komplex wird anschließend von den Kapsidproteinen umschlossen, die wiederum mit den MA-Proteinen assoziieren.

Stromab des *gag*- Leserahmens befindet sich der Leserahmen für die virale Protease (*Prt*, siehe Abb.1.2). Bei den Vertretern der HERV-K(HML-2) Familie handelt es sich hier um eine Aspartatprotease, die im 3. Leseraster von einem ungespleißten RNA- Transkript translatiert wird (Schommer et al., 1996; Müller-Lantzsch et al., 1993). Die Proteinsynthese erfordert einen gezielten Rasterschub um -1. Vermutlich wird der Rasterschub um ein Nukleotid in 5`- Orientierung ähnlich wie bei HIV über sogenannte *slippery- heptanucleotids* SH und Pseudoknot-Strukturen vermittelt, da sich homologe Bereiche am *prt-pol*- Übergang nachweisen lassen (Hatfield et al., 1990; Jacks et al., 1988; Brierley et al., 1989; Brierley et al., 1993; Ten Dam et al., 1992; Schommer, Dissertation, 1996).

Auch über die von HERV-K kodierten Enzyme ist bislang wenig bekannt. In den in Zellkultur nachgewiesenen HERV-K-Partikeln konnten RT-Aktivitäten nachgewiesen werden (Boller et al., 1993). Jedoch scheint die von HERV-K kodierte Polymerase eine nur geringe Aktivität zu besitzen (Tönjes et al., 1996; 1997; Berkhout et al., 1999). Kitamura et al. (1996) berichtete von einer HERV-K *pol*- Sequenz mit einer spezifischen Endonuklease/Integrase Aktivität. Bei HERV-K werden die Proteine des *gag*- und *prt*- Leserahmens von einem ungespleißten Transkript translatiert (Müller-Lantzsch et al., 1993). Ob dies bei Pol ebenfalls der Fall ist und durch welche Motive und Sekundärstrukturen der hierzu notwendige Rasterschub am *prt/pol*- Übergang in der HERV-K(HML-2) Sequenz ausgelöst wird, konnte noch nicht gezeigt werden.

Das *env*-Gen, das für ein Env- Vorläuferprotein kodiert, liegt am 3`- Ende des viralen Genoms Tönjes et al. zeigte 1997, dass das HERV-K(HML-2) Env als glykosyliertes Protein in Säuger- und Insektenzellen exprimiert werden kann, jedoch war nach der Abspaltung des Signalpeptides keine Prozessierung in TM- und SU- Domäne und auch kein Transport an die Zelloberfläche zu beobachten. Vermutlich ist die fehlende Prozessierung und Spaltung von Env der Grund dafür, weshalb bislang keine infektiösen HERV-K(HML-2) Partikel im Menschen nachgewiesen werden konnten. Im *env*-Bereich liegt bei dem Typ2 Virus die kodierende Sequenz für das Rec Protein, das Inhalt von Kapitel 1.5 ist. In der *env*-Sequenz des Typ1 Virus liegt die Information für das Np9-Protein (s. Kapitel 1.6).

1.4.4 Das akzessorische Protein Rec

Sequenzanalysen konnten zeigen, dass HERV-K Proviren neben den Transkripten *gag*, *prt*, *pol* und *env* weitere Transkripte kodieren, die durch alternatives Spleißen entstehen. HERV-K Typ I codiert für das Np9 Protein und Typ II für das akzessorische Protein Rec.

HERV-K Typ II besitzt innerhalb der *env*-Gensequenz einen offenen Leserahmen, der erstmals 1995 von Löwer et al. beschrieben worden ist. Die Arbeitsgruppe konnte die Expression des damals genannten cORF Proteins (*central open reading frame*) mittels Immunfluoreszenz und Immunpräzipitationen in zwei keimzelltumorabgeleiteten Zelllinien zeigen (Löwer et al., 1995). Mit Rec erhielt man erstmals ein Hinweis auf die Komplexität der HERV-K(HML-2)- Familie, da Rec von einer doppelt gespeißten mRNA abgelesen wird. Das 105 AS große Protein teilt sich die aminoterminalen 87 AS mit Env, hingegen wird das 2. Exon, das für weitere 18 AS kodiert, in einem von Env verschiedenen Raster gelesen. Mit der Lokalisation des Proteins in den Nukleoli, der Identifikation von potentiellen Domänen für Kernimport (NLS), -export (NES) und RNA-Bindung, sowie der Spleißcharakteristika wurde dem Protein eine Verwandtschaft mit den Rev/Rex Proteinen des HTL/HLI-Virus zugeschrieben (Magin et al., 1999; Yang et al., 1999). Analog dazu wird auch die Bezeichnung Rec benutzt. Durch zwei leucinreiche Domänen im C-Term (50-59 AS und 77-83 AS) erhält Rec seine Funktion, denn diese bilden das nukleäre Exportsignal (NES), das von dem zellulären Exportrezeptor Crm1 erkannt wird. Rec shuttelt demnach einfach- oder ungespleißte Transkripte über den Crm1-Weg ins Zytoplasma (Yang et al., 1999). Für Rec wurde bereits gezeigt, dass die Zugabe von Leptomycin B, ein spezifischer Crm1 Inhibitor, den viralen Export blockiert (Mager et al., 2000). Eine weitere funktionelle Gemeinsamkeit von Rev und Rec ist die Fähigkeit Multimere zu bilden (Boese et al., 2001).

Boese et al. (2000) zeigten dass die Expression von *rec* mit dem Auftreten von Tumoren assoziiert ist. So konnte gezeigt werden, dass in immundefizienten Mäusen *rec*-exprimierende Rattenfibroblasten nach subkutaner Injektion zu Tumoren auswuchsen (Boese et al., 2000). Da bereits zuvor eine Korrelation zwischen der Expression von HERV-K(HML-2) Produkten und Keimzelltumoren beobachtet wurde, postulierte man eine

Beteiligung von Rec bei der Ausbildung dieses Phänotyps (Sauter et al., 1995; 1996; Herbst et al., 1996; 1998). Diese Beteiligung könnte eine Folge der Interaktion zwischen Rec und PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger protein*), ein Transkriptionsrepressor, der in Mäusen schwere Defekte in der Extremitätenausbildung und eine abnorme Spermatogenese auslöst, sein (Hawe et al., 1996; Boese et al., 2000).

Nach Heimdal et al. (1997) prädisponiert eine frühe Störung in der Spermatogenese die Ausbildung von *Carcinoma in situ*-Läsionen, die ihrerseits als Vorläuferläsionen für Keimzellneoplasien wie Seminome und Teratokarzinome gelten (Herbst et al., 1998).

Galli et al. konnte zeigen, dass *rec*- transgene Mäuse im Alter von 12 Monaten Neoplasien in den Testes aufweisen, die im Alter von 19 Monaten mit einem spezifischen Verlust der Differenzierung von Spermatozyten über Spermato gonien zu Spermatischen und einen verminderten Durchmesser der Seminiferi tubuli einhergehen (Galli et al., 2005). Trotz dieser signifikanten morphologischen Veränderungen konnten jedoch immer noch Spermatischen im Lumen der Seminiferi tubuli nachgewiesen werden. In Verbindung mit den beobachteten Studien deutet das transformierende Potential von Rec und die Bindung an PLZ auf eine mögliche Rolle in der Tumorigenese hin.

1.4.5 Das HERV-K Gen *np9*

Im Jahre 2000 wurden in der Arbeitsgruppe Mueller-Lantzsch weitere Transkripte des *env*- Leserahmens von HERV-K(HML-2) Proviren mittels RT-PCR in verschiedenen Tumorgeweben (Mammarkarzinome, Keimzelltumor, Ovarial Karzinome) und transformierten Zelllinien identifiziert. Eine der Spleißvarianten zeigte hierbei eine auffällig signifikante Präsenz in allen untersuchten Seminombiopsien. Dieses Transkript teilt sein 1. verkürztes Exon mit den ersten 44 Basen von *env* und *rec*, verwendet dann jedoch zur Translation des 2. Exon ein von Rec und Env verschiedenes Leseraster (siehe Abb. 1.2), womit die ersten 15 Aminosäuren von den ersten Exons von Np9 und Rec identisch sind. Innerhalb des zweiten Exons wurden neben einer putativen Casein-Kinase-II-Phosphorylierungsdomäne drei mögliche Kernlokalisationssignale (NLS's) detektiert. Dieses HERV-K Gen, das im

folgenden Np9 genannt wird, wird ausschließlich von dem Typ1 Provirus codiert, wegen seiner 292 bp großen Deletion und der damit verbundenen Typ1 spezifischen Spleiß-Donor-Seite. Weitere Datenbankanalysen ergaben, dass sich die *np9*-Gensequenz auf den Chromosomen 3q13 und 22q11 wiederfindet.

Seinen Namen erhält Np9 (nukleäres Protein von 9 kDa) durch seine Lokalisation in distinkten subnukleären Strukturen, die mittels EGFP-fluoreszenzbasierten Zelllokalisationsanalysen gezeigt wurde. Dies ließ vermuten, dass zumindest eines der drei identifizierten NL-Signale heute noch funktionell ist. Da *np9* Transkripte ausschließlich in Tumormaterial und in transformierten Zellen zu finden ist, war es von großem Interesse Interaktionspartner des Proteins zu finden und damit einen weiteren eventuellen Hinweis auf den Einfluss von Np9 in der Tumorigenese aufzudecken. Im Hefe-II-Hybridsystem wurde u.a. die E3-Ubiquitinligase LNX (ligand of Numb protein X) als zelluläres Partnerprotein von Np9 identifiziert (Armbruster et al., 2004). Ursprünglich wurde die Ubiquitinligase als Numb bindendes Protein identifiziert, das Numb ubiquitiniert und es dadurch zum Abbau durch das 26S Proteasom markiert. Numb spielt eine wesentliche Rolle bei der asymmetrischen Zellteilung in der Embryonalentwicklung. In GST (Glutathion-S-Transferase)- Pulldown-Analysen und Kollokalisationsstudien wurden mindestens 2 Interaktionsdomänen der Proteine beschrieben. Weiterhin konnte eine Veränderung der subnukleären Lokalisation von LNX detektiert werden, indem das LNX Protein durch Np9 in die Nukleoli transloziert wird. Es wird postuliert, dass LNX das Np9 Protein für den Abbau markiert und somit für die geringe Stabilität des Proteins verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei Np9 um ein sehr instabiles, kurzlebigen Protein handelt, das erst durch Hemmung des 26S Proteasoms mit MG132 in der Teratokarzinom-Zelllinie Tera-1 stabilisiert wird und dadurch erstmals endogen nachgewiesen werden konnte (Armbruster et al., 2004).

1.5 Die Interaktionspartner

1.5.1 Der Transkriptionsrepressor PLZF (Promyelozytisches Leukämie Zink Finger Protein)

Unter Betracht der unklaren Rolle von Rec während der Keimzelltumorigenese wurden mit Hilfe des Hefe II Hybrid Systems Interaktionspartner von Rec gesucht. Mit Rec als „Fänger“ wurde eine humane Testis cDNA-Bank durchmustert und das PLZF (*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*) Protein als Interaktionspartner identifiziert. Diese Interaktion wurde durch erste GST-Pulldown Experimente, Koimmunpräzipitationen und Immunfluoreszenzen bestätigt (Boese et al., 2000). Hierbei konnte die Bindung des kompletten PLZF und des gesamten Rec, weiterhin eine partielle Kolo-kalisation der beiden Proteine gezeigt werden. Im Hefe II Hybrid System konnte die Bindungsdomäne von Rec zu einem mittleren Teil von PLZF eingegrenzt werden (Boese et al., 2000).

PLZF wurde erstmals in Patienten mit einer bestimmten Form der akuten promyelozytischen Leukämie (APL) beschrieben. Dort liegt PLZF zum RAR α (*retinoic acid alpha receptor*) Rezeptor transloziert vor und bildet mit diesem ein Fusionsprotein (Chen et al., 1993a; Chen et al., 1993b). Diese Translokation führt zur Synthese aberranter Retinol- Rezeptoren, welche die retinolsäurevermittelte Genexpression beeinflussen. Das hat letztendlich zur Folge, dass die Zellen nicht mehr differenzieren können und daher unkontrolliert proliferieren. Außerdem sprechen APL Patienten durch diese Fusion nicht auf die bei anderen APL- Formen erfolgreiche Differenzierungstherapie durch *all-trans* Retinolsäure (ATRA) an (Guidez et al., 1994; Melnick et al., 1999).

PLZF ist ein Transkriptionsrepressor, der mit den vier äußersten von neun C-terminalen *Kruppel*-like (C2-H2) Zinkfingerdomänen an spezifische DNA-Sequenzen bindet (s. Abb. 1.3) (Sitterlin et al., 1997; Li et al., 1997). In einer kürzlich erschienen Arbeit konnte Guidez et al. (2005) zeigen, dass die Fähigkeit von PLZF DNA zu binden und die Transkription zu reprimieren unter anderem reguliert wird von der Azetylierung der äußersten C-terminalen Zinkfinger. Die 120 AS große N-terminale Domäne wird charakterisiert durch

eine (BTB bric-à-brac, tramtrack, brad complex)/poxvirus zinc finger (POZ) Domäne, mit der PLZF an einen Komplex aus Korepressorproteinen (N-CoR, SMRT, Sin3A und HDAC1) bindet (s. Abb. 1.3). Dieser Komplex ist notwendig, um die für die Repressorfunktion notwendigen Veränderungen des Chromatingerüsts sowie die Histondeazetylierung zu vermitteln (Hong et al., 1997; He et al., 1998; Lin et al., 1998; Grignani et al., 1998; David et al., 1998). Weiterhin ist die Lokalisation von PLZF in subnukleären Strukturen, der Effekt der Unterdrückung der Zellteilung durch PLZF, die Homomultimerisierung des Proteins sowie die Bindung an das homologe TZFP/FAZF Protein abhängig von der POZ-Domäne (Bardwell und Teisman, 1994; Hoatlin et al., 1999; Melnick und Licht, 1999). Der zentrale Teil des Proteins besteht aus einer Prolin-reichen Domäne, an der weitere Proteine binden können und wahrscheinlich die Funktion von PLZF beeinflussen (Hyman et al., 2000; Melnick et al., 2000; Melnick und Licht, 1999). PLZF ist ein negativer Regulator der Zellzyklusprogression und die Herabregulierung des CyclinA2 Promotors ist mitunter für diesen Phänotyp verantwortlich (Yeyati et al., 1999). Ein weiterer von PLZF beeinflusster Promotor ist der *c-myc*-Promotor (McConnell et al., 2003). PLZF ist in der Lage die Expression des Onkogens *c-myc* direkt über Bindung an den *c-myc*- Promotor zu regulieren und zu reprimieren.

Im Menschen kann PLZF mRNA in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, starke PLZF Proteinexpression findet man jedoch nur während der Hämatopoese in unreifen CD34 + Vorläuferzellen. Die PLZF Proteinsynthese lässt allerdings in diesen Zellen mit Fortschreiten ihrer Differenzierung nach (Reid et al., 1995). Was darauf hinweist, dass PLZF eine Rolle spielen könnte bei der Aufrechterhaltung des Ruhestatus der Stammzellen. Im Gegensatz dazu wird PLZF Expression während der megakaryozytischen Reifung hochreguliert (Labbaye et al., 2002). Auch die jüngsten Arbeiten über PLZF weisen auf eine Assoziation zwischen der *plzf*- Expression und Keimzelltumoren hin. Die Arbeiten von Buas et al. (2004) und Costoya et al. (2004) zeigen, dass PLZF für die Selbsterneuerung von Keimzell-Stammzellen notwendig ist.

In situ Analysen von Maus Embryonen zeigten ein PLZF Expressionsmuster, das dem der Homeobox (HOX) Genen ähnlich ist. Weiterhin wurden bei

PLZF^{-/-} -Tieren schwere Defekte in der Extremitätenbildung beobachtet. Daher wurde postuliert, dass die Anlage der Struktur und Musterbildung des Skeletts gestört ist durch die fehlende Regulierung von den *hox*- Genen durch PLZF (Barna et al., 2000). Eine weitere Verbindung von PLZF und den *hox*- Genen, genauer dem HOXB7 Gen, findet man in Melanomen bzw. in Melanocyten. PLZF wird nur exprimiert in Melanocyten, nicht aber in Melanomen (Felicetti et al., 2004). Im Gegensatz wird HOXB7 nur in Melanomen, nicht in Meloncyten exprimiert (Care et al., 1996, 1998).

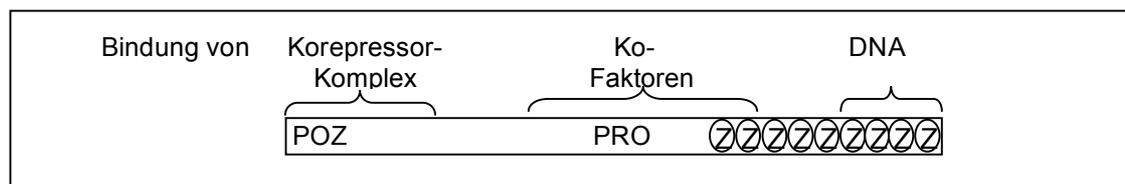


Abb.1.3: Schematische Darstellung des PLZF Proteins: Funktionelle Domänen und Bindungsstellen. Der N-Terminus des PLZF Proteins (POZ-Domäne) interagiert mit einem Korepressorkomplex. Im Bereich der prolinreichen Region (PRO) und der ersten Zinkfinger (Z) binden Kofaktoren. Die vier C-terminalen Z-Domänen binden spezifisch DNA-Sequenzen.

1.5.2 Der humane Spleißfaktor 61K

Ein weiterer Interaktionspartner von Rec, der im Hefe II Hybrid System von der AG Müller-Lantsch gefunden wurde (unveröffentlichte Daten, pers. Mitteilung), ist der humane Spleißfaktor 61K, der mittels Sequenz- und Datenbankanalysen zugeordnet werden konnte (Makarova et al., 2002). Während seiner Promotion konnte Galli erste Bindungsstudien zwischen Rec und dem 61K Protein durchführen, wobei er in GST- Pulldown-, Koimmunpräzipitations- und Kolokalisationsexperimenten die Interaktion der beiden Proteine bestätigen konnte (Promotion Uwe Galli, 2004). Das 61K Protein wurde erstmals von Makarova et al. 2002 beschrieben. Es handelt sich um ein 61 kDa großes Protein, das innerhalb des Spleißosoms am Zusammenbau der Untereinheiten U4/U6-U5 tri-snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*) beteiligt ist. Das Spleißosom setzt sich für jede Reaktion (d.h. das Entfernen eines Introns) aus seinen Einzelteilen direkt auf der mRNA

zusammen. Dabei bindet in Säugerzellen das U1 snRNP zunächst die 5' Spleißstelle und initiiert die weitere Assemblierung des Spleißosoms. Das U2 snRNP bindet unter Mithilfe weiterer Proteinfaktoren die 3'Spleißstelle des Introns. Schliesslich erfolgt die Bindung des so genannten tri-snRNPs, einem Komplex aus den U4, U6 und U5 snRNPs. Nach strukturellen Umlagerungen, an denen weitere nicht snRNP Faktoren beteiligt sind, entsteht schließlich das aktive Spleißosom, dem die U1 und U4 snRNPs fehlen. U4 snRP fungiert wahrscheinlich als Inhibitor, der durch U6 snRP verdrängt wird. Das katalytische Zentrum wird aus einer Helix von U2 snRP und U6 snRP gebildet. Dieses katalysiert den ersten Schritt (die erste Umesterung) des Spleißprozesses wodurch das Spleißing- Intermediat (freies 5' Exon und 3'Exon-Intronlariat) entsteht. Nach weiteren Änderungen der Struktur und Zusammensetzung des Spleißosoms erfolgt schließlich der zweite Reaktionsschritt der abschließend zum Freisetzen der Produkte und zum Zerfall des Spleißosoms führt (Krämer 1996, Burge et al., 1999). Für eine weitere Spleißrunde muss der gesamte Komplex neu aufgebaut werden (Nilsen, 1998; Staley und Guthrie, 1988). Über Interaktionen, die die Assoziation des U4/U5/U6 tri-snRNP Komplexes bewirken, ist bisher nur wenig bekannt. Man postuliert, dass Protein-Protein Interaktionen eine Hauptrolle bei der Formation von tri-snRNP Komplexen spielen. Beim Menschen besteht ein Komplex aus mindestens 29 unterschiedlichen Proteinen, von denen die meisten hoch konserviert sind. Es konnten in den Organismen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizisaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans* und *Arabidopsis thaliana* Homologe zu dem 61K-Protein gefunden werden, die auch wiederum als Spleißfaktor fungieren. (Weidenhammer et al., 1996; Bishop et al., 2000; Makarova et al., 2002).

Eine Mutation des *PRPF31*-Gen, das für 61K codiert, wird in Verbindung gebracht mit der autosomal dominant vererbten Krankheit „Retinitis pigmentosa“ (adRP) (Vithana et al., 2001). Hierbei handelt es sich um einen Defekt der Fotorezeptoren in den Stäbchen, wobei die Stäbchenzellen sehr sensitiv auf eine reduzierte Anzahl an funktionellen tri-snRNPs reagieren. Vermutlich liegt das 61K Protein nicht mehr in ausreichenden Mengen als funktionelles Protein vor, was zu einer Störung beim Aufbau der tri-snRNP-Komplexen führt.

Weitere Datenbankanalysen ergaben, dass ein mittels SEREX-Methode (serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries) identifiziertes Brustkrebsantigen (NY-BR-99), homolog zu den AS 240 bis 1080 der Spleißnukleotidsequenz ist (Jäger et al., 2001). Innerhalb der Sequenz sind ein Kernlokationssignal und ein bZIP-Motiv (DNA-Bindungsstelle gefolgt von einem Leucin Zipper Motiv) lokalisiert. Aufgrund der Sequenzanalyse vermutet man, dass NY-BR-99 ein kernlokalisierter Transkriptionsfaktor ist, der sowohl als Tumormarker als auch als ein Protein mit tumorigenen Potential in Frage kommen könnte. Die Expression von NY-BR-99 konnte in Brustkrebsgewebe von 21 von 25 Patientinnen gefunden werden (Jäger et al., 2001).

1.6 Ziele der Arbeit

Um einen besseren Einblick in diese zellulären Vorgänge bezüglich der HERV-K Proteine Rec und Np9 zu erhalten, wurden das Hefe II Hybrid System verwandt. Mit dieser Methode konnte das Promyelozytische Leukämie Zink Finger Protein (PLZF) und das 61 K Protein identifiziert werden. PLZF ist ein Transkriptionsrepressor, der in Patienten mit einer bestimmten Form der akuten promyelozytischen Leukämie zum RAR α Lokus transloziert ist. PLZF knock-out Mäuse zeigen Defekte in der Extremitätenbildung, unterentwickelte Testis und eine beeinträchtigte Spermatogenese, die zur Fertilität führt. Weiterhin könnte PLZF in der Lage sein in die Tumorigenese einzugreifen, indem das Protein den *c-myc* Promotor reprimiert. In Anbetracht dieser grundlegenden Funktionen von PLZF stellt dieses Protein nicht nur einen wichtigen Interaktionspartner für das mit Keimzelltumoren assoziierte Rec dar, sondern auch für das ausschließlich in Tumoren gefundene Np9. Aufgrund der übereinstimmenden ersten 15 AS der beiden HERV-K Proteine, wird auch eine mögliche Interaktion von Np9 und PLZF postuliert. Ziel der Arbeit sollte sein, Hinweise auf die Beteiligung der HERV-K Proteine Np9 und Rec innerhalb der Tumorigenese über den PLZF Pathway zu erhalten.

Der Nachweis der Interaktion zwischen Np9 und PLZF sollte dabei zum einen mit Hilfe eines Zelllokalisations-Assays mit dsRED-Np9 und EGFP-PLZF erfolgen. Weiterhin sollte die spezifische Bindung der beiden Proteine durch GST-Pulldown-Analysen bestätigt werden. Mit Hilfe von verschiedenen Deletionsmutanten sollte die Bindungsstelle von PLZF und Np9 eingengt werden. Die Interaktion sollte mit Koimmunpräzipitationen verifiziert werden. Weiterhin sollte die Bindungsdomäne zwischen Rec und PLZF genauer charakterisiert werden. Dazu sollten verschiedene Deletionsmutanten von Rec und PLZF in GST-Pulldown Analysen auf ihre Bindung getestet werden. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Studie war die funktionelle Charakterisierung der Rec/PLZF- bzw. Np9/PLZF- Bindung. Um Hinweise auf einen möglichen funktionellen Einfluss von Rec auf den von PLZF regulierten *c-myc* Promotor zu erhalten, sollen Luziferase Assays mit diesem durchgeführt werden. Ein weiterer Aspekt sollte die Herstellung einer stabilen Np9 bzw. Rec Zelllinie sein. Hierzu sollte die Zelllinie verwendet werden, die PLZF anschaltbar reguliert. Mit Hilfe dieser Zelllinien sollten die Expressionslevel der einzelnen Proteine wie PLZF, Rec, c-Myc als auch von c-Myc regulierte Proteine bestimmt werden. Zusätzlich sollten diese Zelllinien verwendet werden um zu klären, ob Rec auch spezifische Veränderungen im Phänotyp der Zellen hervorruft. Daher sollte das Zellwachstum als auch die Apotoserate untersucht werden. Um einen weiteren Einblick in die Interaktion zwischen Rec bzw. Np9 und dem humanen Spleißfaktor 61K zu erhalten, sollten weiterführende Bindungsstudien mit Hilfe von GST-Pulldowns durchgeführt werden. Nicht nur die Bindungsstelle des 61K-Proteins zu Rec sondern auch zu Np9 soll mittels Deletionsmutanten eingegrenzt werden. Im Falle von Np9 sollten noch zusätzliche Kolokalisationsexperimente die postulierte Bindung unterstützen.

2 MATERIAL

2.1 Puffer

PBS-Puffer:	140 mM NaCl; 25 mM KCl; 0,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; 10 mM Na/K-PO ₄ ; pH 7,5
Uppergelstock:	0,5 M Tris/HCl; 0,4% Natriumdodecylsulfat (SDS); pH 6,8
Bottomgelstock:	1,5 M Tris/HCl; 20% Natriumdodecylsulfat (SDS); pH 8,8
SDS-Laufpuffer:	200 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,05% SDS
SDS-Transferpuffer:	200 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1% SDS, 20% Methanol pH 8,2-8,6
2x- Probenpuffer:	6,3% SDS (v/v); 2,5% Uppergelstock (v/v); 10% Mercaptopropandiol (v/v); 10% Glycerin (v/v)
TAE-Puffer (50x):	2 M Tris/HCl; 250 mM Natriumacetat; 500 mM EDTA; pH 7,8
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 7,6
GST-Kopplungspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,1% NP40 frisch zugeben: 2 mM Dithiothreitol (DTT), 0,2 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 20 µg/ml Aprotinin
Lysispuffer:	10 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,14 mM NaCl; 3 mM MgCl ₂ , 0,5% NP40 frisch zugeben: 2 mM Dithiothreitol (DTT), 0,2 mM PMSF, 20 µg/ml Aprotinin, 50 mg/m Lysozym
RIPA-Puffer	150 mM NaCl; 0,1% NP40; 0,5% DOC; 0,1% SDS frisch zugeben: 2 mM Dithiothreitol (DTT), 0,2 mM PMSF, 20 µg/ml Aprotinin

Weitere in dieser Arbeit verwendete Puffer sind in Kapitel 3 bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

2.2 Enzyme und dNTP`s

Alkalische Phosphatase	Boehringer
DNase I	Boehringer
dNTP`s	Boehringer
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs Inc.
Superscript II RT	Invitrogen
Taq- Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech
T4-DNA-Ligase	Promega
Viralex Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH

2.3 Molekulargewichtsmarker

DNA- Molekulargewichtsmarker:

Zur Größenbestimmung von DNA Fragmenten wurde der 1 kb+ Marker der Firma Invitrogen verwendet. Er enthält DNA Fragmente der Größen: 12 / 11 / 10 / 9 / 8 / 7 / 6 / 5 / 4 / 3 / 2 / 1,65 / 1 / 0,85 / 0,65 / 0,5 / 0,4 / 0,3 / 0,2 und 0,1 Kb.

Proteinmolekulargewichtsmarker:

Der Proteinmolekulargewichtsmarker für Immunoblots wurde nach den Angaben des LMW- Molekulargewichtsmarkers der Firma Pharmacia angesetzt und enthält Proteine mit den Molekulargewichten: 94 / 67 / 43 / 30 / 20 und 14 kDa.

Für Polyacrylamid- Gele mit radioaktiven Proteinen wurde der ¹⁴C-*methylated protein marker* der Firma Amersham verwendet. Er enthält ¹⁴C markierte Proteine der Molekulargewichte 200 / 92,5 / 68 / 46 / 30 und 14 kDa.

2.4 Bakterienstämme und Nährmedien

Zur Klonierung rekombinanter DNA und Amplifikation von Plasmiden wurde der *E.coli* Stamm pMOSblue (Amersham, pMOS-blue T-vector-Kit) verwendet

und zur Proteinexpression der *E.coli* Stamm BL21-DE3 (Studier und Moffatt, 1986) eingesetzt. Beide Stämme wurden in Luria- Broth- Medium oder auf Luria- Broth- Agarplatten der Firma Invitrogen kultiviert. Zur Selektion rekombinanter Bakterien ist den Medien je nach Selektionsmarker des transformierten Plasmides 100 µg Ampicillin bzw. 30 µg Kanamycin zugesetzt worden. Die Kultivierung zur Herstellung von transformationskompetenten pMOS oder BL21-DE3 Bakterien erfolgte in SOB-Medium (Trypton 20 g; Yeastextract (Difco) 5 g; NaCl 0,6 g; KCl 0,5 g ad 1000 ml).

2.5 Zelllinien

Cos-1: „African green monkey cells“, von Nierenzellen abgeleitete fibroblastenähnliche Zelllinie (Gluzman, 1981)

U937T: eine humane, monozytische Zelllinie, welche das tet-VP16 Gen unter der Kontrolle des tet-Operator Promotors stabil exprimiert (Gossen und Bujard, 1992)

U937T:PLZF: eine humane, monozytische Zelllinie mit induzierbarem PLZF, welches unter der Kontrolle von dem autoregulatorischen tet-off- System steht. Nach dreifachem Waschen mit PBS und Kultivierung in Tetrazyklin freiem Medium, wird PLZF nach 24 exprimiert (McConnell et al., 2003). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jonathan D. Licht, Division of Hematology/Oncology, Chicago

U937T:PLZF-CMV: Die Zelllinie U937:PLZF, die zusätzlich stabil den Vektor pHCMVpa exprimiert unter der Selektion von 0,3 mg/ml Hygromycin.

U937T:PLZF-Rec: Die Zelllinie U937:PLZF, die zusätzlich stabil das Konstrukt pHCMVpa-Rec exprimiert unter der Selektion von 0,3 mg/ml Hygromycin.

U937T:PLZF-Np9: Die Zelllinie U937:PLZF, die zusätzlich stabil das Konstrukt pHCMVpa-Np9 exprimiert unter der Selektion von 0,3 mg/ml Hygromycin.

293T: Epitheliale Zelllinie aus humanen, mit Adenovirus 5 transformierten Nierenepithelzellen (Graham et al., 1977).

2.6 Zellkulturmedien für Säugerzellen

DMEM: Die Zelllinien Cos-1 und 293T wurden in DMEM (PAA Laboratories GmbH) Medium zuzüglich 10% fetalem Kälberserum (Invitrogen), 1% Na-pyruvat und 4er Antibiotikum (40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat) kultiviert.

RPMI: Die Zelllinie U937T wurde in RPMI (PAA Laboratories GmbH) Medium zuzüglich 10% fetalem Kälberserum (Invitrogen), 1% Na-pyruvat und 4er Antibiotikum (40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat) kultiviert.

Das RPMI- Medium der Zelllinie U937:PLZF (McConnell et al., 2003) enthält darüber hinaus 1 mg/ml G418, 0,5 µg/ml Puromycin und frisch 0,1 µg/ml Tetrazyklin. Bei der Zelllinie U937:PLZF-Rec, -CMV, -Np9 wird zusätzlich 0,3 mg Hygromycin pro ml Medium dem Medium zugesetzt.

2.7 Antikörper

2.7.1 Monoklonale Antikörper

- anti- GST(6G9) aus der Ratte (Kooperation Dr. E. Kremmer, GSF, München)
- anti- PLZF aus der Maus (Calbiochem)
- anti- β -Actin aus der Maus (Sigma)
- anti- c-Myc (9E10):sc-40 aus der Maus (Santa Cruz)
- anti- PCNA sc56 aus der Maus (Santa Cruz)
- anti-p53 aus der Maus (Calbiochem)
- anti-IKB- α C-21 aus der Maus (Sigma)

2.7.2 Polyklonale Antikörper

- anti- Np9 (2.Exon)K82 aus Kaninchen (Arbeitsgruppe Prof. Müller-Lantsch)
- anti Rec K3086 aus Kaninchen (Arbeitsgruppe Prof. Müller-Lantsch)
- anti-61K 01 aus Kaninchen (Arbeitsgruppe Prof. Müller-Lantsch)
- anti-PLZF aus Kaninchen (Arbeitsgruppe Prof. Müller-Lantsch)

2.7.3 Peroxidase (POX)-gekoppelte Zweitantikörper

- anti Ratte-POX aus Kaninchen (Sigma)
- anti Kaninchen-POX aus der Ziege (Sigma)
- anti- Maus-POX aus Kaninchen (Sigma)

2.8 Chemikalien und andere Reagenzien

2.8.1 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den nachfolgenden Firmen in reinst Form bezogen: Sigma Aldrich (München), Serva (Heidelberg), Biozym (Rockland, USA), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt).

2.8.2 „Kits“ und Transfektionsreagenzien

- | | |
|--|-------------------------------|
| ○ <i>Gene-clean- Kit</i> | Dianova |
| ○ <i>ECL Western Blotting detection reagent</i> | Amersham Pharmacia
Biotech |
| ○ <i>FuGene-6 transfection reagent</i> | Roche |
| ○ Nanofectin™ | PAA |
| ○ NucleoSpin® Extract | Macherey und Nagel |
| ○ Nucleobond Plasmidextraktion | Macherey und Nagel |
| ○ T7- TNT <i>reticulocyten-coupled in vitro</i>
<i>transcription and translation system</i> | Promega |
| ○ TNT®Wheat germ extract systems | Promega |
| ○ Luciferase Assay System | Promega |

2.8.3 Photochemikalien

- | | |
|----------------------------------|-------------------|
| - Röntgen- Entwickler Konzentrat | ADEFO Chemie GmbH |
| - Röntgen- Fixier Konzentrat | ADEFO Chemie GmbH |
| - ECL- Hyperfilm | Amersham |

PLZF-GFP-BglIII-for	5'-CCG CGT agatct GAT CTG ACA AAA ATG -3'
PLZF-GFP-Sal-rev	5'-CCT GCT gtcgac TCA CAC ATA GCA CAG-3'
PEG-CB-for	5'-GCG CGC gaattc ATG TCT CTG GCA GAT G -3'
CB-Mitte-rev	5'-GCG ggatcc GTA CCT GCG GCC GCC-3'
Eco-GST-for	5'-G CGC GgaattcT ATG TCC CCT ATA CTA GGT -3'
GST-Eco-rev	5'-GCG CGC gaattc ACG CGG AAC CAG ATC CGA -3'
GFP-Eco-for	5'-CGC ATA gaattc ATG GTG AGC AAG GGC -3'
GFP-Eco-Rev	5'-GCT CAT gaattc GGA AGC TTG AGC TCG AGA TC-3'
CBΔATG-Xho	5'-GCG CGC ctcgag TCT CTG GCA GAT G -3'
CB-N-Term-rev	5'-GCG CGC ggatcc GTT CAG CTC GTT TTC -3'
YuTang-rev	5'-GCG CGC ggattc GTT CAG CTC GTT TTC -3'

2.11 Vektoren, Reporterplasmide und Konstrukte

2.11.1 parentale Vektoren

- pGEX-4T-1 Vektor:

Der pGEX-4T-1 Vektor der Firma Amersham- Pharmacia- Biotech wird verwendet um Fusionsproteine mit der 26kDa großen Glutathion-S-Transferase (GST) herzustellen. Hierfür besitzt er eine Multiple- Cloning- Site (MCS), die direkt an das *gst*- Gen anschließt. Des Weiteren beinhaltet der 4,9 kb große Vektor ein *E.coli*BR322 „ori“ (*origin of replication*), ein

Ampicillinresistenzgen, sowie ein *lac I^q* Markergen. Das Fusionsprotein steht unter der Kontrolle eines chemisch induzierbaren *tac*-Promotors, der eine hohe Expressionsrate gewährleistet. Die Multiple-Cloning-Site des Vektors beinhaltet außerdem eine Thrombin-Erkennungssequenz.

- pEGFP-C1 Vektor:

Der Vektor pEGFP-C1 der Firma Clontech wird benutzt um Fusionsproteine mit dem grün- fluoreszierenden- Protein *green fluorescent protein* (GFP) und einem rekombinanten Protein zu erzeugen. Solche Konstrukte werden verwendet um Zelllokalisationsstudien von Proteinen durchzuführen. Die Expression der Fusionsproteine wird durch einen CMV-Promotor kontrolliert und die gebildeten Transkripte erhalten einen Poly-A-Schwanz aufgrund des nachfolgenden SV40-Polyadenylierungssignals. Außerdem enthält der Vektor die Resistenzgene für Kanamycin und Neomycin zur Selektion in Bakterien und in eukaryotischen Zellen, sowie ein *E.coli* „ori“ und ein f1-Phagen „ori“ für die Bildung von Einzelstrang DNA.

- pGEM[®]-T Vektor

Der pGEM[®]-T Vektor der Firma Promega wird zur Klonierung von PCR-Produkten der Taq- Polymerase verwendet, da diese Polymerase allen Amplifikaten am 3'Ende ein Desoxyadenosin anhängt. Diese DNA-Fragmente können ohne einen vorherigen Restriktionsverdau in den mit überstehenden Desoxythymidinenden offenen Vektor inseriert werden. Für die Ligation von Produkten ohne überhängende Desoxyadenosinenden steht alternativ eine Multiple- Cloning- Site mit Erkennungssequenzen mehrerer Restriktionsenzyme zur Verfügung. Die erfolgreiche Insertion wird durch den Verlust des *lacZ*- Markergens in einem Blue/White Screening angezeigt. Mit Hilfe von T7-beziehungsweise SP6-RNA-Polymerasen, die ihre im Vektor enthaltenen spezifischen Promotoren erkennen, können „sense“ und „antisense“ RNA- Transkripte gebildet werden. Der Vektor besitzt außerdem ein Bakterien „ori“, das ihm die Fähigkeit zur autonomen Replikation im prokaryotischen System verleiht. Ein zweites „ori“ aus dem filamentösen Phagen f1 ermöglicht die Erzeugung von Einzelstrang- DNA. Des weiteren

kodiert der Vektor für ein Ampicillinresistenzgen, das zur Selektion transformierter Bakterien dient.

- pDsRed-C1-Vektor:

Der 4700 bp große Vektor der Firma Clontech mit einem Enhancer im CMV Promotor (P_{CMV}) enthält ein Gen, das für ein rotfluoreszierendes Protein (DsRed) kodiert. Der Vektor ist ein effizienter Expressionsvektor in Säugetierzellen und wird zur Expression von Fusionsproteinen verwendet. In die Multiple Cloning Site zwischen dem P_{CMV} Promotor und dem DsRed1-kodierenden Abschnitt können spezifische Gene eingebaut werden. Somit entsteht ein Fusionsgen, das aus dem N-terminalen Fremdgen und C-terminalen DsRed1-Gensequenz besteht. Die Fusionsproteine können auf diese Weise *in vivo* in den Zellen lokalisiert werden. Distal vom DsRed1-Gen befindet sich ein SV40 poly A-Signal. Der f1 ori des Vektors ermöglicht die Herstellung von ssDNA. Mit Hilfe des SV40 ori kann der Vektor in eukaryoten Zellen vermehrt werden, die das Antigen SV40 T produzieren. Der SV40 Promotor (P_{SV40}) ist den Kanamycin und Neomycin Resistenzgenen vorgeschaltet, dass die transfizierten Zellen gegen diese beiden Antibiotika resistent werden und die Kultur und Selektion in den Antibiotika enthaltenden Medien ermöglicht werden. Durch den pUC ori kann der Vektor auch in Bakterien repliziert werden.

-pSG5-Vektor:

Eukaryotischer Expressionsvektor (Stratagene) zur transienten Expression von Genen unter der Kontrolle des T7-Promotors des Simian- Virus 40 (SV40). Der 4,1kb große Vektor enthält eine Multiple- Cloning- Site mit Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme zur Integration von Gensequenzen. Das vorhandene Resistenzgen für Ampicillin erlaubt ein selektives Wachstum transformierter Zellen.

2.11.2 Reporterplasmide

- pXP2-myc2.5:

pXP2 ist ein promotorloser Luziferase- Vektor der das Reporter-gen Luciferase enthält mit einer Ampicilin Resistenz (Nordeen,1988). In diesen ist ein 2,5 kb großes Fragment von der *c-myc*- Promotor- Sequenz über *Sma*I und *Bgl*II einkloniert. Diese Sequenz enthält eine intakte PLZF Bindungsstelle. Das Konstrukt wurde von Jonathan D. Licht, Division of Hematology/Oncology, Chicago, USA zur Verfügung gestellt (McConnell et al.2003).

- pXP-myc2.5ΔPLZF:

pXP2 ist ein promoterloser Luziferase- Vektor der das Reporter-gen Luziferase enthält mit einer Ampicilin Resistenz (Nordeen,1988). In diesen ist ein 2,5 kb großes Fragment von der *c-myc*- Promotor- Sequenz über *Sma*I und *Bgl*II einkloniert. Diese Sequenz enthält eine mutierte PLZF-Bindungsstelle. Das Konstrukt wurde von Jonathan D. Licht, Chicago, USA zur Verfügung gestellt (McConnell et al., 2003).

- pBV-Luc:

pBv-Luc (**best vector for luciferase reporter assay**) wurde in einem Gemeinschaftsprojekt von dem Molecular Genetics Laboratory of the Johns Hopkins Oncology Center 1988 kreiert aus einem modifizierten pGL3-Promotor. Die Hauptbestandteile des Vektors sind ein "transcription blocker" und eine multiple cloning site upstream eines minimal Promotors, daher ist die Luziferase Aktivität extrem gering in allen getesteten Zelllinien, auch in 293T Zellen, die von uns benutzt wurden.

2.11.3 Konstrukte

Bei den im Folgenden beschriebenen Konstrukten wurden die verwendeten Fragmente durch die angegebenen Primer in einer PCR amplifiziert, bzw. durch Spaltung der angegebenen Konstrukte gewonnen. Die PCR Fragmente

wurden nach der Amplifikation ebenfalls von den bezeichneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und alle Fragmente mit den entsprechend gespaltenen Vektoren ligiert.

- pGEX-Rec:

pGEX-Rec enthält das gesamte *rec*- Gen. Dieses wurde unter Beachtung des Leserasters in den Vektor pGEX-4T-1 einkloniert und exprimiert das GST- Rec Fusionsprotein. Dieses Konstrukt wurde von Annette Böse im Rahmen ihrer Promotion hergestellt.

- pGEX-Rec-1.Exon:

pGEX-Rec-1.Exon wurde konstruiert durch Isolierung des *EcoRI/ XhoI* Fragmentes aus dem pJG4-5-Rec-1.Exon Konstrukt (Boese et al., 2000). Das isolierte Fragment wurde anschließend in einen *EcoRI* und *XhoI* gespaltenen pGEX-4T-1 Vektor subkloniert.

- pGEX-Rec-47/105:

pGEX-Rec-47/105 wurde konstruiert durch Spaltung der *rec-47/105* Gensequenz mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* aus dem pJG4-5-Rec-47/105 Konstrukt (Boese et al., 2000). Das isolierte Fragment wurde anschließend in einen *EcoRI* und *XhoI* gespaltenen pGEX-4T-1 Vektor subkloniert.

- pGEX-Rec-21/75:

pGEX-Rec-1.Exon wurde konstruiert durch Spaltung der *rec-21/75* Gensequenz mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* aus dem pJG4-5-Rec-21/75 Konstrukt (Boese et al., 2000). Das isolierte Fragment wurde anschließend in einen *EcoRI* und *XhoI* gespaltenen pEX-4T-1 Vektor subkloniert.

- pGEX-Rec-47/89:

pGEX-Rec-47/89 wurde kloniert durch die Amplifikation der *rec* Sequenz aus dem Template pGEX-Rec mit den Primern cORF-B-For und cORF-1.Exon-Xho, die *EcoRI* und *XhoI* Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen. Das

hierbei amplifizierte Fragment wurde in einen *EcoRI* und *XhoI* gespaltenen pGEX-4T-1 Vektor subkloniert.

-pGEX-PES:

pGEX-PES wurde konstruiert durch die Spaltung der *rec-PES* Gensequenz mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* aus dem pJG4-5-Rec-PES Konstrukt. Das isolierte Fragment wurde anschließend in einen *EcoRI* und *XhoI* gespaltenen pGEX-4T-1 Vektor subkloniert.

-pSG5-Rec:

pSG5-Rec enthält das gesamte *rec*-Gen. Dieses Konstrukt wurde von Annette Böse im Rahmen ihrer Promotion hergestellt.

-pSG5-Rec-47/89:

pSG5-Rec-47/89 wurde kloniert durch die Amplifikation der entsprechenden *rec* Sequenz aus dem Template pGEX-Rec mit den Primern Rec-B-Eco-For und Rec-1.Exon-Bam-rev, die *EcoRI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen. Das hierbei amplifizierte Fragment wurde in einen *EcoRI* und *BamHI* gespaltenen pSG5 Vektor subkloniert.

-pHCMVpa-Rec:

pHCMVpa-Rec enthält die gesamte *rec*- Sequenz und wurde konstruiert durch die Isolierung des *BamHI*-Fragments aus dem pSG5-Rec Konstrukt. Das isolierte Fragment wurde anschließend in einem *BamHI* gespaltenen pHCMVpa Vektor subkloniert.

- pGEX-Np9, pGEX-Np9 Δ C, pGEX-Np9 55, pGEX-Np9mutl-55, pGEX-Np9N, dsred-Np9, pSG5-Np9, pSG5-Np955mutl, pEGFP-GST-Np9:

Die Konstrukte wurden von Vivienne Armbrüster im Rahmen ihrer Diplomarbeit und Doktorarbeit kloniert (Armbrüster et al., 2002, 2004).

- pSG5-GST-Np9:

Das Konstrukt pSG5-GST-Np9 wurde kloniert durch die Amplifikation der entsprechenden *gst-np9* Sequenz aus dem Template pEGFP-GST-Np9 mit

den Primern Eco-GST-for und GST-Eco-rev, die eine *EcoRI* Restriktionsschnittstelle zur Verfügung stellen. Das hierbei amplifizierte Fragment wurde in einen *EcoRI* gespaltenen pSG5 Vektor subkloniert.

-pSG5-GST:

Das Konstrukt pSG5-GST wurde hergestellt, indem das GST- Fragment mittels eines *EcoRI* und *BamHI* Verdau aus dem Konstrukt pEGFP-GST-Np9 herausgeschnitten und in den ebenso verdauten pSG5 Vektor ligiert wurde.

-pHCMVpa-Np9:

pHCMVpa-Np9 wurde hergestellt durch Umklonierung der *np9* Sequenz von pROSA26-Np9 (auch im Rahmen dieser Arbeit hergestellt) über *BamHI*-Schnittstellen. Das Konstrukt umfasst das gesamte Np9-Protein. Das Fragment wurde in einen *BamHI* gespaltenen pHCMVpa Vektor subkloniert.

-pSG5-PLZF:

Dieses Konstrukt enthält die vollständige für PLZF kodierende Sequenz. Zur Verfügung gestellt von Jonathan D. Licht, Chicago, USA

-pSG5-PLZF 245/399:

pSG5-PLZF245/399 (pSG5-pro) wurde konstruiert durch die Isolierung des *BamHI*- Fragments aus dem pEG-PLZF245/399 Konstrukt (Boese et al., 2000). Das isolierte Fragment wurde anschließend in einen *BamHI* gespaltenen pSG5 Vektor subkloniert.

-pSG5-PLZF-395:

pSG5-PLZF-395 (pSG5-PLZF-9ZN) wurde hergestellt durch Umklonierung der *plzf* Sequenz von pEG202-PLZF395 über *BamHI*- Schnittstellen (Boese et al., 2000). Das Konstrukt umfasst die 395 Aminosäuren der 9 C- terminalen Zinkfinger. Das Fragment wurde in einen *BamHI* gespaltenen pSG5 Vektor subkloniert

- pSG5-PLZF 245/543:

pSG5-PLZF 245/543 (pSG5-PLZF-5ZN) wurde konstruiert durch die Isolierung des *Bam*HI/ *Xho*I- Fragments aus dem pEG-PLZF245/543 Konstrukt (Boese et al., 2000. Das isolierte Fragment wurde anschließend in einen *Bam*HI und *Xho*I gespaltenen pSG5 Vektor subkloniert.

- pSG5-PLZF 543:

pSG5-PLZF 543 (pSG5-PLZF-4ZN) wurde kloniert durch die Amplifikation der entsprechenden *plzf* Sequenz aus dem Template pSG5-PLZF mit den Primern PLZF-4ZN-Eco-for und PLZF-BgIII-rev, die *Eco*RI und *Bg*II Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen. Das hierbei amplifizierte Fragment wurde in einen *Eco*RI und *Bg*II gespaltenen pSG5 Vektor subkloniert und umfasst die Sequenz der letzten vier C-terminalen Zinkfinger.

-pEGFP-PLZF:

pEGFP-PLZF wurde kloniert durch die Amplifikation der gesamten *plzf* Sequenz aus dem Template pSG5-PLZF mit den Primern PLZF-GFP-BgIII-for und PLZF-GFP-Sal-rev, die *Eco*RI und *Bg*II Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen. Das hierbei amplifizierte Fragment wurde in einen *Eco*RI und *Bg*II gespaltenen pSG5 Vektor subkloniert.

- pSG5-HA-61K:

Der Vektor pSG5 enthält die für 61K kodierende Sequenz, die in diesem Fall als eine N-terminale Fusion mit einer Hämagglutinin (HA)-Domäne exprimiert wird. Dieses Konstrukt wurde von Uwe Galli im Rahmen seiner Promotion hergestellt.

-pSG5-61K-N-Term, pSG5-61K-YutzuTang, pSG5-61K-C-Term:

Diese Konstrukte wurden von Uwe Galli während seiner Promotion hergestellt.

- pSG5-61K-Mitte:

pSG5-61K-Mitte wurde kloniert durch die Amplifikation der entsprechenden 61K Sequenz aus dem Template pSG5-HA-61K mit den Primern PEG-CB-for

und CB-Mitte-rev, die *EcoRI* und *BglII* Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen. Das hierbei amplifizierte Fragment wurde in einen *EcoRI* und *BglII* gespaltenen pSG5 Vektor subkloniert.

- pSG5-61K-N-Term-GFP:

Um den Klon pSG5-61K-N-Term-GFP, der aus dem N-Terminus der 61K-Sequenz und einer N-terminalen Sequenz, die für EGFP codiert, besteht, zu konstruieren, wurde zuerst *gfp* durch die Amplifikation der entsprechenden Sequenz aus dem Template pEGFP-C1 mit den Primern GFP-Eco-for und GFP-Eco-Rev, die eine *EcoRI* Restriktionsschnittstelle zur Verfügung stellen, amplifiziert. Das hierbei amplifizierte Fragment wurde in einen *EcoRI* gespaltenen pSG5 Vektor subkloniert. Der N-Term des 61K-Proteins wurde durch die Amplifikation der entsprechenden 61K Sequenz aus dem Template pSG5-61K-N-Term mit den Primern CB Δ ATG-Xho und CB-N-Term-rev, die *XhoI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen, hergestellt. Das hierbei amplifizierte Fragment wurde in den zuvor hergestellten Vektor pSG5-eGFP, der anschließend mit *XhoI* und *BamHI* gespalten wurde, subkloniert.

- pSG5-61K-YuTAng-GFP:

Um den Klon pSG5-61K-YuTAng-GFP, der aus dem verlängerten N-Terminus der 61K-Sequenz und einer N-terminalen Sequenz, die für EGFP codiert, besteht, zu konstruieren, wurde der Vektor pSG5-eGFP mit *XhoI* und *BamHI* gespalten. Die 107 N-terminalen AS des 61K-Proteins wurden durch die Amplifikation der entsprechenden 61K Sequenz aus dem Template pSG5-61K-YuTAng mit den Primern CB Δ ATG-Xho und YuTAng-rev, die *XhoI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen, hergestellt. Das hierbei amplifizierte Fragment wurde in den zuvor gespaltenen Vektor pSG5-eGFP subkloniert.

2.12 Mikroskope, Computersoftware und Internetseiten

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurde mit einem Leica DM IRB/E Mikroskop (Institut für Virologie, Uniklinikum Homburg) vorgenommen. Die Dokumentation erfolgte mit der Axio-Cam Color Kamera der Firma Zeiss und der angeschlossenen Software Axio Vision 3.0. Die anschließende Bildbearbeitung erfolgte mit Corel- Paint 12 und PowerPoint von Windows XP.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ferner folgende Computersoftware verwendet: Microsoft Windows Office XP und Corel Draw 12.

DNA- und Protein- Sequenzanalysen wurden mit Hilfe folgender Internetadressen durchgeführt:

NCBI Sequences: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NCBI Blast: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

BCM- Search Launcher: <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>

Web-cutter: <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>

SwissProt: http://www.expasy.org/expasy_urls.html

3 METHODEN

3.1 Kultivierung von *E.coli* –Stämmen (Maniatis et al., 1989)

Suspensionskulturen von *E.coli* werden in LB-Medium kultiviert. Zur Selektion und Amplifikation transformierter Bakterien werden dem Medium die Antibiotika Ampicillin (100µg/ml Medium) beziehungsweise Kanamycin (30µg/ml Medium) zugesetzt, abhängig von den Resistenzgenen der verwendeten Vektoren. 100 ml LB-Medium werden mit 50 µl einer transformierten Bakterienkultur angeimpft. Bei der Kultivierung von pMOS-Bakterien wird zuvor eine 0,2 ml Vorkultur ohne Antibiotikum 1 Stunde bei 37°C herangezogen und anschließend den 100 ml Medium zugegeben. Das Wachstum erfolgt anaerob über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler.

Für Plattenkulturen werden LB- Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion mit jeweils 50µl Bakterienkultur angeimpft und die Bakterien mit einem Drigalski-Spatel auf deren Oberfläche verteilt.

3.2 Blue/White Screening

Mit Hilfe des Blue/White Screenings lassen sich die Klone unterscheiden, die mit einem Insert- tragenden Vektor transformiert wurden von denen, die nur den Vektor beinhalten.

Das Prinzip dieser Screening- Methode beruht auf einer enzymatischen Reaktion. Das Substrat X-Gal wird in Anwesenheit des Induktors IPTG (Isopropylthiogalaktosid) durch das Enzym β -Galaktosidase zu einem blauen Produkt umgewandelt. Die Methode kann ausschließlich bei Bakterienstämmen, denen die β -Galaktosidase fehlt, angewandt werden, wie zum Beispiel dem pMOS Stamm. Des weiteren muss der Vektor für die β -Galaktosidase in Form eines *lacZ*- Gens kodieren. Ist ein Insert innerhalb des *lacZ*- Gens eingebaut, kann keine funktionelle β - Galaktosidase mehr gebildet werden und die Bakterienkolonien bleiben ungefärbt. Wird ein Bakterium mit einem Vektor ohne Insert transformiert, findet die enzymatische

Umwandlung statt und der Bakterienklon wächst zu einer blauen Kolonie heran.

Ein Blue/White Screening wird durchgeführt, indem jeweils 35µl X-Gal und 20µl IPTG auf der Agaroberfläche verteilt werden. Anschließend werden die Platten vor dem Auftragen der Bakterien inkubiert bis beide Substanzen vollständig in den Agar eindiffundiert sind.

3.3 DNA-Techniken

3.3.1 Agarosegelelektrophorese von DNA (Maniatis et al., 1989)

Durch eine Agarosegelelektrophorese werden doppelsträngige DNA-Fragmente im elektrischen Feld aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes aufgetrennt. Bei parallelem Einsatz eines DNA-Molekulargewichtsmarkers als Standard, kann die ungefähre Größe der einzelnen Fragmente bestimmt werden. Eine optimale Auftrennung der Fragmente erfolgt durch die Wahl der geeigneten Agarosekonzentration. In dieser Arbeit wurden kleine DNA-Fragmente von 100 bis 500 bp in 3% Agarosegelen und 500 bp bis 5 kb Fragmente in 1% Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarosegele enthalten den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Endkonz. 0,5 µg/ml). Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelstrang-Helix der DNA und ermöglicht so den visuellen Nachweis der DNA bei Bestrahlung des Agarosegels mit UV Licht. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und deren Molekulargewichtsbestimmung werden die DNA-Ansätze mit 20% (v/v) Blaumarker-Stammlösung (50% Glycerin (v/v); 50 mM EDTA; 0,25% Bromphenolblau (v/v)) versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die DNA-Fragmente werden bei einer angelegten Spannung von maximal 110 Volt in einer Kammer mit TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden durch Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) detektiert und photographisch dokumentiert.

3.3.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur präparativen Aufarbeitung der DNA werden gelelektrophoretisch-aufgetrennte Fragmente unter langwelligem UV-Licht (366nm) aus einem Agarosegel ausgeschnitten um die Anzahl an UV-Licht- induzierten Doppelstrangbrüchen zu minimieren. Zur Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen kommen zwei verschiedene Methoden in Frage. Die Reisolierung ausgeschnittener DNA-Fragmente mit einer Größe größer 1 kb erfolgt nach der *Gene-clean*- Methode der Firma Dianova. Bei dieser Aufreinigung bindet die DNA an eine positiv geladenen Silikatmatrix. DNA-Fragmente mit einer Größe unter 1 kb werden mit Hilfe des *Nucleo-Spin*-Kits nach Angaben der Firma Macherey und Nagel reisoliert. Nach den Prinzipien der Ionenaustausch-Chromatographie bindet die DNA bei dieser Methode an positiv geladenen Säulen. Nach mehreren Waschschritten wird die gereinigte DNA durch Zugabe von 1x TE Puffer eluiert.

3.3.3 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki et al., 1988; Graham,1973)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ermöglicht die gezielte *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten bis zu einer maximalen Größe von 12 kb. Die Vervielfältigung doppelsträngiger DNA verläuft exponentiell. Zu Beginn der Reaktion wird die eingesetzte doppelsträngige DNA-Matrize durch kurzzeitiges Erhitzen auf über 90°C in Einzelstränge denaturiert. Im anschließenden Anlagerungsschritt binden spezifische Oligonukleotide an ihre komplementären Sequenzen der „*Template*- DNA“. Die für diesen „*Annealing*-Schritt“ eingesetzte Temperatur ist von der Basenzusammensetzung und Größe der verwendeten Primer abhängig. Es werden jeweils zwei spezifische Primer benötigt, die das zu amplifizierende Fragment eingrenzen und zu je einem der Matrizenstränge komplementär sind. Wenn beide Primer gebunden haben, werden die beiden freien 3`Enden durch die Polymerase komplementär zu dem jeweiligen Matrizenstrang synthetisiert. Diese „*Elongation*“ wird bei einer für die

eingesetzte Polymerase optimalen Arbeitstemperatur durchgeführt. Alle für diese Technik verwendbaren Polymerasen stammen aus thermophilen Organismen und arbeiten bei Temperaturen zwischen 68°C und 73°C. Nach dem Elongationsschritt beginnt ein neuer Zyklus, der ebenfalls wieder aus Denaturierung, Annealing und Elongation besteht. Die exponentielle Vermehrung des spezifischen dsDNA-Amplifikates erfolgt bei durchschnittlich 30 Wiederholungen eines Zyklus. Die PCR wird im Peltier Thermal Cycler PTC 200 der Firma MJ Research durchgeführt. In eine PCR werden für einen 20 µl Ansatz 0,5 µg Template DNA, 0,1 U Taq DNA-Polymerase, 2 µl 10 Taq-Puffer, dNTP's in einer Konzentration von jeweils 0,2 mM und die jeweiligen Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 0,5 µM eingesetzt. Zur präparativen DNA-Amplifikation werden Ansätze mit 100 µl Endvolumen verwendet.

3.3.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(Maniatis et al., 1989)

Restriktionsendonukleasen (RE's) sind Enzyme, die hochspezifisch Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und diese durch Spaltung der Phosphodiesterbindungen spalten. Die Nomenklatur der RE's bezieht sich auf die prokaryotischen Organismen, aus denen sie isoliert wurden. Natürlicherweise schützen sie das Genom dieser Organismen vor Integration fremder DNA, indem sie artfremde Moleküle durch Zerschneiden zerstören. Die Erkennung von artfremder und eigener DNA erfolgt aufgrund unterschiedlicher Methylierungsmuster.

3.3.5 Phosphatasebehandlung von Vektoren

(Bolivar et al., 1977; Chaconas und van de Sande, 1980)

Eine Dephosphorylierung aufgeschnittener Vektorenden wird vorgenommen um die Religation von Vektoren zu verhindern, die dann aufgrund der fehlenden Phosphatgruppe nicht mehr in der Lage sind, sich zu

rezirkularisieren. Erst durch die Insertion eines DNA-Fragments mit 5'-Phosphatenden kann das Zuckerphosphatgerüst von Ligasen wieder geschlossen werden. Die Dephosphorylierung wird mit der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) nach den Angaben der Firma Boehringer vorgenommen. Die Vektoren werden durch eine Gelelektrophorese und anschließender *Gene-clean* Reisolierung aufgereinigt.

3.3.6 Ligation von DNA- Fragmenten

(Sgaramella et al., 1970; Dugaiczky et al., 1975)

Während einer Ligation wird die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente durch das Enzym Ligase katalysiert. In dieser Arbeit wurde hierzu die aus dem T4-Bakteriophagen stammende T4-Ligase (New England Biolabs) verwendet. Für die ATP-abhängige Reaktion werden äquimolare Mengen an dephosphoriliertem Vektor und dem zu inserierenden DNA-Fragment mit 100 U Enzym in 1x T4-Ligase-Puffer (New England Biolabs) eingesetzt und bei 4°C für mehrere Stunden inkubiert. Nach der Ligation werden Bakterien mit dem Ligationsansatz transformiert.

3.3.7 Analytische Isolierung von Plasmid- DNA aus Bakterien

(Minipräparation nach Holmes und Quigley, 1981)

Die Minipräparation mit der „*Boiling-Präp-* Methode“ dient der Isolierung geringer Plasmid- DNA Mengen zur Analyse von Bakterienklonen im Zuge einer Klonierung. Nach Transformation von *E.coli* pMOS-Kulturen mit einem Ligationsansatz werden die Transformanten auf LB-Agarplatten mit passendem Antibiotikum selektioniert. Die weitere Amplifikation der einzelnen Klone erfolgt in je 1.5 ml LB- Medium plus Antibiotikum bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag werden die Bakterien zentrifugiert (5 min, 4000 rpm [Sigma 202MK]), die Pellets in je 200 µl STET-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA; 5% Triton-X 100 (v/v), 250 mM Sucrose) mit frisch zugegebenem Lysozym (Endkonzentration 50 µg/ml) resuspendiert und eine Minute

gekocht. Durch erneute Zentrifugation (15 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) werden die durch das Lysozym zerstörten Zellwände und die an die Zellmembranen anhaftende genomische DNA sowie die denaturierten Proteine pelletiert und anschließend mit einem sterilen Zahnstocher aus der Lösung entfernt. Die isolierte Plasmid- DNA kann anschließend durch die Zugabe von je 200 µl Isopropanol gefällt und durch erneute Zentrifugation (15 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) sedimentiert werden. Abschließend wird das DNA- Pellet getrocknet und in 40 µl TE- Puffer zuzüglich RNaseA (100 µg/ml) aufgenommen und die aufgereinigte klonale Plasmid- DNA durch Spaltung mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten.

3.3.8 Präparative Isolierung von Plasmid- DNA aus Bakterien (Maxipräparation)

Maxipräparationen werden bei Volumen ab 100 ml Suspensionkultur vorgenommen. Sie dienen ausschließlich der präparativen Aufbereitung großer Plasmidmengen aus bereits charakterisierten Klonen. Die Maxipräparationen werden mit dem Plasmid- Isolationskit der Firma Macherey und Nagel nach deren Anweisung durchgeführt. Die Konzentration wird durch eine photometrische Messung bestimmt und die Plasmide bei 4°C aufbewahrt.

3.3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wird mittels photometrischer Messungen bestimmt. Das Prinzip eines Photometers beruht auf der Messung der Lichtabsorption durch eine sich im Strahlengang befindenden Substanz bei einer konstanten Wellenlänge. Nukleinsäuren besitzen bei 260 nm ein Absorptionsmaximum. Nach dem Lambert- Beerschen- Gesetz kann die Extinktion in die DNA- Konzentration umgerechnet werden. Zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung kann die Reinheit einer DNA- Lösung am Photometer bestimmt werden. Hierzu wird der Quotient aus der optischen

Dichte bei 260 nm und der optischen Dichte bei 280 nm berechnet. Der Quotient reiner DNA sollte zwischen 1,65 und 1,85 liegen. Niedrigere Werte zeigen Verunreinigung durch Proteine an.

3.4 Protein- Techniken

3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

3.4.1.1 *Zellaufschluss unter nativen Bedingungen*

Für GST- pulldown und Acetylierungs- Analysen müssen Proteine in ihrer gefalteten Tertiärstruktur vorliegen, um von passenden Antikörpern effektiv erkannt zu werden bzw. um Protein-Protein-Wechselwirkungen eingehen zu können. Um weitgehend native Proteinextrakte aus prokaryotischen Zellen zu gewinnen, werden pelletierte Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in Lysispuffer aufgenommen. Zur Gewinnung nativer Zellextrakte aus Bakterien werden pelletierte Bakterien in Lysispuffer (s.Kap.2.1) aufgenommen. Das Zellpellet wurde bei -70°C über Nacht eingefroren und die anschließende Zellyse erfolgte durch Beschallung mit Ultraschall (Sonikator, output- level 7, 20 s). Alle unlöslichen Faktoren werden abschließend mittels Zentrifugation (60min, 6000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) sedimentiert und die löslichen Proteine im Überstand können für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

3.4.1.2 *Zellaufschluss unter reduzierenden Bedingungen*

Zur Auftrennung von Protein in einer SDS-Page werden Zellpellets in 2x Probenpuffer aufgenommen, 10 sec beschallt und 10 min gekocht. Nach der anschließenden Zentrifugation (30 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) befinden sich die löslichen Proteine im Überstand. Die Proteine werden in 0,1% NaOH im Photometer bei 280 nm gemessen und nach der empirischen Formel $6,4/\text{OD}$ werden 15 μg errechnet und diese auf einem Acrylamid-Gel aufgetrennt, soweit nicht anders vermerkt.

3.4.1.3 *Proteinsynthese durch in vitro Transkription und Translation*

Zur Synthese einzelner Proteine *in vitro*, d.h. außerhalb eines Zellsystems, wurde das gekoppelte Transkriptions/Translationssystem auf der Basis eines Kaninchen- Retikulozyten- oder des Weizenkeim- Lysates von Promega nach den Angaben des Herstellers verwendet. Als *template*- DNA dienten in dieser Arbeit ausschließlich Derivate des pSG5-Plasmides mit einem T7-Promotorelement. Da die Proteine für GST- Pulldown Analysen radioaktiv markiert werden sollten, mussten zur Synthese radioaktive Aminosäuren (³⁵S-Methionin; ³⁵S-Cystein; ICN) eingesetzt werden.

3.4.2 Techniken zum Nachweis von Proteinen

3.4.2.1 *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)*

(Laemmli, 1970; Maniatis et al., 1989)

Mit Hilfe einer SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine aufgrund ihres reaktive Molekulargewichtes aufgetrennt. Das in dem Gel und dem Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) ermöglicht eine Auftrennung unabhängig von der Eigenladung der Proteine. Ein Polyacrylamidgel besteht aus Acrylamid (AA) und dem quervernetzenden N,N' Methylenebisacrylamid (BIS). Die Konzentration dieser beiden Bestandteile bestimmt die Porengröße des Gels und damit deren Auftrennungskapazität. Die Polymerisation wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch Tetramethylethylendiamid (TEMED) katalysiert. Um eine optimale Auftrennung der einzelnen Proteine zu erreichen, wird eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Am Übergang zwischen dem grobmaschigen oberen Sammelgel („Uppergel“) und dem engporigen Trenngel („Bottomgel“), erfolgt eine Konzentration der Proteine. In dieser Arbeit wurden 7,5-15% als auch Gradienten-Polyacrylamidgele verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in SDS-Laufpuffer bei einer angelegten Stromstärke von 25 mA innerhalb von 2-3 h. Die Bestimmung der relativen Proteinmasse erhält man durch den

Vergleich der Laufstrecke der Proteine mit dem Laufverhalten von parallel mitgeführten Markerproteinen mit bekannten Molekulargewichten.

Trenngele: 375 mM Tris-HCl pH8,8; 0,1% SDS; 0,235% TEMED; 0,05% APS; AA und BIS variierten abhängig vom erforderlichen Trennbereich

Sammelgele: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,025% TEMED; 0,03% APS; 4% AA; 0,12% BIS

3.4.2.2 *Westernblot*

(Towbin et al., 1979; Burnette, 1981)

Bei einem Westernblot werden die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine über kovalente Wechselwirkungen an eine Membran gebunden und mit spezifischen Antikörpern immunologisch detektiert. Im Folgenden wird die Methode am Beispiel des „Semi-dry“ Verfahrens erklärt. Vor dem Proteintransfer wird die Polyvinylidendifluoridmembran (Nitrocellulose, Schleicher & Schuell) in Transferpuffer geleg. In einer semi-dry Blotkammer werden die Proteine innerhalb einer Stunde bei 120 mA von einem SDS-Gel auf die Membran transferiert. Anschließend wird die Markerspür von der restlichen Membran abgetrennt, in Amidoschwarzlösung (0,1% Amidoschwarz (w/v) in 25% Isopropanol (v/v) und 10% Eisessig (v/v)) gefärbt und in Entfärbelösung (10% Isopropanol (v/v), 10% Eisessig (v/v)) entfärbt. Zum Sichtbar machen der Proteinbanden und des aufgetragenen Markers muss die restliche Membran vor der weiteren Verwendung zuerst in Ponceau S Solution rot (Sigma) 10 min inkubiert, dann mit Wasser abgespült, und anschließend mit Blockinglösung (10% Magermilchpulver (v/w) in PBS) für 30 min inkubiert werden. Durch dieses Abblocken der freien Membranbereiche mit den Proteinen der Milch, können weniger Antikörper unspezifisch an die polare Membran binden. Im Anschluss wird die Membran mit einer Erstantikörperlösung über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Am folgenden Tag werden die nicht gebundenen Antikörper durch mehrfaches Waschen in PBS-Puffer entfernt. Die Membran wird mit 10 ml einer entsprechenden Zweitantikörperlösung 1h bei 4°C erneut inkubiert und

anschließend wieder mit PBS gewaschen. Der Nachweis der membrangebundenen Zweitantikörper erfolgte mit Hilfe der ECL- Reaktion. Die ECL- Reaktion (*Enhanced Chemiluminescens Reaction*) beruht auf der Detektion von Lichtstrahlen, die bei der enzymatischen Umwandlung des Substrates Luminol, in Anwesenheit von H_2O_2 , durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase freigesetzt werden. Die hierbei emittierte Strahlung wird auf einem Röntgenfilm nachgewiesen. Der ECL-Nachweis wurde mit dem *ECL-Western-Blotting* Kit der Firma Amersham nach deren Angaben vorgenommen. Die Entwicklung der Röntgenfilme und deren Fixierung erfolgte ebenfalls nach Anweisung des Herstellers.

3.4.2.3 *Nachweis von Proteinen im SDS-Gel*

Proteine lassen sich durch den Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue anfärben. Zur Kontrolle der Expressionsinduktion von GST-Fusionsproteinen werden SDS-Gele in einer Stunde bei $55^\circ C$ in Coomassie- Färbelösung gefärbt. Anschließend wird der Gel- Hintergrund mit Hilfe von Entfärberlösung wieder entfärbt. Die gefärbten Gele werden mit Hitze unter Vakuum getrocknet und können so aufbewahrt und dokumentiert werden.

3.4.2.4 *Nachweis radioaktivmarkierter Proteine durch Autoradiographie*

Um ^{35}S -markierte Proteine in SDS-Gelen nachzuweisen, werden diese 30 min fixiert (50% Methanol (v/v), 10% Eisessig (v/v)), 3x in H_2O gewaschen, 1 Stunde in 1M Natriumsalicylatlösung inkubiert und anschließend mit Hitze unter Vakuum getrocknet und zur Belichtung eines Röntgenfilms eingesetzt.

3.4.3 Techniken zum Nachweis der subzellulären Proteinlokalisierung

3.4.3.1 *Detektion autofluoreszierender Proteine durch Fluoreszenz-mikroskopie*

Durch Autofluoreszenz kann nach spezifischer Anregung die Lokalisation eines fluoreszierenden, rekombinanten Fusionsproteins in einer Zelle bestimmt werden. Für diesen Assay müssen adhärente Zellen am Vortag 1:3 auf sterile Deckgläschen ausgesät werden. Die Transfektion der Zellen erfolgt am nächsten Tag mit Derivaten des pEGFP oder pDsRed Vektors bzw. mit den parental Vektoren, unter Verwendung des FuGENE6 Reagenz (s. Kap. 3.5.3.1). 24- 48 Stunden nach Transfektion werden die Zellen vorsichtig 2 x mit je 1 ml PBS-Puffer gespült und zum Fixieren mit 1 ml Paraformaldehyd (4% v/v in PBS) für 15 min bei 37°C überschichtet. Das Paraformaldehyd wird durch Spülen mit PBS-Puffer entfernt und die Zellen werden abschließend in DAPI- Lösung (0,2 µg/ml in Methanol) 1 Minute lang gefärbt, 1x mit Methanol gespült und kopfüber auf einen Objektträger in Elvanol eingebettet. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenz- Mikroskop (s. Kap. 2.12).

3.4.3.2 *Anfärben von zellulärer DNA mit dem DAPI- Reagenz*

Das DAPI- Reagenz (4,6-Diamidino-2-Phenylindol, Sigma) ist ein blau fluoreszierender Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und daher ausnahmslos Zellkerne anfärbt. Durch den Vergleich der in der DAPI-Färbung sichtbaren Kerndimension mit den gefärbten Bereichen des fluoreszierenden Proteins (siehe Kap. 3.3.3.1) kann eine Aussage über eine Kern- oder eine Cytoplasmalokalisation der untersuchten Proteine getroffen werden.

3.4.4 Methoden zur Detektion und Analyse von Proteininteraktionen

3.4.4.1 GST-Pulldown Analysen und Azetylierungsassay

Mit Hilfe der GST-(Glutathion S-Transferase)-pulldown und der Azetylierungs-Analyse können Protein-Protein Interaktionen *in vitro* nachgewiesen werden. Bei dieser Methode wird eines der zu untersuchenden Proteine bakteriell als GST-Fusionsprotein exprimiert. Hierzu müssen *E.coli*-BL21DE3 Bakterien mit von pGEX- abgeleiteten Konstrukten transformiert und in 20 ml Übernachtkulturen in LB-Amp- Medium angezogen werden. Am nächsten Tag werden 110 ml frisches LB-Amp- Medium mit 2 ml der Übernachtkultur angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von zirka 0,4-0,6 kultiviert und anschließend die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (0,1mM) induziert und für weitere 4 Stunden kultiviert. Ein Teil der Bakterien wird in 2x Probenpuffer aufgenommen und die Proteininduktion nach Auftrennung der Extrakte in einem mit Comassielösung gefärbten Gel kontrolliert. Der andere Teil wird in Lysispuffer aufgenommen, über Nacht bei -70 °C lysiert und anschließend 60 min zentrifugiert (12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C). Der Überstand wird aliquotiert und eingefroren. Das native Zelllysate wird jeweils frisch aufgetaut, und je 250 µl des Zelllysates mit je 100 µl Glutathion- Sepharose (1:2 in PBS, Boehringer) versetzt und für 4 Stunden bei 4°C auf einem Überkopf- Rotator inkubiert. Das GST- Fusionsprodukt wird hierbei durch die Bindung des GST- Anteils an die Glutathion-S- Sepharose -Matrix immobilisiert und kann anschließend durch 5-maliges Waschen mit je 500 µl GST- Kopplungspuffer (1 min, 4000 rpm [Sigma 202MK], 4C°) aufgereinigt werden. Nach Zugabe von 15 µl eines *in vitro* transkribierten/translatierten radioaktivmarkierten Proteins (s. Kap. 3.4.1.3) können beide Proteine über Nacht komplexieren. Am nächsten Tag wird die Glutathion- Sepharose erneut 6 mal mit 500 µl GST- Kopplungspuffer gewaschen (1 min, 4000 rpm, [Sigma 202MK]). Nachdem der Puffer voll-ständig entfernt ist, müssen 20 µl 2x Probenpuffer zugeben werden, um die Proteine durch 10-minütiges Kochen von der Sepharose- Matrix zu lösen. Nach kurzer hochtouriger Zentrifugation können die Proteine im Überstand abgenommen, in einer SDS-Page (3.4.2.1)

aufgetrennt und kopräzipitierte *in vitro* synthetisierten Proteine mittels Autoradiographie (3.4.2.4) nachgewiesen werden.

3.4.4.2. Ko-Immunopräzipitation

GST, GST-Np9, PLZF und PLZF-245/543 wurden mit ³⁵S radioaktiv markiert und *in vitro* synthetisiert (s. Kap. 3.4.1.3). 10 µl der entsprechenden radioaktiv markierten Ansätze wurden vermischt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Zuvor wurde der monoklonale anti-GST Antikörper 6G9 (10 µl) mit 80 µl Protein G-Sepharose (Amersham Biosciences), die zuvor 3 mal in PBS gewaschen wurde, und 200 µl RIPA-Puffer versetzt (RIPA: 150mM NaCl; 0,1% NP40; 0,5% DOC; 0,1% SDS, 2 mM Dithiothreitol (DTT), 0,2 mM PMSF, 20 µg/ml Aprotinin) und für 4 Stunden bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit RIPA-Puffer wurden die Protein G-Sepharose Beads mit den radioaktiv markierten Ansätzen über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach einem weiteren dreifachen Waschschrift mit RIPA-Puffer und nachdem der Puffer vollständig entfernt ist, wurden 20 µl 2x Probenpuffer zugegeben, um die Proteine durch 10-minütiges Kochen von der Sepharose- Matrix zu lösen. Nach kurzer hochtouriger Zentrifugation können die Proteine im Überstand abgenommen, in einer SDS-Page (3.3.2.1) aufgetrennt und kopräzipitierte *in vitro* synthetisierten Proteine mittels Autoradiographie (3.4.2.4) nachgewiesen werden.

3.4.4.3 Kolokalisationsassay

Die unter 3.4.3.1 und 3.4.3.2 beschriebenen Methoden zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation von Proteinen kann ebenso zum Nachweis von Protein-Protein- Kolokalisationen *in vivo* verwendet werden. Hierzu können beide zu testende Proteine rekombinant als Fusionsprodukte mit unterschiedlich fluoreszierenden Fluorochromen in der Zelle vorliegen und mittels ihrer Autofluoreszenz detektiert werden. Der Nachweis der Kolokalisation erfolgt nach separater Dokumentation beider Proteine durch digitale Überlagerung der aufgenommenen Bilder. Übereinander liegende

Signale werden durch die entsprechenden Bildbearbeitungssysteme als gelbe Bereiche dargestellt und können als Kollokalisationsorte der untersuchten Proteine gedeutet werden.

3.5 Zellkultur- Techniken

3.5.1 Kultivierung und Lagerung von Säugerzelllinien

Die Inkubation von Zellkulturen erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ Atmosphäre. Adhärente Zellen können durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst werden. Zur Passagierung werden Anteile der Suspension der abgelösten adhären Zellen bzw. von Suspensionszellen in das entsprechende frische Kulturmedium (s. Kap. 2.7) überführt. .

3.5.2 Zellzahlbestimmung durch Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie / FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) können die relative Größe (Vorwärts-Streulicht), Granularität (90°-Streulicht) und Fluoreszenzlichtemission von vereinzelter Zellen aufgrund hydrodynamischer Fokussierung durch Überdruck beim Messkammereintritt und Anregung durch einen Argon-Laser analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Messungen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und der Apoptoserate durchgeführt. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz transfizierter 293T Zellen, werden 100 µl der Kulturen zu 100µl FACS-Fixierlösung (2% Paraformaldehyd, 150 mM NaCl in PBS, pH7,5) resuspendiert und bis zur Messung lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die relative Prozentzahl der EGFP-Fluoreszenzintensitäten oberhalb des festgelegten Nullwertes innerhalb der als lebend abgegrenzten Population dient als relativer Wert der Transfektionseffizienz für die Standardisierung und Auswertung gemessener Luziferase- Werte.

Zur Bestimmung der Apoptoserate werden die Zellen je 1×10^5 Zellen in 20 ml Medium aufgenommen und je nach experimentellen Ansatz unterschiedlich

lange mit verschiedenen Substanzen behandelt. Um die Suspensionszellen zu ernten, werden 2 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und nach Zentrifugation (1300 rpm, [Sigma 202MK], 10min) mit PBS gewaschen, in 200µl 0,9% NaCl –Lösung resuspendiert und in 1,8 ml Methanol zur Fixierung aufgenommen. Die Fixierung erfolgte für mindestens eine Stunde bei –20°C. Nach Fixierung werden die Zellen abzentrifugiert, mit 500µl PBS gewaschen und mit 250µl RNaseA in PBS (25µg/ml) versetzt. Es folgte eine Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend werden zu den Ansätzen jeweils 250µl Propidiumiodid (PI;10µg/ml, Sigma) zugegeben und für 30 min bei -20°C im Dunkeln inkubiert. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in DNA interkaliert und diese so markiert. Durch einen Argonlaser wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt. Das emittierte Licht wird durch ein optisches System gemessen. Anhand eines Verteilungsdiagramms kann die Zahl der apoptotischen Zellen ermittelt werden.

3.5.3 Zellwachstums -Assay

Das Zellwachstum wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem „*Cell Proliferation Kit I*“ (MTT-Assay) der Firma Roche ermittelt. Hierbei nehmen lebende Zellen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark blauen wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um. Für die photometrische Messung werden die Zellen lysiert, um den Farbstoff freizusetzen. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen. 3×10^5 Zellen der Zelllinien U937T:PLZF, U937T:PLZF-CMV und U937T:PLZF-Rec wurden mit der entsprechenden Menge an Tetrazyklin auf 96 Loch Platten an 100 µl Medium ausgesät. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert (37°C, 5%CO₂) und daraufhin mit 10µl „*MTT labeling*“ Reagenz (0,5mg/ml) versetzt. Nach einer weiteren 4 stündigen Inkubation (37°C, 5%CO₂) werden zu den Zellen 100µl Solubilisierungslösung (im Kit enthalten) zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden bei 37°C, 5%CO₂ werden die Zellen im Microelisa ® Auto Reader der Firma Dynatech bei einer Wellenlänge von 500 nm - 600 nm gemessen.

3.5.4 Luziferase-Reportergen- Assay

293T Zellen werden durch Nanofectin I mit den in den einzelnen Experimenten angegebenen Konstrukten transfiziert. Der Luziferase-Reportergen-Vektor und die Effektorplasmide wurden in einem Verhältnis 1:4 kotransfiziert und in allen Ansätzen die gesamte DNA-Menge durch Zugabe von parentalem Leervektor pSG5 konstant gehalten. Zusätzlich werden jeweils 100 ng pEGFP-C1 Leervektor zur späteren Ermittlung der Transfektionseffizienz im Facs kotransfiziert. 42-45 h (37°C, 5% CO₂) nach Transfektion werden 100µl der Zellsuspension zur Bestimmung der Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch untersucht (s. Kap. 3.5.2). Die verbleibenden Zellen werden durch Resuspension in 100µl 1xCCLR-Puffer (Promega) lysiert. Nach kurzer Zentrifugation (1min, [Sigma 202MK], 13000rpm, RT) wird die Luziferase Aktivität der Überstände unter Verwendung des Promega Luciferase assay system™ (Promega) nach Angaben des Herstellers in einem Luminat LB9501-Luminometer (Berthold) bestimmt und durch Bildung des Quotienten aus Luziferase Aktivität und Transfektionseffizienz bezüglich der Schwankungen der Transfektionseffizienz einzelner Ansätze als relative Luziferase Aktivität standardisiert. Die relativen Werte wurden mit Hilfe der Programme SigmaPlot 4.1™ (SPSS9) und Microsoft Excel statistisch ausgewertet, zusammengefasst und graphisch dargestellt. Bei der statistischen Auswertung im t-Test wurden p-Werte kleiner 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

3.6 Transformation von Zellen

3.6.1 Transformation von Bakterienzellen

(Kushner et al., 1978; Lederberg und Cohen, 1974)

Zur Transformation von Zellen werden sogenannte kompetente Bakterien eingesetzt. Kompetente Bakterien besitzen eine erhöhte Fähigkeit Fremd-DNA während einer Transformation aufzunehmen. Zu ihrer Herstellung werden 30 ml SOB-Medium (20 g/l Trypton; 5 g/l Yeast-Extract; 0,6 g/l NaCl; 0,5 g/l KCl; zuzüglich 10 ml einer 2M Mg²⁺-Stammlösung (203,3 g/l MgCl₂ x 6

H₂O; 246,5 g/l MgSO₄ x 7 H₂O) frisch zugegeben), mit dem jeweiligen Bakterienstamm inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen werden 8 ml entnommen und in 200 ml frisches SOB-Medium überführt. Die weitere Kultivierung erfolgt bis zu einer optischen Dichte von zirka 0.3 bei einer Wellenlänge von 550 nm. Danach kann die Kultur auf 4 Aliquotes à 50 ml aufgeteilt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 4000 rpm [Heraeus, Megafuge1.0] abzentrifugiert werden. Die pelletierten Bakterien werden in je 16 ml Transformationspuffer 1 (0,1 M RbCl; 0,05 M MnCl₂ x 4 H₂O; 0,03 M CH₃COOK pH 7,5; 0,01 M CaCl₂ x 2 H₂O; 15% Glycerol (v/v)) resuspendiert, erneut 15 min auf Eis gestellt und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Abschließend werden die Bakterienpellets in je 4 ml Transformationspuffer 2 (0,5 M MOPS pH 6,8; 0,01 M RbCl; 0,075 M CaCl₂ x 2 H₂O; 15% Glycerol (v/v)) aufgenommen, à 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Stämme erfolgt bei -70°C. Zur Transformation werden 50 µl eines solchen Stammes auf Eis aufgetaut und mit 1-10 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit lagert sich die negativ geladene DNA spontan an die Bakterienwände an. Durch einen Hitzeschock bei 42°C von 70 s wird die Zellmembran der Bakterien kurzzeitig permeabel und die DNA gelangte ins Innere der Zellen. Vor der Kultivierung in LB-Medium zuzüglich des entsprechenden Selektionsmarkers werden die Zellen wenige Minuten zur Regeneration auf Eis gestellt.

3.6.2 Transfektion von Säugerzellen

3.6.2.1 *Transfektion mit FuGENE-6*

Die Transfektion von adhärenenten eukaryotischen Zellen (Cos-1) wird mit Hilfe des FuGENE-6 Reagenz der Firma Roche nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die optimalen Transfektionsbedingungen (Verhältnis DNA/FuGENE Reagenz) müssen für jede Zelllinie im Vorfeld ausgetestet werden. Bei optimalen Bedingungen werden Transfektionsraten von zirka 80% transfizierter Zellen erreicht

3.6.2.2 *Transfektion mit Nanofectinl*

Das Transfektionsreagenz Nanofectinl (PAA) wurde eingesetzt zur Untersuchung von transfizierten 293T Zellen im Luziferase Assay. Dazu wurden 3×10^5 293T Zellen 16 Stunden vor Transfektion in 24-Loch Schalen ausgesät. Anschließend wurden Reporter und Effector Plasmid in einem 1:4 Verhältnis und 100 ng EGFP, zur Bestimmung der Transfektionseffizienz im FACS, mit 50ml 150mM NaCl versetzt und zu 3,2µl Nanofectinl in 50µl 150mM NaCl gegeben. Das Gemisch wurde bei RT für 15-20 Minuten inkubiert und dann zu den Zellen gegeben.

3.6.2.3 *Herstellung stabiler Zelllinien durch Elektroporation*

Bei dieser Methode kommt es durch das kurzfristige Anlegen einer hohen Spannung zu einer Polarisierung der Membrankomponenten, die beim Überschreiten eines Schwellenwertes das lokal begrenzte Aufbrechen der Zellmembran zur Folge hat. Die so entstehenden „Poren“ ermöglichen den Gentransfer. Diese Permeabilität ist reversibel, so dass die Zelle nach dem elektrischen Impuls wieder intakt vorliegt, sofern sie nicht zu stark geschädigt wird. Suspensionszellen können oft nur durch diese Methode transfiziert werden. Pro Transformationsansatz werden 2×10^7 in PBS gewaschene U937T:PLZF Zellen in 250µl RPMI Medium resuspendiert, mit 20 µg Plasmid DNA (paCMV, paCMV-Rec; pa-CMV-Np9) und 3 µg pCDNA3.1/Hygro gemischt und in Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektrotransfektion wird mit dem „Gene-Pulser-II“-Gerät (Biorad) (Spannung 250V, Kapazität 960µF, Widerstand 100Ohm, Elektrodenabstand 4mm) durchgeführt. Die Zellen werden zur Erholung in den folgenden 24 Stunden in Medium mit 20% FKS kultiviert, anschließend wird zur Selektion auf plasmidtragende Zellen das Medium dauerhaft mit 0,3 mg/ml Hygromycin versetzt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Interaktion von HERV-K-Rec und dem Promyelozytischen leukämischen Zink Finger Protein

Sauter et al. konnten 1996 zeigen, dass die Expression von HERV-K Transkripten mit dem Auftreten von Keimzelltumoren (GCT), insbesondere von Seminomen und Teratokarzinomen, assoziiert ist (Sauter et al., 1996). Um weiteren Einblick in die Beteiligung der HERV-K-Proteine in die Tumorigenese zu erhalten, wurden mit Hilfe des Hefe II Hybrid Systems zelluläre Bindungspartner von Rec gesucht. Mit Rec als „Fänger“ wurde eine humane Testis cDNA-Bank durchmustert und das *Promyelocytic Leukemia Zinc Finger* (PLZF) Protein (Abb. 1.3) als Bindungspartner identifiziert. Diese Interaktion wurde durch GST- Pulldown Experimente, Koimmunpräzipitationen und Immunfluoreszenzen bestätigt (Boese et al., 2000). Das PLZF Protein stellt einen interessanten Interaktionspartner von Rec dar, da PLZF „knock out“ Mäuse neben Defekten in der Extremitätenbildung, eine gestörte Geschlechtsreife aufweisen (Barna et al., 2000; Costaya et al., 2004). In der Zwischenzeit weiß man nicht nur, dass die *plzf*- Expression mit Keimzelltumoren assoziiert ist, sondern auch, dass PLZF für die Selbsterneuerung von Keimzell-Stammzellen notwendig ist (Buaas et al., 2004, Costoya et al., 2004). Weiterhin ist PLZF ein negativer Regulator der Zellzyklusprogression und reguliert unter anderem den CyclinA2 Promotor herab, der an der Testisentwicklung in Mäusen beteiligt ist (Sweeney et al., 1996; Ravnik und Wolgemuth, 1996; Ravnik und Wolgemuth, 1999).

Galli et al. konnten 2005 zeigen, dass Rec transgene Mäuse in der Lage sind Neoplasien auszubilden. Daher ist es von Bedeutung, dass das Partnerprotein von Rec mit dem *c-myc*-Promotor interagiert und die Expression des Onkogens *c-myc* direkt über Bindung an den *c-myc*- Promotor reguliert und reprimiert (McConnell et al., 2003). C-myc ist in fast allen menschlichen Tumoren aktiv, daher vermutet man, dass es eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Entwicklung von Tumoren hat. Aufgrund dessen sollte die Bindungsdomäne zwischen Rec und PLZF genauer charakterisiert werden

und einen möglichen funktionellen Einfluss von Rec auf den von PLZF regulierten *c-myc* Promotor untersucht werden.

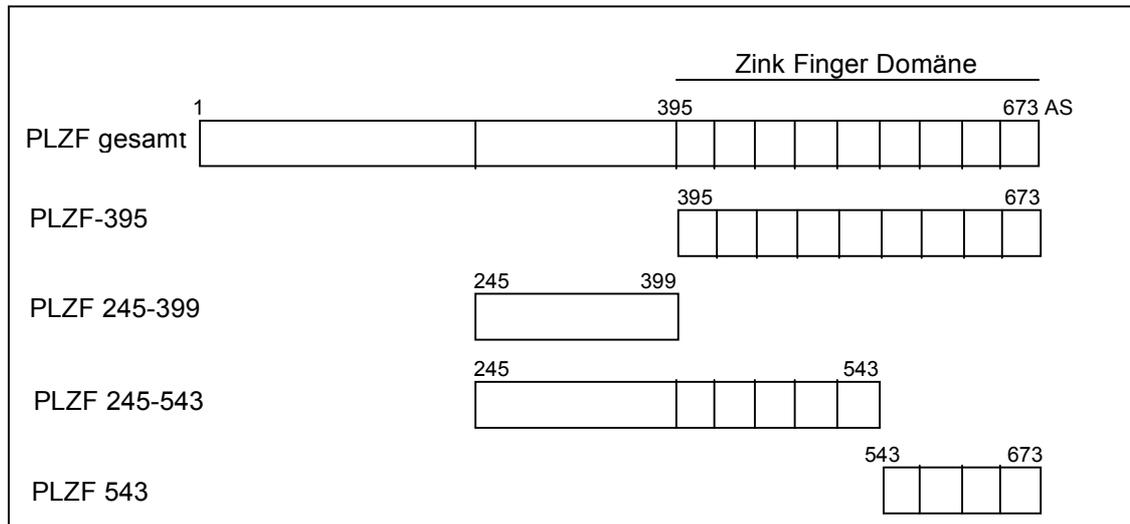


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des PLZF-Proteins, der Lage der Zink Finger Domäne, sowie der eingesetzten Deletionsmutanten des PLZF Proteins.

4.1.1 Studien zu Bindungsstellen von Rec und PLZF in Gluthation-S-Transferase (GST)-Pull-down Experimenten

Von Boese et al. (2000) konnte die Bindung des kompletten PLZF und des gesamten Rec Proteins gezeigt werden. Im Hefe II Hybrid System konnte die Bindungsdomäne von Rec zu einem mittleren Teil von PLZF eingegrenzt werden (Boese et al., 2000). Um nun die Bindungsdomänen der beiden Proteine zueinander weiter einzugrenzen und zu bestätigen, wurden GST-Pull-down Analysen mit den Volllängenproteinen von PLZF und Rec als auch mit Deletionsmutanten von PLZF (Abb. 4.1) und Rec (Abb. 4.3) durchgeführt. Bei der Eingrenzung der Bindungsdomäne von Rec zu PLZF wurden die PLZF- Mutanten in einem gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem mit Hilfe des Vektors pSG5, der durch einen T7-Promotor diesen Prozess in Gang bringt, synthetisiert und gleichzeitig unter Verwendung von ^{35}S die Methionine und Cysteine radioaktiv markiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mit Matrix gebundenen GST-, als Negativkontrolle, und GST- Rec Lysaten inkubiert. Um die Bindungsdomäne

von PLZF zu Rec einzugrenzen, wurden verschiedene GST- Rec- Deletionsmutanten (Abb. 4.3) und das radioaktiv markierte Volllänge PLZF eingesetzt. Die matrixgekoppelten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt, das anschließend mittels Autoradiographie untersucht wurde. Die Abbildung 4.2 zeigt auf der linken Seite die eingesetzten, radioaktiv markierten PLZF- Klone mit ihrer Größe und auf der rechten Seite die Autoradiographie. In der linken Spur sind die Inputkontrollen. Diese entsprechen 10% der in einem Ansatz eingesetzten Menge an radioaktiv markierten PLZF- Protein. In der Mitte sind die Negativkontrollen und rechts das matrixgebundene Protein GST- Rec. Wie bereits beschrieben, ist Rec in der Lage an das Volllänge PLZF zu binden. Weiterhin kann man eine Bindung an das Fragment PLZF 395, das alle neun Zink Finger enthält, an PLZF 245-543, das einen Teil pro-Region und die ersten fünf Zink Finger umfasst, detektieren. Zusätzlich ist eine schwache Bindung an PLZF 543, das nur noch die letzten 4 Zink Finger beinhaltet, zu detektieren. Da sich diese Banden ausschließlich in den Spuren befinden, die das Rec als GST- Fusionsprotein enthalten, nicht aber in denen, welche nur GST enthalten, handelt es sich bei den Proteinbanden um kopräzipitiertes Rec (Abb. 4.2).

Die Bindungsstudie des PLZF Proteins zu dem 105 AS großen Rec zeigte, dass das Volllänge PLZF Protein in der Lage ist, alle verschiedenen großen GST- Rec- Fragmente zu präzipitieren, außer den Teil, der die AS 47 bis 89 umfasst, d.h. dass es 2 verschiedene Bindungsdomänen gibt: eine C-terminale und eine mittlere Domäne, die die Aminosäuren 21-47 umfasst (Abb. 4.3.).

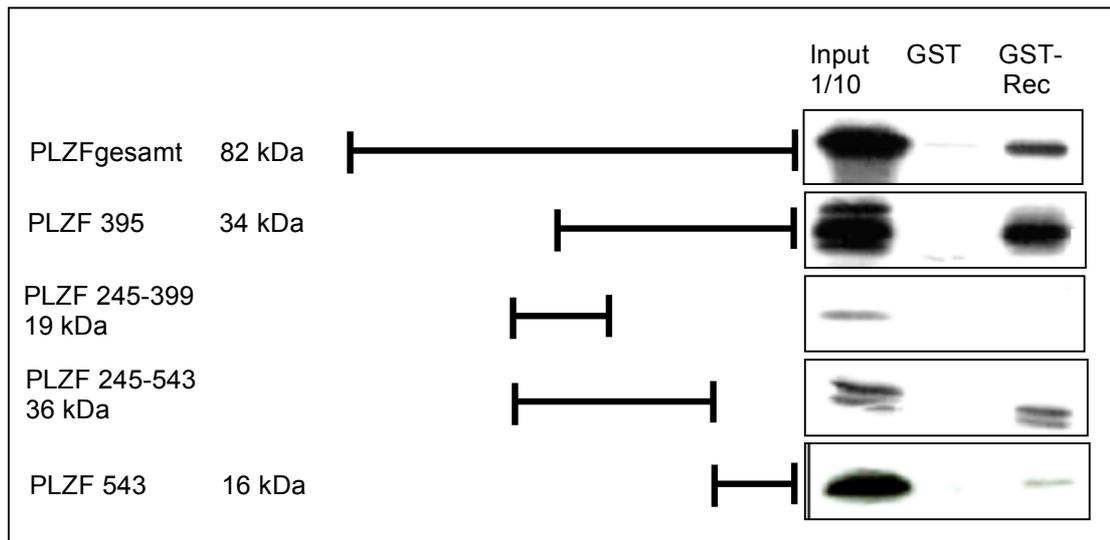


Abb. 4.2: Nachweis der Bindung zwischen Rec und des PLZF Proteins und der Deletionsmutanten PLZF 395, PLZF 245-543 und PLZF 543. Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer GST-Pulldown Analyse mit dem bakteriell von dem Konstrukt pGEX-Rec exprimierten GST-Rec-Derivat und dem *in vitro* translatierten S^{35} radioaktiv markierten Vollängen- PLZF und den PLZF-Deletionsmutanten, von denen je 1/10 in der Inputkontrolle aufgetragen wurden. GST alleine dient als Negativkontrolle. Auf der linken Seite ist eine schematische Darstellung mit Bezeichnung und Größe der eingesetzten Klone zu sehen.

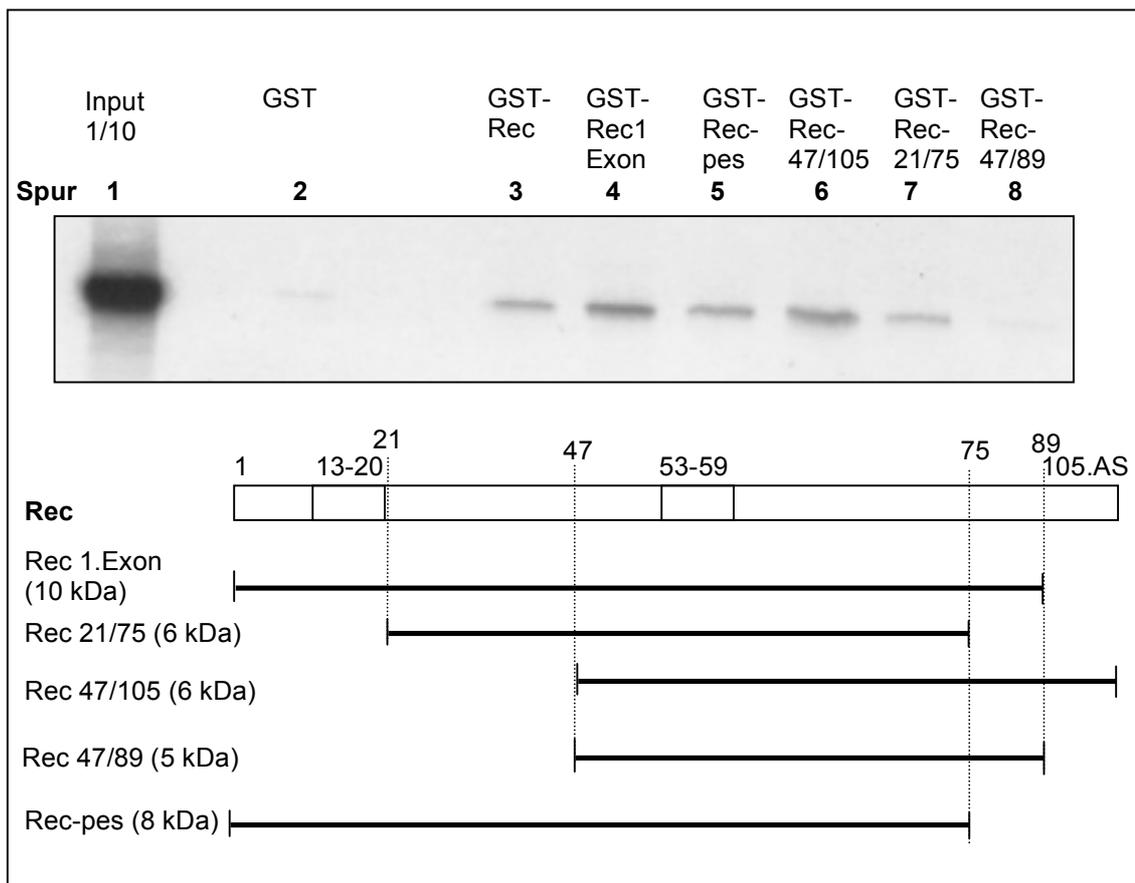


Abb. 4.3: Nachweis der Bindung zwischen PLZF und Rec und den Deletionsmutanten Rec 1-Exon, Rec-pes, Rec-47/105 und Rec-21/75. Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer GST-Pulldown Analyse mit dem bakteriell von dem Konstrukt pGEX-Rec exprimierten GST-Rec-Derivat und den GST-Rec-Deletionsmutanten (Spur 3-8) und dem *in vitro* translatierten S^{35} radioaktiv markierten Volllängen- PLZF, von dem 1/10 in der Inputkontrolle (Spur 1) aufgetragen wurden. GST alleine dient als Negativkontrolle (Spur 2). Im unteren Teil der Abbildung sind die Klone schematisch dargestellt mit Bezeichnung und Größe.

4.2 Interaktion von HERV-K-Np9 und dem PLZF Protein

Da unter anderem Boese et al. (2000) Rec ein tumorigenes Potential zuschreiben konnte und Rec mit der Entstehung von Keimzelltumoren in Zusammenhang gebracht wurde, untersuchte man verschiedene Tumorgewebe (Mammakarzinome, Keimzelltumore) und transformierte Zelllinien auf weitere HERV-K Transkripte. Ein weiteres Transkript, das eine auffällig signifikante Präsenz in allen untersuchten Seminombiopsien zeigt,

wurde mittels RT-PCR gefunden (Armbruster et al., 2002). Das neue *np9* Gen wurde durch Sequenzierung analysiert und die Expression von Np9 wurde in Western Blots und Immunfluoreszenzen nachgewiesen (Armbruster et al., 2002). Das erste Exon von Np9 teilt sich die ersten 44 Basen mit *env* und *rec*, d.h. die ersten 15 AS der HERV-K Transkripte *Rec* und Np9 sind identisch. Da noch nicht die exakte Bindungsstelle von *Rec* für PLZF bekannt war, wurde postuliert, dass genau diese 15 AS auch für die Bindung von Np9 zu PLZF notwendig sind. Mit diesem Hintergrund sollte die mögliche Interaktion zwischen Np9 und PLZF in Kolokalisationsanalysen untersucht und mit GST-Pulldown Experimenten verifiziert werden.

4.2.1 Np9 und PLZF kolokalisieren in transient transfizierten Cos-1 und Tera-1 Zellen

Das PLZF Protein lokalisiert innerhalb des Zellkerns in distinkten Strukturen (Reid et al., 1995). Armbruster et al. konnte zeigen, dass Np9 in den Nukleoli im Kern lokalisiert (Armbruster et al., 2002), d.h. das Protein zeigt ein ähnliches Lokalisationsmuster wie *Rec*, welches mit PLZF kolokalisiert (Boese et al., 2000). Um die *in vivo* Assoziation zwischen Np9 und PLZF zu untersuchen, wurden Cos-1 Zellen mit pEGFP- PLZF und pDsRed-Np9 kotransfiziert. Um die Kolokalisation zu überprüfen, wurden mit den Filtern für grüne und rote Fluoreszenz gleiche Bildausschnitte aufgenommen und diese dann mit Hilfe des Computerprogramms Microsoft Corel Photo Shop digital überlagert. Orte, an denen rote als auch grüne Fluoreszenz vorhanden ist, erscheinen gelb. Die Abbildung 2.4 zeigt, dass die beiden Proteine in Säugerzellen *in vivo* in den gleichen Kompartimenten zu finden sind. Um ein Artefakt aufgrund der verwendeten Zelllinie ausschließen zu können, wurde die gleiche Kotransfektion in Tera-1 Zellen durchgeführt und auch hier konnte eine klare Kolokalisation von PLZF und Np9 gezeigt werden.

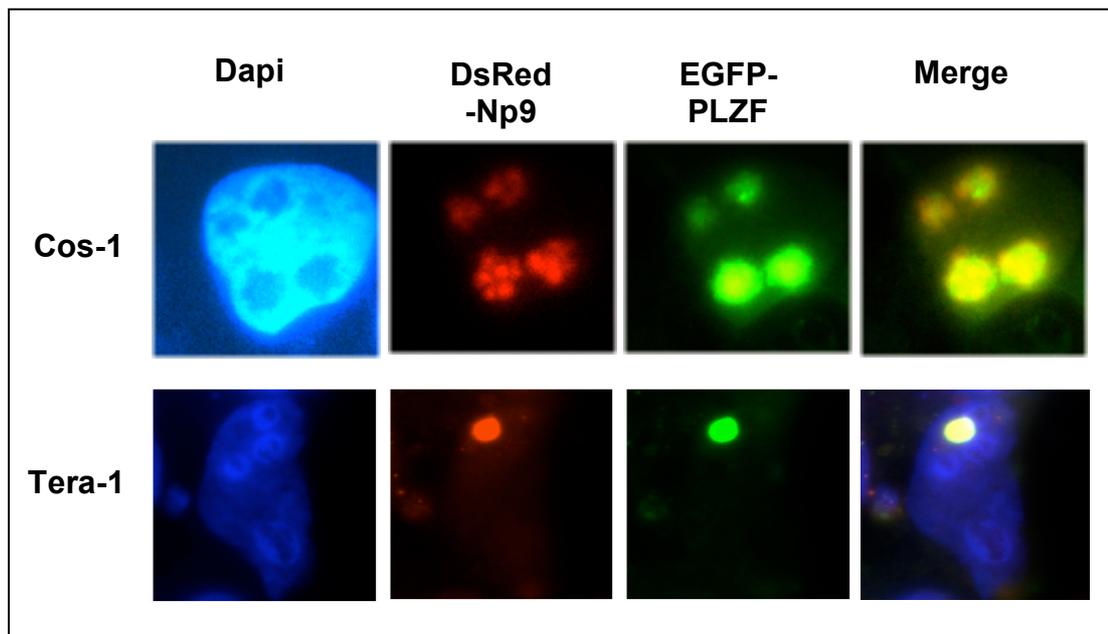


Abb. 4.4: Kolokalisation von EGFP-PLZF und Ds-Red-Np9 im Zellkern

Die oberen Bilder zeigen Cos-1 Zellen, die mit pEGFP-PLZF und pDs-Red-Np9 kotransfiziert wurden. Die unteren Bilder die entsprechende Transfektion in Tera-1 Zellen. Die Fixierung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Zum Nachweis der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Die DAPI gefärbten Zellkerne erscheinen blau und in den rechten Bildern ist die Überlagerung der Proteine gezeigt (Merge). Die Aufnahmen wurden mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop und dem angeschlossenen Bildbearbeitungsprogramm erstellt.

4.2.2 Bestätigung der Np9/PLZF Interaktion und Eingrenzung der Bindungsstellen von Np9 und PLZF in GST-Pulldown Experimenten

Um die Interaktion von Np9 und PLZF zu bestätigen und um die Bindungsdomänen beider Proteine zu charakterisieren, wurden GST-Pulldown Analysen mit dem Vollängen Np9 und PLZF als auch mit PLZF- und Np9-Deletionsmutanten durchgeführt. In der ersten Studie sollte die Interaktion der kompletten Proteine und daraufhin die Bindungsdomäne auf PLZF nachgewiesen werden. Das Vollängen- PLZF wurde *in vitro* transkribiert und translatiert, dabei wurden die Methionine und Cysteine mit ^{35}S radioaktiv

markiert. Das bakteriell exprimierte Np9 wurde mit dem radioaktiv markierten PLZF- inkubiert. Komplexierte PLZF- Proteine konnten nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Belichtung eines Röntgenfilms detektiert werden. Da, wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, die beiden Vollängen-Proteine spezifisch binden, sollte die Bindungsdomäne auf PLZF untersucht werden. Dazu wurden die Deletionsmutanten PLZF-395, PLZF 245-543 und PLZF 543 radioaktiv markiert und ebenso mit dem bakteriell exprimierten Np9 inkubiert. Die Autoradiographie dieser Analyse zeigt, dass Np9 in der Lage ist die Klone PLZF-395 und PLZF 543 zu binden (Abb. 4.5). Somit konnte die Bindungsdomäne genau auf die letzten 4 Zinkfinger motive von PLZF eingegrenzt werden.

Um die Bindungsdomäne des PLZF auf dem Np9- Proteins nachzuweisen, wurden die Deletionsmutanten Np9 Δ C, Np9-55, Np9-mut155 und Np9N bakteriell im pGEX-Vektor exprimiert und mit dem radioaktiv markierten kompletten PLZF inkubiert. Die Abbildung 4.6 zeigt einen Röntgenfilm sowie eine schematische Darstellung der eingesetzten GST-Np9-Deletionsmutanten. Alle Fusionsproteine bis auf Np9-mut155 konnten PLZF spezifisch binden. Dies zeigt, dass die Interaktion zwischen Np9 und PLZF von der ersten NLS abhängig ist und nicht wie anfangs postuliert von den ersten, mit Rec identischen, 15 AS.

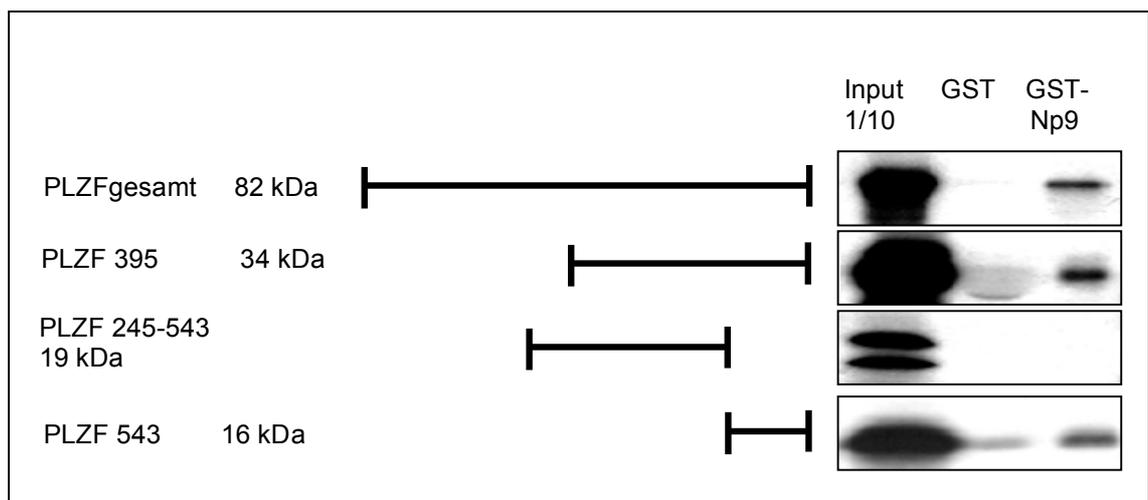


Abb. 4.5: Nachweis der Bindung zwischen Np9 und des PLZF Proteins und der Deletionsmutanten PLZF 395, PLZF245-543 und PLZF543. Abbildung 4.5 zeigt das Ergebnis einer GST-Pulldown Analyse mit dem bakteriell von dem Konstrukt pGEX-Np9 exprimierten GST-Np9-Derivat und dem *in vitro*

translatierten S^{35} radioaktiv markierten Volllängen- PLZF und den PLZF-Deletionsmutanten, von denen je 1/10 in der Inputkontrolle aufgetragen wurden. GST alleine dient als Negativkontrolle. Auf der linken Seite ist eine schematische Darstellung mit Bezeichnung und Größe der eingesetzten Klone zu sehen.

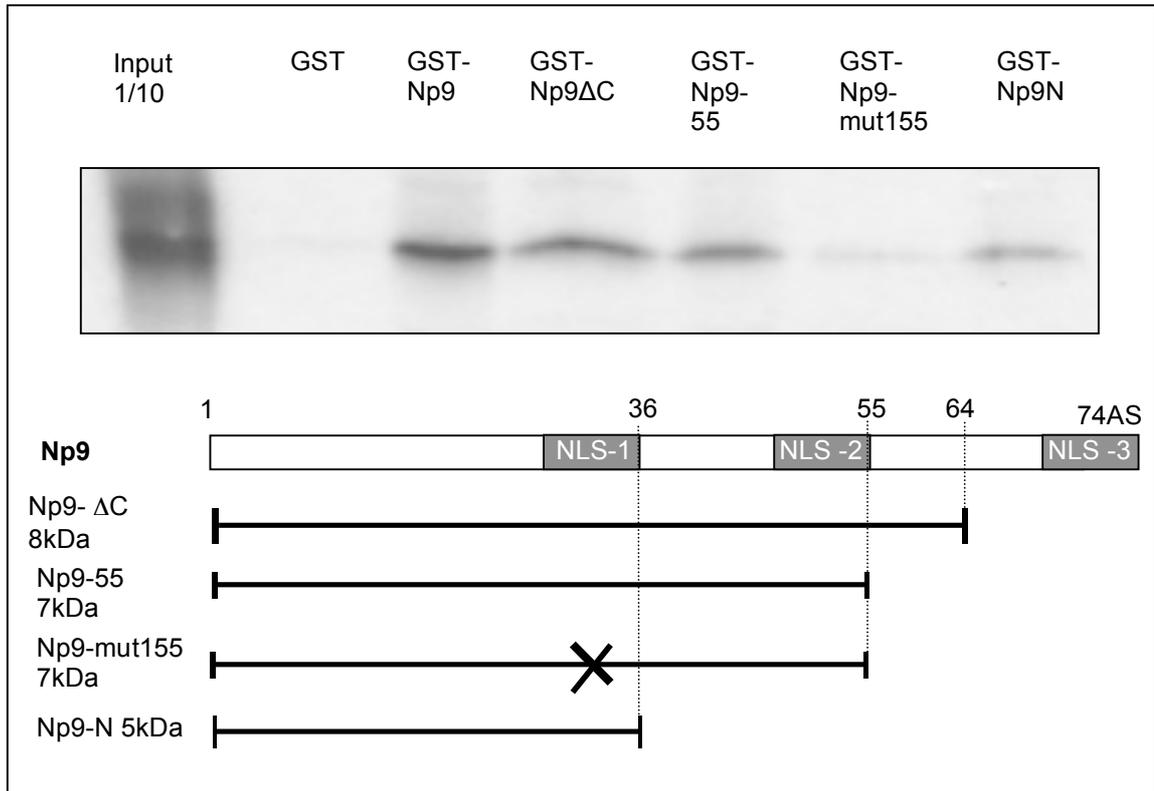


Abb. 4.6: Nachweis der Bindung zwischen PLZF und Np9 und den Deletionsmutanten Np9ΔC, Np9-55, Np9-mut155 und Np9N. Abbildung 4.6 zeigt das Ergebnis einer GST-Pulldown Analyse mit dem bakteriell von dem Konstrukt pGEX-Np9 exprimierten GST-Np9-Derivat und den GST-Np9-Deletionsmutanten und dem *in vitro* translatierten S^{35} radioaktiv markierten Volllängen- PLZF, von dem 1/10 in der Inputkontrolle aufgetragen wurden. GST alleine dient als Negativkontrolle. Im unteren Teil der Abbildung sind die Klone schematisch dargestellt mit Bezeichnung und Größe.

4.2.3 PLZF wird mit Np9 koimmunpräzipitiert

Um die Interaktion zwischen PLZF und Np9 in einem weiteren Testsystem zu überprüfen, wurden Präzipitationsexperimente durchgeführt. Präzipitationsexperimente sind geeignet um eine Interaktion *in vivo* nachzuweisen. Dabei werden beide Proteine in der Zelle exprimiert, eines der beiden an einen spezifischen Antikörper gebunden, so dass ein Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Das zweite *in vivo* exprimierte Protein bildet im Falle einer Bindung ein Antigen-Antikörper-Protein-Protein-Komplex und wird kopräzipitiert. Aufgrund der geringen zellulären Halbwertszeit von Np9 ist es nicht möglich das Protein *in vivo* zu exprimieren (Armbrüster et al., 2002). Daher wurden die Proteine GST-Np9, GST, PLZF und die Deletionsmutante PLZF245/543 in dem bei den GST-Pulldown –Analysen angewandten *in vitro* Transkriptions und Translationssystem radioaktiv markiert. Die Proteine GST und PLZF245/543 stellen die negativen Bindungskontrollen dar. GST alleine sollte nicht in der Lage sein PLZF zu präzipitieren und auch die PLZF Deletionsmutante, die nicht mehr an Np9 binden kann, sollte nicht präzipitiert werden. Um die Interaktion der beiden Proteine nicht durch die Antikörper Bindung zu stören, wurde das Fragment GST-Np9 in den pSG5-Vektor kloniert, so dass man den Antikörper 6G9 gegen GST einsetzen konnte. Die *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten Proteine wurden wie in Abbildung 4.7 zu sehen ist, gemischt, auf Eis inkubiert und anschließend zu dem polyklonalen GST- spezifischen Antikörper, der zuvor an Protein G Sepharose gekoppelt wurde, gegeben. Die Spuren 1,2,3, und 4 der Abbildung 2.7 zeigen die Inputkontrollen und die Größe der einzelnen radioaktiv markierten Proteine. In Spur 5 sieht man im Gegensatz zu den Negativkontrollen in den Spuren 6, 7, und 8, Np9 kopräzipitiertes PLZF- Protein. Die Spezifität der Np9-PLZF Interaktion konnte also ein weiteres Mal bestätigt werden.

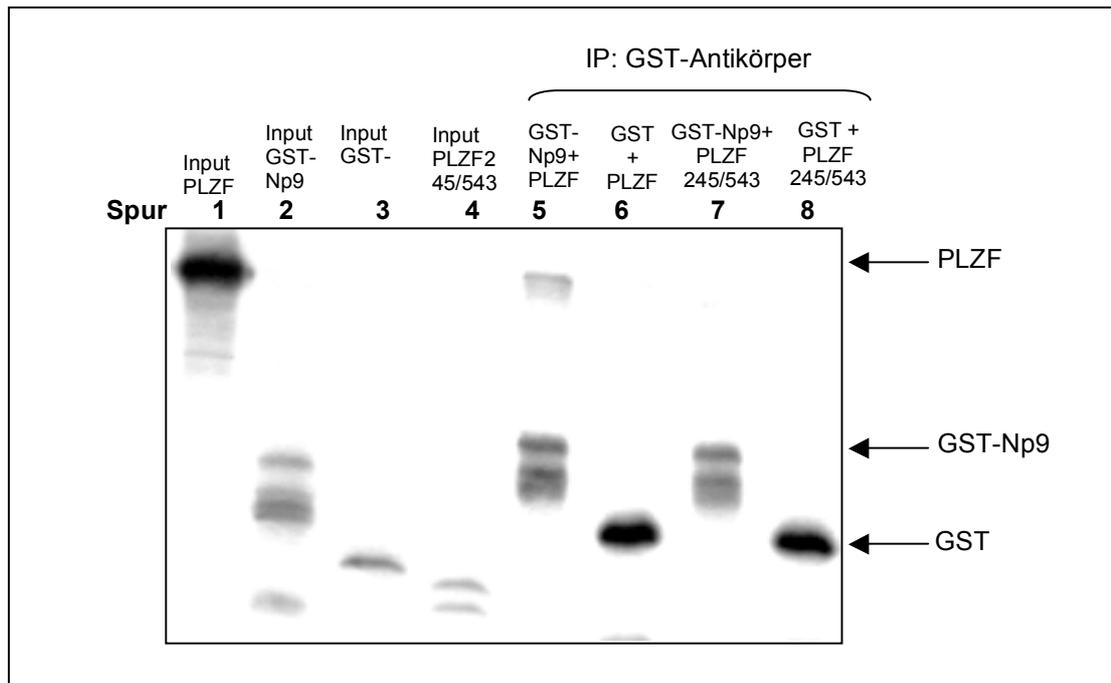


Abb. 4.7: Ko-Immünpräzipitation von PLZF durch matrixassoziiertes GST-Np9 Protein. *In vitro* translatiertes und mit ^{35}S -Methionin und Cystein radioaktiv markiertes PLZF Protein und PLZF245/543 Protein wurde mit ebenfalls radioaktiv markierten GST- bzw. GST-Np9 Protein inkubiert. In den Spuren 1-4 sind die Input-Kontrollen der radioaktiv markierten Proteine zu sehen. Unter Verwendung des polyklonalen GST- spezifischen Antikörpers 6G9 wurde eine Immunpräzipitation des *in vitro* translatierten Proteins GST-Np9 (Spur 5, 7) als auch des GST (Spur 6,8) als Negativkontrolle durchgeführt. Die nach den Waschschrinen mit der Protein G- Sepharose assoziierten Proteine wurden in einem 10% SDS Gel aufgetrennt. Dieses wurde anschließend zur Autoradiographie eingesetzt.

4.2.4 Np9/Rec- PLZF Bindung ist nicht von der PLZF Azetylierung abhängig

Von PLZF ist bekannt, dass es in der Lage ist, DNA zu binden und die Transkription zu reprimieren (McConnell et al., 2003). Die für beide Funktionen notwendigen Domänen sind die Zinkfinger am C-Term von PLZF. Guidez et al. konnte zeigen, dass zwei Azetylierungsstellen im Zinkfinger 6 und drei weitere Lysincluster im Zinkfinger 9 von PLZF liegen und PLZF auch *in vivo* in azetylierter Form vorliegt (Guidez et al., 2005). Darüber hinaus konnte er

zeigen, dass die Azetylierung gegen die transkriptionelle Repressoraktivität von PLZF wirkt, indem es die Bindung von Korepressorproteinen inhibiert. Da für Rec als auch Np9, wie im GST-Pulldown gezeigt wurde, die PLZF-Bindungsstelle in der Zinkfingerdomäne liegt, vermutete man, dass auch diese Bindungen von der Azetylierung beeinflusst werden könnten. Um dies zu untersuchen, wurde der Vollängen Klon von PLZF in zwei unterschiedlichen *in vitro* Transkriptions-Systemen transkribiert, translatiert und mit ^{35}S markiert. Einmal das auch in den GST-Pulldown- Assays genutzte System mit Kaninchenretikulozytenlysat und einmal das System mit Weizenkeimlysat. Das Kaninchenretikulozytenlysat hat im Gegensatz zu dem Weizenkeimlysat die Fähigkeit Lysinreste zu azetylieren. Somit liegt nach dem *in vitro* Transkriptionsvorgang ein radioaktiv markiertes PLZF in azetylierter Form und ein radioaktiv markiertes PLZF in nicht azetylierter Form vor. Die bakteriell exprimierten Proteine Np9 und Rec wurde mit den PLZF Proteinen inkubiert und komplexierte PLZF- Proteine konnten nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Belichtung des Röntgenfilms detektiert werden. Wie in Abbildung 4.7 an den Input-Kontrollen in den Spuren 1 und 5 zu sehen ist, ist die unazetylierte Form um ca. 10 kDa kleiner als die azetylierte Form. Weiterhin ist erkennbar, dass Rec als auch Np9 in der Lage sind an beide Formen von PLZF spezifisch zu binden, was zeigt, dass die Bindung beider HERV-K Proteine nicht von der Azetylierung abhängig sind.

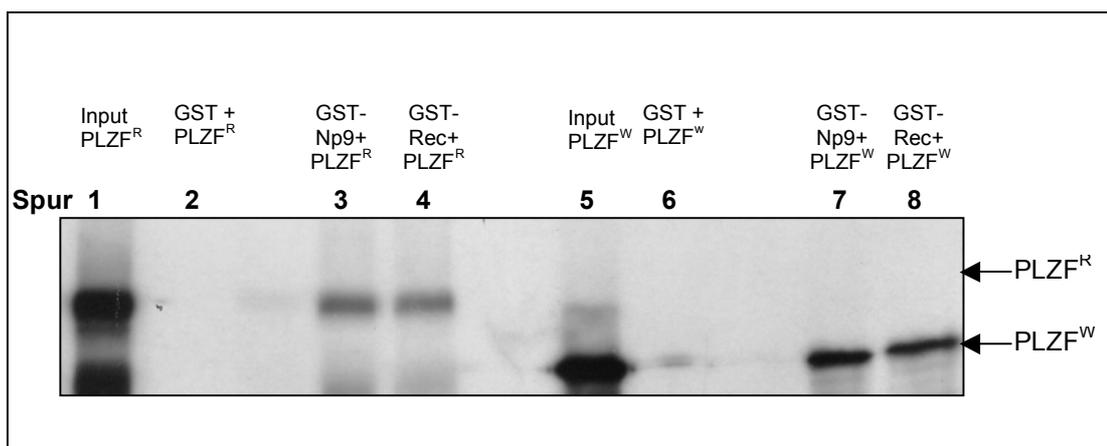


Abb. 4.8: Nachweis der Bindung von Rec und Np9 an azetyliertes (PLZF^R) als auch unazetyliertes PLZF (PLZF^W). Hier ist Ergebnis einer GST-Pulldown Analyse mit dem bakteriell von dem Konstrukt pGEX-Np9 und pGEX-Rec exprimierten GST-Np9- und GST-Rec- Derivat und dem *in vitro* translatierten S³⁵ radioaktiv markierten Vollängen- PLZF, das einmal mittels des

Kaninchenreticulocytens-Lysats und einmal mittels des Weizenkeim-Lysats translatiert wurde und damit einmal in azetylierter bzw. unazetylierter Form vorliegt, zu sehen. In der Autoradiographie des 10%igen SDS-Gels sind in den Spuren 1 und 5 die Inputkontrollen (1,5 µl radioaktiv markiertes PLZF), in den Spuren 2 und 6 die Negativkontrollen, in den Spuren 3 und 7 die GST-Np9-Proteine und in den Spuren 4 und 8 die GST-Rec-Proteine, die matrixgekoppelt und von dem PLZF-Klonen präzipitiert wurden, zu sehen.

4.3 Np9 und Rec beeinflussen die Tumorigenese über den PLZF/c-Myc Pathway

Von PLZF ist bekannt, dass es als transkriptioneller Repressor eine große Anzahl an Zielgenen wie z. B. Cyclin A2 reguliert (Yeyati et al., 1999). Dazu benötigt es die DNA-Bindung über die Zinkfingerdomäne als auch die Assoziation der POZ-Domäne mit den Korepressorproteinen N-CoR, SMRT, Sin3A und HDAC1 (David et al., 1998; Grignani et al., 1998; He et al., 1998; Hong et al., 1997; Lin et al., 1998). Eine kürzliche Arbeit hat gezeigt, dass ein Großteil der transkriptionellen Veränderungen, bewirkt durch PLZF, zurückzuführen sind auf die Repression des *c-myc* Gens (McConnell et al., 2003). *C-myc* ist ein Proto-Onkogen, das in einer Vielzahl von Tumoren hochreguliert vorliegt. Es unterstützt die Zellproliferation, indem es Cycline herabreguliert und p21 hochreguliert, weiterhin spielt es eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums, der Apoptose und in der Differenzierung und Selbsterneuerung der Stammzellen (Schmist et al., 2000; Nesbit et al., 1999). Um zu untersuchen, ob die PLZF-bindenden Proteine Rec und Np9 einen Effekt auf die Repressorfunktion von PLZF auf *c-Myc* haben, wurden im folgenden Luziferase Assays und Proteinanalysen durchgeführt.

4.3.1 PLZF reprimiert den *c-myc* Promotor

McConnell et al. konnte 2003 zeigen, das PLZF den *c-myc* Promotor reprimiert. Um diesen Effekt nachweisen zu können, wurden in einem Luziferase System die *c-myc* Promotoren und PLZF- Klone, die wir freundlicherweise von Jonathan D. Licht zur Verfügung gestellt bekommen haben, eingesetzt. 293T Zellen wurden in 24 Loch Platten ausgesät und mit den Promotoren *cmcy2.5* und *cmcy2.5ΔPLZF* transfiziert. Der Promotor *cmcy2.5* enthält die direkte *in vitro* Bindungsstelle des PLZF Proteins, wohingegen bei dem Promotor *cmcy2.5ΔPLZF* diese mutiert vorliegt. Kotransfiziert wurden die Zellen mit pSG5-PLZF und pSG5 als Vektorkontrolle. 42-45 Stunden nach Transfektion wurden die lysierten Zellen am Luminat LB9501-Luminometer (Berthold) gemessen und die Werte anhand der entsprechenden am Facs gemessenen Transfektionseffizienzen relativiert. Zur FACS-Messung wurden zusätzlich bei jedem Ansatz 100 ng EGFP Vektor kotransfiziert. 100 µl der Kulturen wurden mit 100µl FACS- Fixierlösung versetzt und bis zur Messung lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

In Abbildung 4.9 kann man sehen, dass PLZF in der Lage ist, den vollständigen *c-myc* Promotor bis zu 60 % zu reprimieren, im Gegensatz zu dem Ansatz mit dem mutierten *c-myc* Promotor. In diesem ist keine Repression zu erkennen, was auch in den einzelnen P-Werten, die für die Signifikanz der Unterschiede stehen, wiedergespiegelt wird. Dies zeigt, dass die durch EMSA Analyse entdeckte Bindungsstelle notwendig ist für die PLZF vermittelte Repression (McConnell et al., 2003).

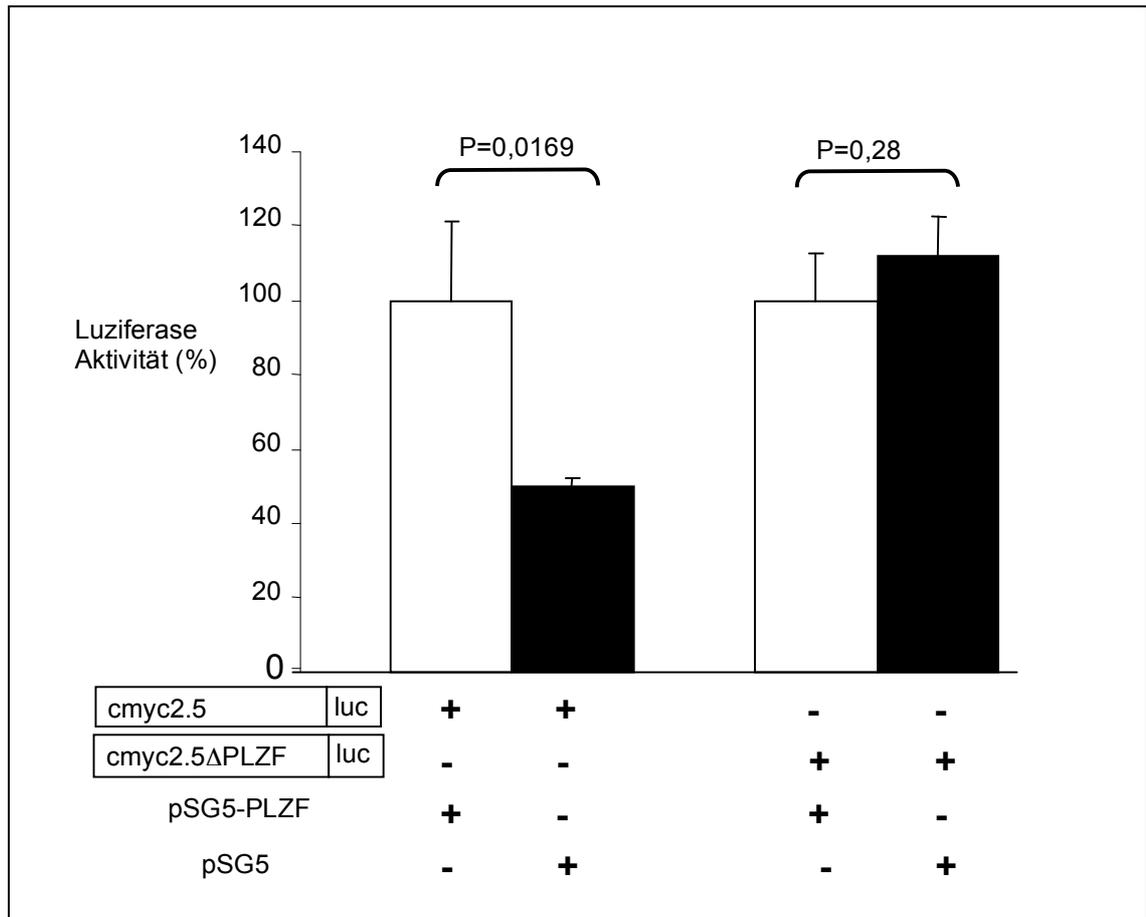


Abb. 4.9: PLZF reprimiert den *c-myc* Promotor

293T Zellen wurden transient kotransfiziert mit dem Reporter Plasmiden *cmyc2.5* (Ansatz 1,2) oder mit der Bindungsmutante *cmyc2.5ΔPLZF* (Ansatz 3,4), und entweder mit dem leeren Vektor als Negativkontrolle (weiße Balken, Ansatz 1,3) oder mit dem Effektor Plasmid *pSG5-PLZF* (schwarze Balken, Ansatz 2,4). Die Luciferase Aktivität wurde 42-45 Stunden nach Transfektion gemessen. Die relative Luciferase Aktivität wurde in Prozent angegeben und die Fehlerbalken der Standardabweichungen wurden aus 3 unabhängigen Experimenten errechnet, genau wie die P-Werte mit Hilfe des Programms Sigma Blot 4.01 TM.

4.3.2 Np9 und Rec beeinflussen die Repression des *c-myc* Promotors durch PLZF

Um nun zu untersuchen, ob Np9 und Rec einen Effekt über PLZF auf die *c-myc* Transkription hat, wurden Kotransfektionen und anschließende Luziferase Assays durchgeführt.

Als Promotor wurde der *cmyc2.5* eingesetzt, der die direkte *in vitro* Bindungsstelle des PLZF Proteins enthält. Die Zellen 293T wurden jeweils mit pSG5 als Vektorkontrolle und pSG5-PLZF, als auch in den jeweiligen Ansätzen (s. Abb. 4.10) mit pSG5-Np9, pSG5-Rec transfiziert. In Abbildung 2.10 ist wiederum die Repression von PLZF auf den *c-myc* Promotor dargestellt, als auch der Einfluss von Np9 und Rec. Während die Expression von Np9 und Rec alleine keinen Effekt auf die Luziferase Produktion hatten (Ansatz 3,5), konnte man bei der Koexpression mit PLZF und dem *c-myc* Promotor feststellen, dass Np9 als auch Rec in der Lage waren, den reprimierenden Effekt von PLZF aufzuheben (Ansatz 4,6). Dieser Effekt ist statistisch signifikant, wie an den P-Werten zu sehen ist. Ist der P-Wert kleiner als 0,05 deutet dieser Wert auf eine statistische Signifikanz wie man an dem reprimierenden Effekt von PLZF auf *c-Myc* sehen kann. Sobald Rec und Np9 mit PLZF koexprimiert wurden, konnte man keinen signifikanten P-Wert ausmachen.

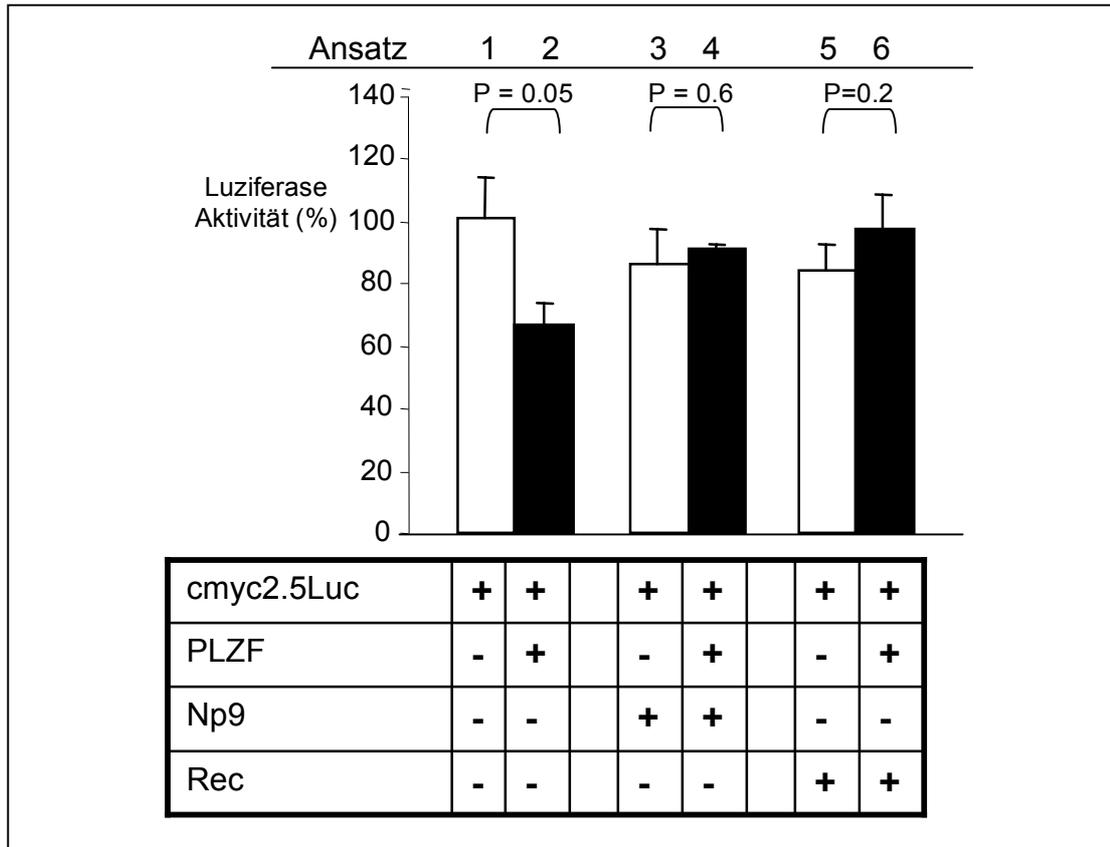


Abb. 4.10: Np9 und Rec heben den reprimierenden Effekt von PLZF auf *c-myc* auf. 293T Zellen wurden transient ko-transfiziert mit dem Reporter Plasmid *cmyc2.5* (Ansatz1-6) und mit dem leeren pSG5-Vektor als Negativkontrolle (weiße Balken) oder mit dem Effektor Plasmid pSG5-PLZF (schwarze Balken), als auch mit Np9- (Ansatz 3,4) oder Rec –(Ansatz 5,6) produzierenden Effektor Plasmiden. Die Luziferase Aktivität wurde 42-45 Stunden nach Transfektion gemessen. Die relative Luziferase Aktivität wurde in Prozent angegeben und die Fehlerbalken der Standardabweichungen wurden mit Hilfe des Programms Sigma Blot 4.01 TM aus 3 unabhängigen Experimenten errechnet, genau wie die P-Werte.

4.3.3 Rec beeinflusst das endogene c-Myc über PLZF

Nachdem in den Luziferase Assays ein gesteigertes Level an *c-myc* in den mit PLZF und Rec oder Np9 kotransfizierten Zellen zu finden war, sollten diese Resultate auf Proteinebene im Western Blot bestätigt werden.

Freundlicherweise bekamen wir von der Arbeitsgruppe Jonathan D. Licht die stabil exprimierende PLZF Zelllinie U937:PLZF. Bei der Zelllinie handelt es sich um humane Monocyten mit induzierbarem PLZF, welches unter der Kontrolle von dem autoregulatorischen tet-off- System steht. Das bedeutet, dass nach dreimaligen Wachen mit PBS und Kultivierung in Tetrazyklin freiem Medium, PLZF nach 24 Stunden exprimiert wird (McConnell et al., 2003; Ward et al., 2001). Um nun eine vergleichbare Zelllinie mit stabil exprimierenden Rec bzw. Np9 zu erhalten, wurden Rec und Np9 in die MCS eines CMV Promotors (phCMVpa) einkloniert und die Zellen U937:PLZF wurden mittels Elektroporation (s. Kap. 3.6.2.2) mit den entsprechenden Klonen transfiziert. Der transfizierte Leervektor dient als Negativkontrolle. Um eine Selektion zu ermöglichen, musste zu diesem Zweck der Plasmid pCDNA3.1/Hygro, der eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, kotransfiziert werden. Nach der Transfektion wurden die Zellen einem Selektionsdruck von 0,3mg/ml Hygromycin ausgesetzt. Um zu überprüfen, ob die Zellen das entsprechende Protein (Rec oder Np9) exprimieren, wurden Proteinextrakte der einzelnen Zelllinien gewonnen und im Western Blot getestet. Hierzu wurden die Zelllinien 3 mal mit PBS gewaschen und in Medium mit und ohne Tetrazyklin ausgesät, um die PLZF Expression anzuschalten oder zu unterdrücken. Die Zelllinie U937:PLZF-Np9 wurde zusätzlich mit dem Proteaseinhibitor MG132, der dem Abbau von Np9 entgegenwirkt, behandelt. Nach 36 Stunden wurden die Proteinextrakte aufgearbeitet und analysiert. Zunächst ist in Abbildung 4.11 zu erkennen, dass PLZF in allen Zelllinien, die nicht mit Tetrazyklin behandelt wurden, exprimiert wird, außer in der Zelllinie U937:PLZF-Np9. Dies ist auf die Behandlung mit MG132 zurückzuführen. Rec konnte als deutliche Bande nachgewiesen werden. Np9 war nur als Protein nachweisbar, wenn die Zellen zuvor mit MG132 behandelt wurden. Des Weiteren kann man dieser Abbildung entnehmen, dass Rec keinen direkten, sichtbaren Einfluss auf die Expression von PLZF hat.

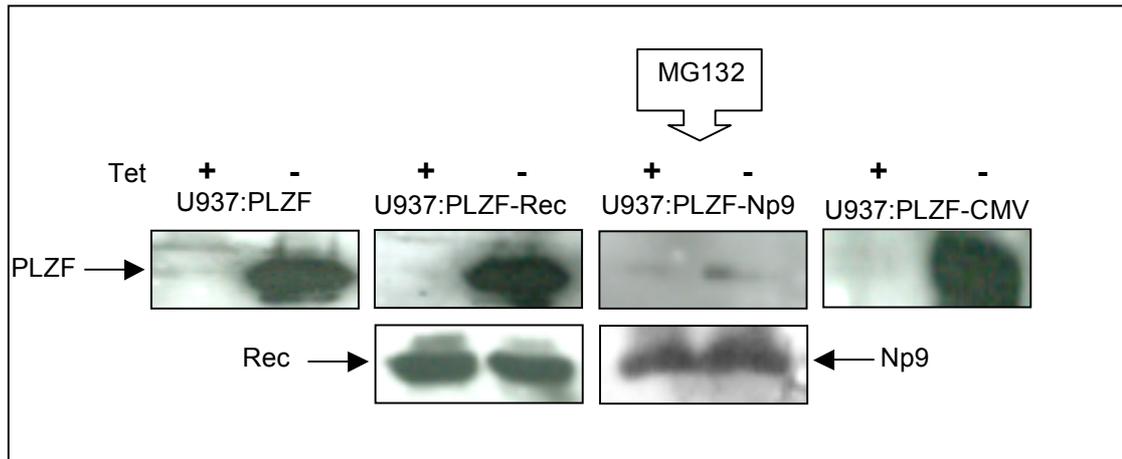


Abb. 4.11: Western Blot zum Nachweis der PLZF, Rec und Np9 Proteinexpression in den stabilen Zelllinien U937:PLZF; U937:PLZF-Rec, U937:PLZF-Np9 und U937:PLZF-CMV, jeweils mit (+) und ohne (-) Tetrazyclin. 15 μ g der Proteinextrakte wurden auf ein 10%-iges (PLZF), ein 15%-iges (Rec) und auf ein Gradienten –gel (Np9) aufgetragen, um die unterschiedlich großen Proteine sichtbar zu machen. Die MG132-behandelte Zelllinie U937:PLZF-Np9 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern anti-PLZF in einer Verdünnung 1:50 (obere Bilderreihe), anti-Rec Serum K3086 1:100 (unteres, linkes Bild) und anti-Np9 Serum K82 1:100 (unteres, rechtes Bild). Die Proteinbanden wurden schließlich mit Hilfe einer ECL-Färbung sichtbar gemacht.

Aufgrund der Instabilität von Np9 und der Annahme, dass MG132 die Expression von PLZF beeinflusst (Abb. 4.11), wurden die folgenden Versuche, die sich mit dem Einfluss der HERV-K Proteine auf die Proteinexpression von c-Myc befassen, nur mit der Zelllinie U937:PLZF-Rec und den Kontrollzelllinien durchgeführt. Um eine vergleichbare Menge an den Proteinen Rec und PLZF zu erhalten, wurde der PLZF- Expressionslevel mittels einer ansteigenden Menge an Tetrazyclin eingestellt, die man der Abbildung 2.12 entnehmen kann. Nachdem die Zelllinien U937:PLZF und U937:PLZF-Rec mit den entsprechenden Mengen Tetrazyclin behandelt wurden, wurden nach 36 Stunden Proteinextrakte hergestellt und diese in einem 15%-igen und einem 10%-igen Gel aufgetrennt. Die Banden der

anschließenden Western Blots wurden in einem Laser Densitometer gemessen. Dabei wird die Farbdichte von den einzelnen Banden quantitativ gemessen. Der dadurch erhaltene Wert wird mit dem Wert der entsprechenden Aktin-Bande relativiert, so dass das in der Abbildung 4.12 gezeigte Balkendiagramm erstellt werden konnte.

Zunächst ist in der Abbildung 4.12 die über die Tetrazyklinkonzentration regulierte Menge an PLZF zu erkennen, die auch nicht von der Anwesenheit von Rec beeinflusst wird. Weiterhin kann man die Repression, die PLZF auf c-Myc ausübt auch auf Proteinebene erkennen (s.Kap. 4.3.1; McConnell et al., 2003). Je höher der PLZF Level ist, desto geringer der c-Myc Level, wie man erkennen kann, wenn man die Spuren 1,3,5 und 7 vergleicht. Jedoch sieht man einen deutlichen Anstieg von c-Myc in der Zelllinie in der PLZF und Rec exprimiert werden (Spuren 2,4,6 und 8). Diese Tatsache wird von dem Balkendiagramm weiter verdeutlicht.

Somit kann man der Abbildung 4.12 entnehmen, dass Rec in der Lage ist eine Überproduktion von c-Myc zu bewirken bei vergleichbar hohen Mengen an PLZF.

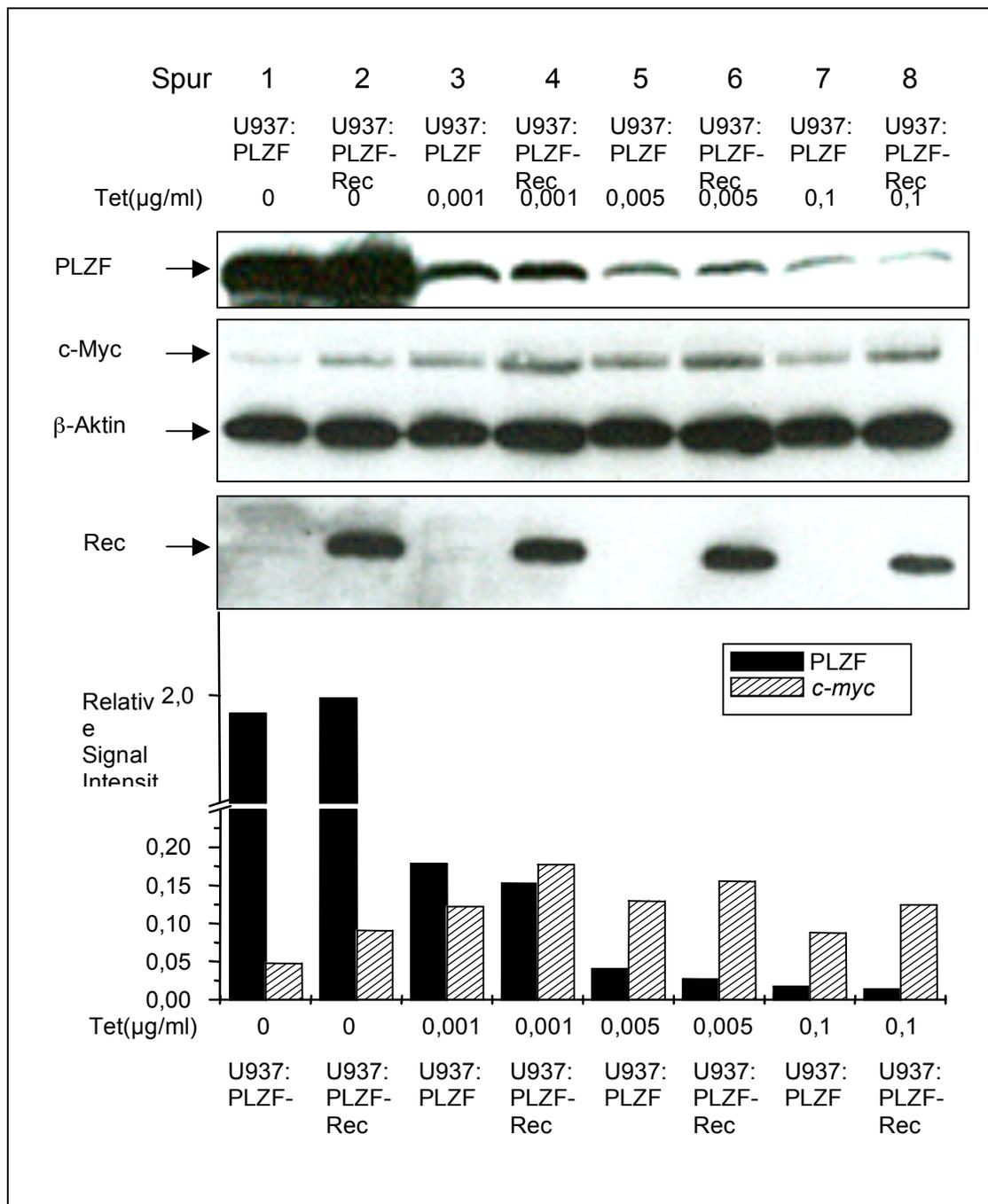


Abb. 4.12: Rec reguliert das endogene c-Myc über PLZF

Es wurden Proteinextrakte aus den Zelllinien U937:PLZF und U937:PLZF-Rec 36 Stunden nach Behandlung mit einer ansteigenden Konzentration an Tetrazyklin gewonnen und diese im Western Blot zum Nachweis der Proteine PLZF, Rec, c-Myc und β -Aktin eingesetzt. 15 μ g der Proteinextrakte wurden auf ein 10%-iges und ein 15%-iges Gel aufgetragen, um die unterschiedlich großen Proteine sichtbar zu machen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern anti-PLZF in einer Verdünnung 1:50, anti-Rec Serum K3086 1:100 und anti- β -Aktin in einer Verdünnung von 1:2500. Der monoklonale c-Myc Antikörper 9E10 wurde in einer Konzentration 1:500

eingesetzt. Die Proteinbanden wurden schließlich mit Hilfe einer ECL-Färbung sichtbar gemacht. Das Balkendiagramm zeigt die relativen Signal Intensitäten der PLZF und c-Myc Banden, die gegen die entsprechenden β -Aktin-Banden normalisiert wurden. Gemessen wurden die Banden in einem Laser Densitometer.

4.3.4 Die Expression *c-myc* regulierter Gene wird von Rec beeinflusst

Das Proto-Onkogen *c-myc* codiert für einen Transkriptionsfaktor, der an der zentralen Regulation von Zellwachstum, Differenzierung, Wachstum und Apoptose beteiligt ist. Ein Großteil der Proteine, die in diese Prozesse involviert sind, werden von *c-myc* reguliert. Nachdem in Kapitel 4.3.2 und 4.3.3 gezeigt werden konnte, dass der Level an endogenem *c-myc* in Anwesenheit von Rec und PLZF verändert wird, stellte sich die Frage, ob auch nachweislich *c-myc* regulierte Gene unter Einfluss von PLZF und Rec ein verändertes Expressionsmuster aufweisen. Aufgrund dessen wurden die Zelllinien U937:PLZF und U937:PLZF-Rec mit und ohne Tet kultiviert, Proteinextrakte gewonnen und im Western Blot mit Hilfe verschiedener Antikörper untersucht. In der Abbildung 4.13 sind die von *c-myc* regulierten Gene aufgeführt, als auch das Expressionsmuster von PLZF, Rec, c-Myc und β -Aktin. *PCNA*, *IKB- α* als auch *p53* sind Gene, die von *c-myc* direkt reguliert werden. Alle 3 Proteine zeigen in Anwesenheit von Rec und PLZF einen Anstieg. Die Proteinlevel von *PCNA*, *IKB- α* und *P53* sind in den Ansätzen ohne Rec wesentlich geringer. Als Negativkontrolle diente das β -Aktin Gen, das nicht von *c-myc* beeinflusst wird (Abb. 4.13). Die Banden der Proteine im Western Blots wurden zusätzlich in einem Laser Densitometer gemessen und mit der jeweiligen β -Aktin-Bande relativiert. Auf der Basis dieser Werte konnte das Balkendiagramm erstellt werden, welches das unter Einfluss von Rec veränderte Expressionsmuster der Proteine *PCNA*, *IKB- α* und *P53* unterstützt.

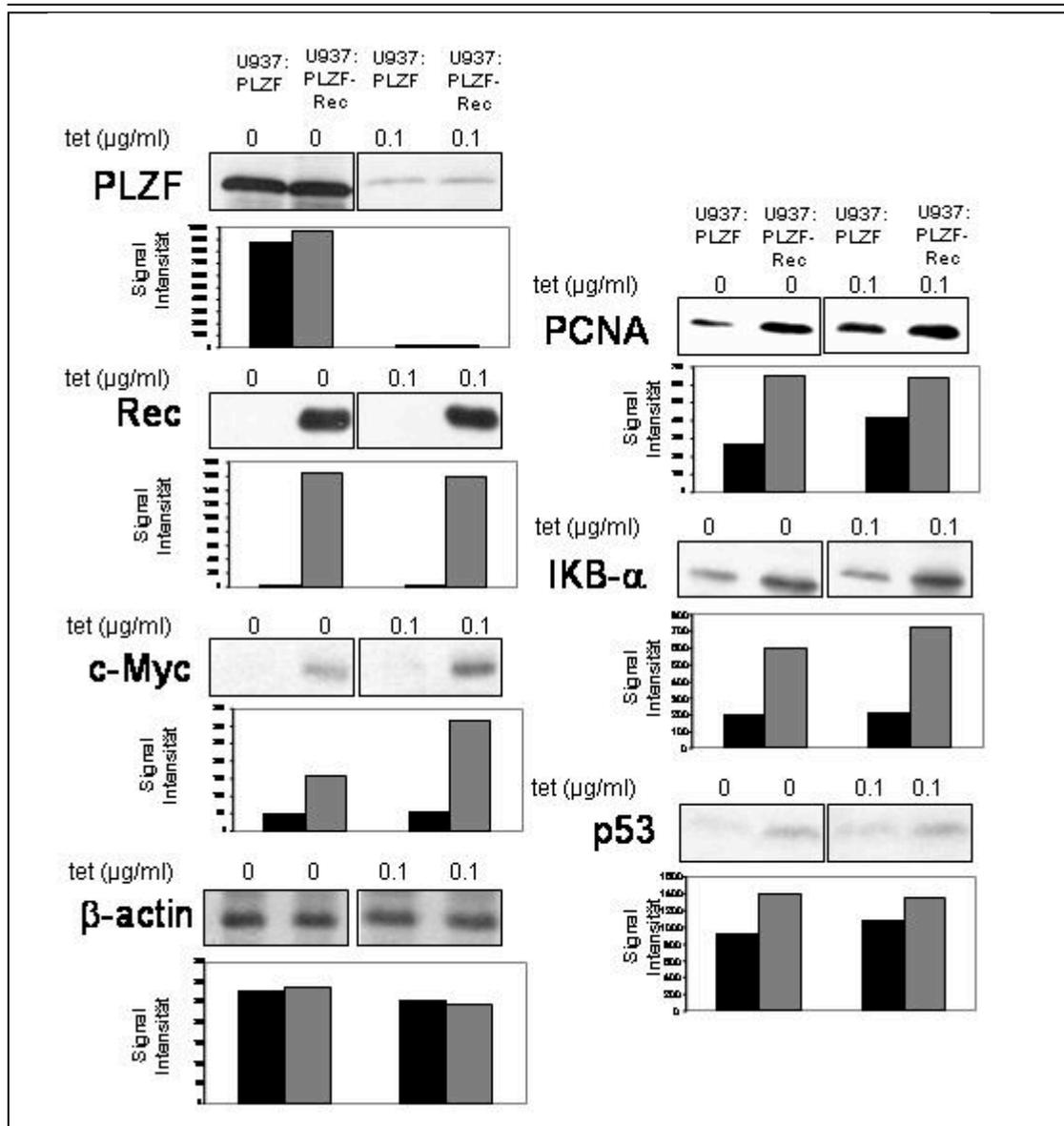


Abb. 4.13: Rec reguliert c-Myc regulierte Proteine über PLZF und c-Myc
 Western Blot zum Nachweis der PLZF, Rec, c-Myc, β-Aktin, PCNA, IKB-α und p53 Expression in den stabilen Zelllinien U937:PLZF und U937:PLZF-Rec, jeweils mit (0,1) und ohne (0) Tetrazyclin. 15 μg der Proteinextrakte wurden auf ein 10%-iges (PLZF, c-Myc, β-Aktin, IKB-α, p53), ein 15%-iges (Rec) Gel aufgetragen, um die unterschiedlich großen Proteine sichtbar zu machen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern anti-PLZF in einer Verdünnung 1:50, anti-Rec Serum K3086 1:100, anti-c-myc sc-40 1:500, anti-β-Aktin 1:2500, anti-PCNA sc-56 1:500, anti-IKB-α sc-21 1:500 und anti-p53 1:2000. Die Proteinbanden wurden mit Hilfe einer ECL-Färbung sichtbar gemacht. Die entsprechenden Balkendiagramme unterhalb der jeweiligen Blots zeigen die Signal Intensitäten der Protein-Banden. Gemessen wurden die Banden in einem Laser Densitometer.

4.3.5 Zellwachstum in Abhängigkeit der Rec Expression

Aufgrund der Tatsache, dass Rec die von PLZF vermittelte *c-myc* Repression aufhebt, wie in den Luziferase Assays und in den Proteinstudien gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob die Expression von Rec auch spezifische Veränderungen im Phänotyp der Zellen hervorruft. Kürzliche Studien haben gezeigt, dass ectopische PLZF- Expression zu Zellzyklusarrest und Apoptose führt und dass diese Effekte hauptsächlich durch die Repression von *c-myc* verursacht werden können (McConnell et al., 2003).

Daher sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße das Zellwachstum als auch die Apotoserate (siehe Kap. 4.3.6) in den U937:PLZF Zellen mit und ohne Rec beeinflusst sind. Zur Versuchsdurchführung der Untersuchung des Zellwachstums wurden 3×10^5 Zellen der Zelllinien U937:PLZF-CMV und U937:PLZF-Rec auf 96 Loch Platten ausgesät und mit den entsprechenden Mengen Tetrazyklin behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe des dem „*Cell Proliferation Kit I*“ (MTT-Assay) der Firma Roche behandelt und am Photometer gemessen. Bei diesem Test nehmen lebende Zellen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark blauen wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um, der nachdem die Zellen lysiert sind am Photometer messbar ist. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen. Diese gemessenen Werte wurden in ein Balkendiagramm überführt. Anhand der Abbildung 4.14 kann man erkennen, dass Rec positive als auch Rec negative Zellen in der Abwesenheit von PLZF gleich gut wachsen. Im Gegensatz dazu sieht man schon bei geringen Mengen an PLZF (induziert durch 0,005µg/ml Tetrazyklin) und deutlicher bei größeren Mengen an PLZF (induziert durch die Abwesenheit von Tetrazyklin) in Rec negativen Zellen eine signifikante reduzierte Proliferation. Diese Reduktion wird allerdings von den Rec positiven Zellen ausgeglichen und die Zellen zeigen eine signifikant höhere Wachstumsrate.

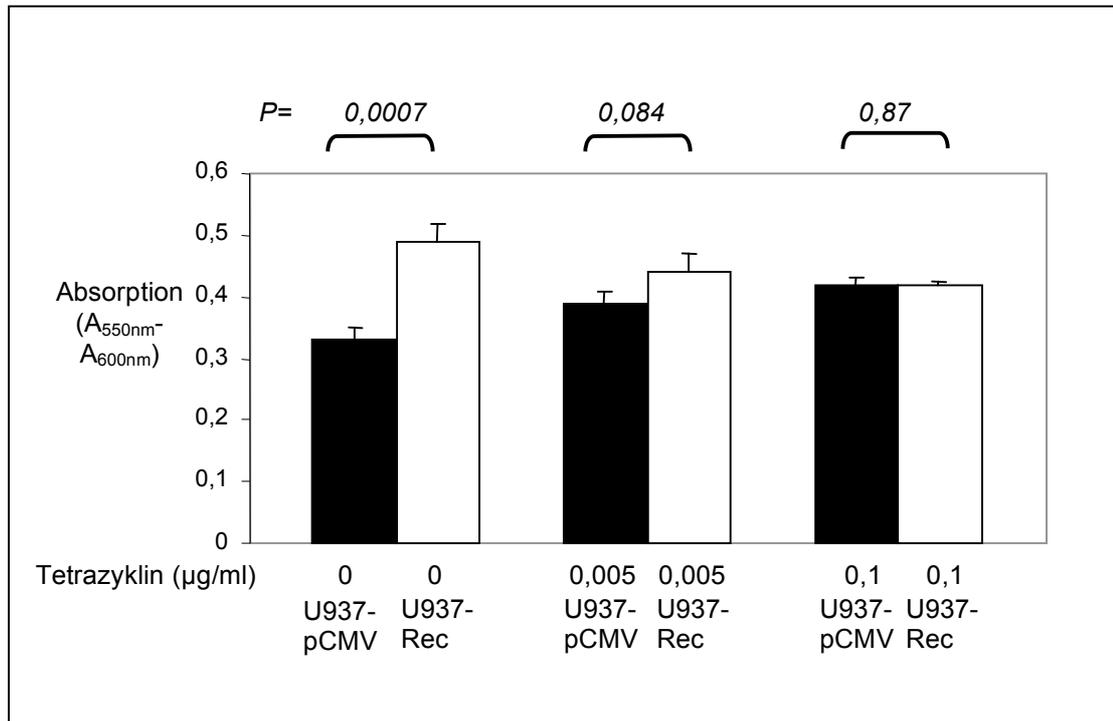


Abb. 4.14: Zellwachstum in Abhängigkeit der Rec Expression

U937:PLZF-CMV (schwarze Balken) und U937:PLZF-Rec (weiße Balken) Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an Tetracyclin (0; 0,005; 0,1 µg/ml) 24 Stunden behandelt. Nach 24 Stunden Wachstum wurden die Zellen mit dem Farbstoff Formazan behandelt und nach weiteren 4 Stunden lysiert („Cell Proliferation Kit I“ (MTT-Assay) Firma Roche). Die Wachstumsrate wurde ermittelt, indem die Absorption im Microelisa® Auto Reader der Firma Dynatech gemessen wurde. Die Werte wurden in ein Balkendiagramm überführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus 3 Experimenten und der P-Wert stellt die Signifikanz der Unterschiede dar.

4.3.6 Apoptoserate in Abhängigkeit von der Rec Expression

PLZF wird eine große Bedeutung bei apoptotischen Prozessen zugeschrieben: Wird PLZF ectopisch in Zellen exprimiert, reprimiert es c-Myc und reguliert so zum großen Teil Zellzyklusarrest und Apoptose (McConnell et al., 2003). Um den Einfluss von Rec in diesem Zusammenhang zu testen, wurde die Apoptoserate im FACS in den Zelllinien U937:PLZF-CMV und U937:PLZF-Rec gemessen. Zur Bestimmung wurden je 3×10^5 Zellen ausgesät, mit den entsprechenden Mengen Tetracyclin behandelt, nach 24

Stunden mit Methanol fixiert und nach einem RnaseA-Verdau mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in DNA interkaliert und diese so markiert. Durch einen Argonlaser wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt und das emittierte Licht wird im FACS gemessen. Anhand eines Verteilungsdiagramms kann die Zahl der apoptotischen Zellen ermittelt werden.

Wie beschrieben löste die Expression von PLZF eine höhere Apoptose aus als die gleiche Zelllinie ohne PLZF (McConnell et al., 2003). Bei der Zelllinie U937:PLZF-Rec, die Rec exprimiert, sieht man eine eindeutig reduzierte Apoptoserate, trotz gleicher Mengen an PLZF (Abb. 4.15).

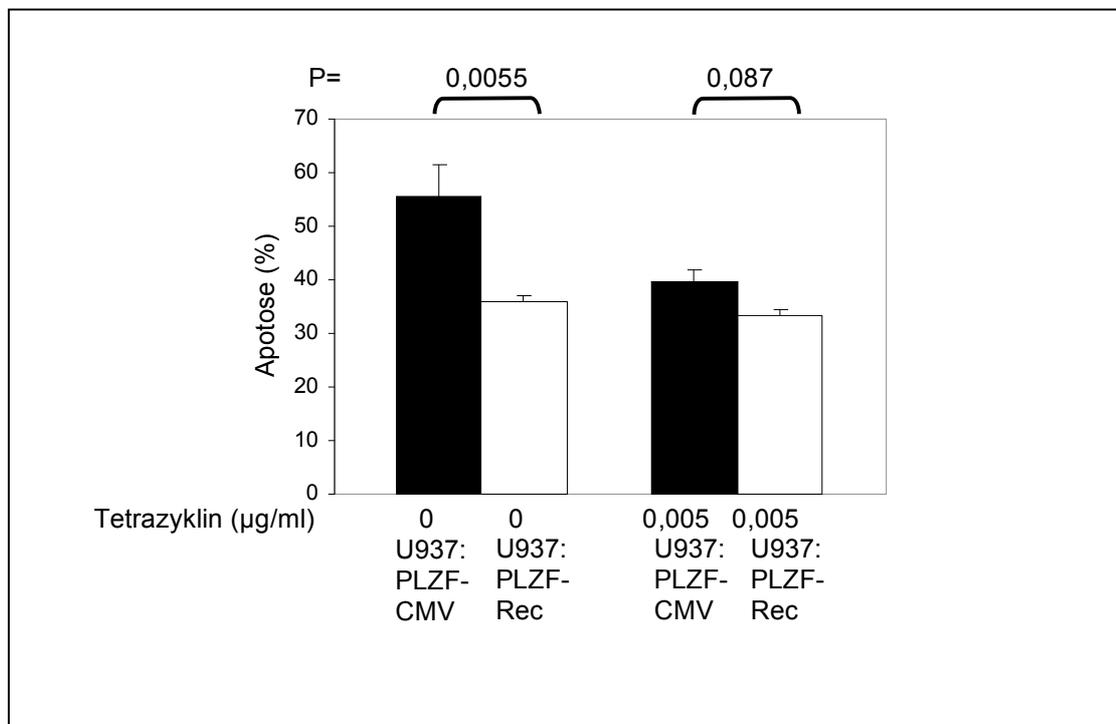


Abb. 4.15: Apoptoserate in An- und Abwesenheit von Rec

3×10^5 Zellen der Zelllinien U937:PLZF-CMV (schwarze Balken) und U937:PLZF-Rec (weiße Balken) wurden mit unterschiedlichen Mengen an Tetrazyklin (0; 0,005 µg/ml) ausgesät. Nach 24 Stunden Wachstum wurden die Zellen mit Methanol fixiert und PI gefärbt. Die Apoptoserate wurde im FACS bestimmt und die Werte in ein Balkendiagramm übertragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus 3 Experimenten und der P-Wert stellt die Signifikanz der Unterschiede dar.

4.4 **HERV-K-Rec und Np9 assoziieren mit dem humanen Spleißfaktor 61K**

In vorangegangenen Arbeiten wurde in unserer Arbeitsgruppe von Frau Yuzuh Tang mit Hilfe des Hefe-II-Hybrid Systems neben dem promyelozytischen Leukämie Zink Finger Protein (PLZF) ein weiteres zelluläres Protein identifiziert, welches mit Rec interagiert. Dieses Protein ist der humane Spleißfaktor 61K (Abb. 4.16), der für die Bildung von Spleißosomen benötigt wird (Makarova et al., 2002). Substitutionen, Deletionen und Insertionen in einem Allel des 61K kodierenden Gens PRPF31 werden für die autosomal vererbare Krankheit *retinitis pigmentosa* (asrp) verantwortlich gemacht. Interessanterweise ergab eine Datenbankanalyse, dass der zentrale Abschnitt der kodierenden 61K-Sequenz homolog zu dem durch die SEREX-Methode identifizierten Brustkrebsantigen NY-BR-99 ist. Vermutlich handelt es sich um ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch im Brustkrebsgewebe exprimiert wird. Während seiner Promotion konnte Dr. Uwe Galli erste Bindungsstudien zwischen Rec und dem 61K Protein durchführen, wobei er in GST- Pulldown-, Koimmunpräzipitations- und Kolokalisationsexperimenten die Interaktion der beiden Proteine bestätigen konnte (unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung Dr. Uwe Galli). Außerdem konnte Dr. Vivienne Armbrüster eine Bindung zwischen dem 61K Protein und Np9 in GST- Pulldown- Experimenten zeigen (unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung Dr. Vivienne Armbrüster). Diese Interaktionen sollten in GST- Pulldown Experimenten weiter charakterisiert werden und die Bindungsdomänen eingegrenzt werden. Im Falle von Np9 sollten noch zusätzliche Kolokalisationsexperimente die postulierte Bindung unterstützen.

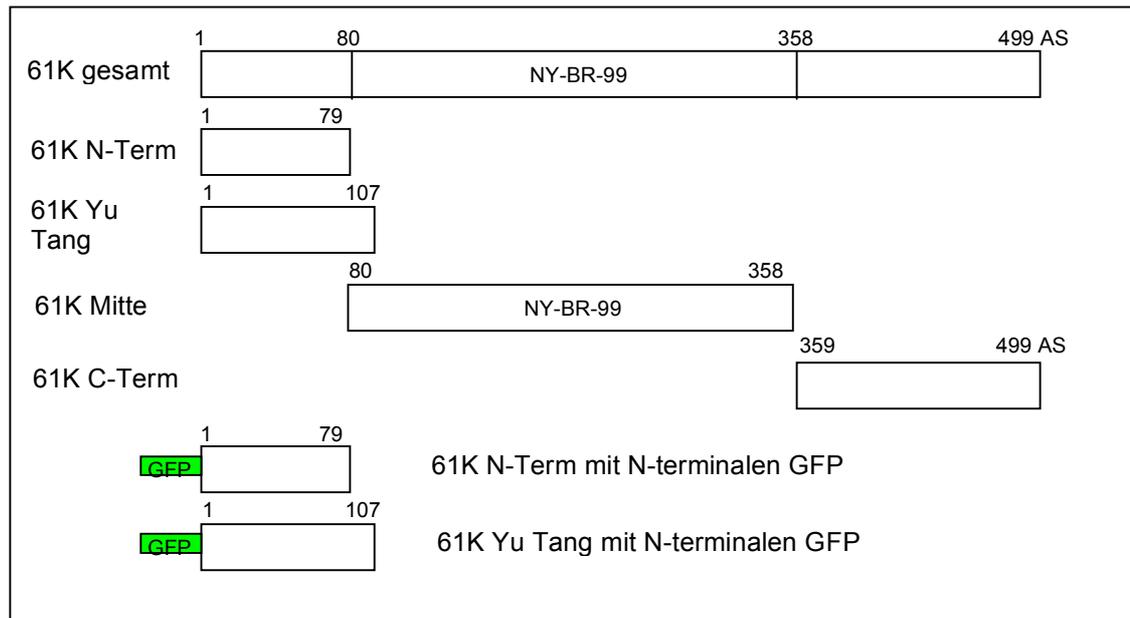


Abb. 4.16: Schematische Darstellung des humanen Spleißfaktors 61K, der Lage des Brustkrebsantigens NY-BR-99, sowie der eingesetzten Deletionsmutanten von dem 61K Protein.

4.4.1 Bestätigung der Rec/61K Interaktion und Eingrenzung der Bindungsstellen durch GST-Pulldown Analysen

Im Hefe II Hybrid wurden die N-terminalen 107 AS des 61K-Proteins identifiziert. Diese werden in dieser Arbeit als 61K-YuTang Klon beschrieben. Um die Bindungsstelle von Rec auf dem 61K-Protein näher beschreiben zu können, wurden in dieser Arbeit weitere GST- Pulldowns mit den in Abbildung 4.16 aufgeführten Klonen durchgeführt. Zum Nachweis einer *in vitro* Interaktion mit Rec wurde das 61K Protein in einem gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem mit Hilfe des eukaryotischen Expressionsvektors pSG5-61K synthetisiert, wobei die Cysteine und Methionine mittels ^{35}S diese radioaktiv markiert wurden. Rec wurde bakteriell als GST- Fusionsprotein exprimiert und danach mit den radioaktiv markierten 61K Klonen inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente ein bakterielles GST-Extrakt ohne Rec. So können die Proteine im Falle einer Interaktion komplexieren. Nach den entsprechenden Waschrissen wurden die matrixgebunden Proteine in einem SDS-Gel aufgetrennt und durch

Autographie untersucht. Die verkürzten Klone 61K-N Term (4 Methionine) und 61K-YuTang (5 Methionine) konnten vermutlich wegen ihrer geringen Größe und ihrer geringen Anzahl an Methioninen und Cysteinen nicht *in vitro* markiert werden. Daher wurden Klone hergestellt, die am N-Term durch das GFP-Protein verlängert wurden: pSG5-GFP-61K-N-Term und pSG5-GFP-61K-YuTang. In Abbildung 4.17 sieht man das 61K Protein bei der Größe von 61 kD, die darüber liegende Bande lässt auf eine posttranslationale Modifikation z.B. durch Phosphorylierung schließen. 61K-Mitte hat eine Größe von 34 kDa., der Klon 61K-C-Term von 17 kDa, GFP-61K-N-Term von 34 kDa und GFP-61K-YuTang ist 37 kDa groß. In allen Fällen binden die 61K-Klone nicht an die Negativ Kontrolle, das matrixgebundene GST-Protein. Rec ist, wie bereits beschrieben, in der Lage an den Volllängen 61K-Klon zu binden (Abb. 4.17). Außerdem sieht man der Abbildung 4.17 eine Bindung von Rec an den verlängerten N-Term, den verlängerten YuTang- Klon und unabhängig davon an den mittleren Teil das 61K-Proteins. Rec ist allerdings nicht in der Lage an den C-Term des 61K Proteins zu binden.

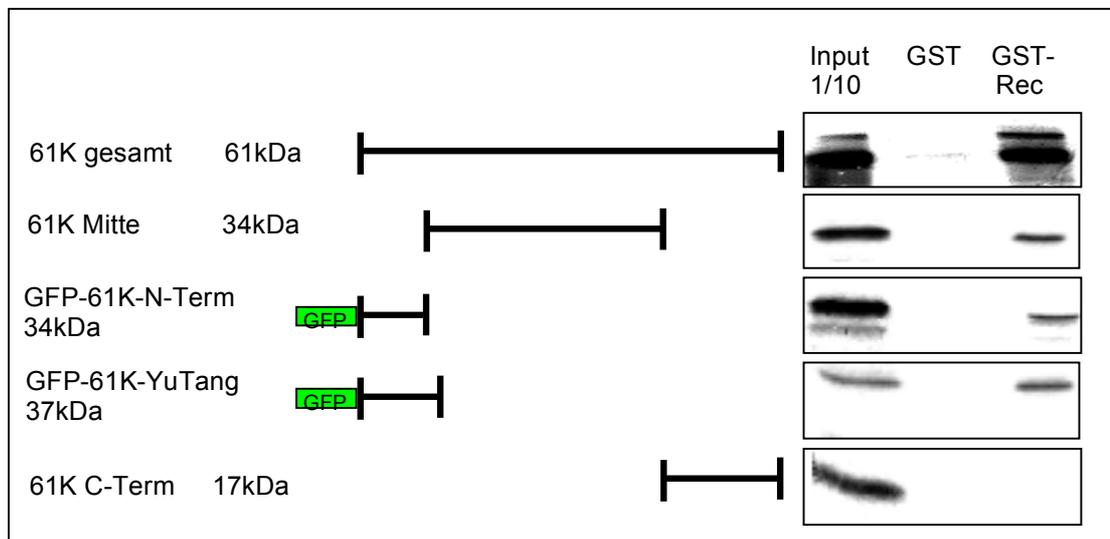


Abb. 4.17: Nachweis der Bindung zwischen Rec und des 61k Protein und der Deletionsmutanten 61K-Mitte, GFP-61K-N-Term und GFP-61K-YuTang. Abbildung 4.17 zeigt das Ergebnis einer GST-Pulldown Analyse mit dem bakteriell von dem Konstrukt pGEX-Rec exprimierten GST-Rec-Derivat und dem *in vitro* translatierten S^{35} radioaktiv markierten Volllängen- 61K- und den 61K-Deletionsmutanten, von denen je 1/10 in der Inputkontrolle aufgetragen wurden. GST alleine dient als Negativkontrolle. Auf der linken Seite ist eine

schematische Darstellung mit Bezeichnung und Größe der eingesetzten Klone zu sehen.

4.4.2 Np9 und 61K kolokalisieren in transient transfizierten Zellen

Das 61 K Protein lokalisiert innerhalb des Zellkerns in Cajal Bodies und in anderen distinkten Strukturen (Makarova et al., 2002). Die Cajal Bodies wurden erstmals 1903 von Romon y Cajal beschrieben als "nucleolar accessory bodies" aufgrund ihrer Expression im Nukleus von neuronalen Zellen. In der Zwischenzeit weiß man, dass Cajal Bodies im Nukleus von proliferierenden Zellen, z.B. Tumorzellen und in metabolisch aktiven Zellen, wie Neuronen lokalisiert sind (Ogg et al., 2002). Außerdem sind in diesen Strukturen die snRNP-Komplexe lokalisiert sind (Sleemann und Lamond, 1999). Auch Np9 findet sich in zahlreichen, kleinen definierten Kernstrukturen (Armbrüster et al., 2002) und zeigt somit ein ähnliches Expressionsmuster wie Rec (Boese et al., 2000), von dem Galli während seiner Promotion die Kolokalisation mit dem 61K Protein zeigen konnte. Daher wurde untersucht, ob EGFP-61K und RED-Np9 in Cos-1 Zellen, die mit den entsprechenden Konstrukten transient kotransfiziert worden waren, kolokalisieren. Um dies zu überprüfen wurden am Fluoreszenzmikroskop mit den Filtern für Dapi gefärbte, grüne bzw. rote Fluoreszenz gleiche Bildausschnitte aufgenommen und dann mit Hilfe des Corel Photo Paint 9 digital überlagert. Kolokalisationen, d.h. Orte an denen rote und grüne Fluoreszenz zu finden ist, erscheinen dann gelb. Die Abbildung 4.18 zeigt, dass die Fusionsproteine EGFP-61K und RED-Np9 im Zellkern in distinkten Strukturen kolokalisieren. Im Gegensatz dazu wurden der rote und der grün fluoreszierende Vektor alleine bzw. mit seinem Gegenpart einzel- oder ko- transfiziert und in den Kontrollen sah man keine Überlagerung (Daten nicht gezeigt). Der EGFP, als auch der RED-Vektor sind über die ganze Zelle verteilt.

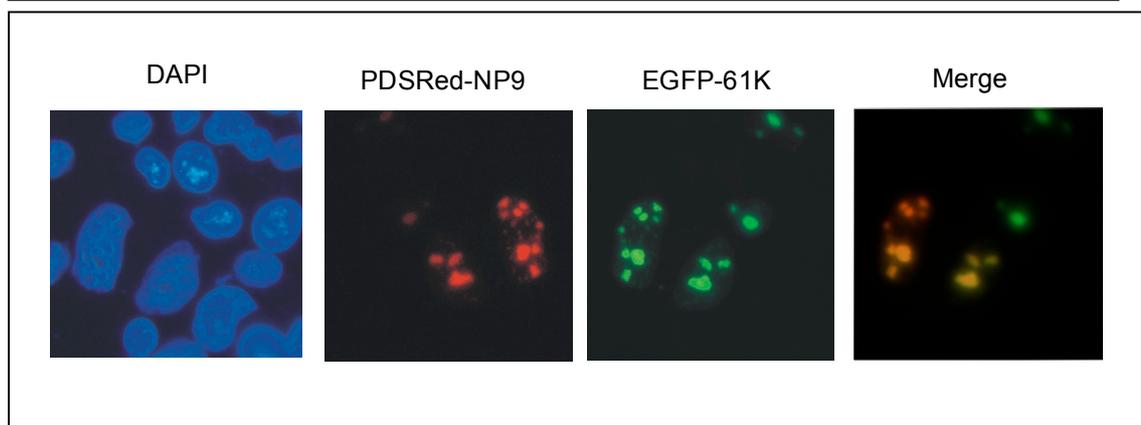


Abb. 4.18: Kolokalisation von EGFP-61K und Red-Np9 im Zellkern

Cos-1 Zellen wurden mit pEGFP-PLZF und pDs-Red-Np9 kotransfiziert. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Fixierung mit Paraformaldehyd. Zum Nachweis der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Die DAPI gefärbten Zellkerne erscheinen blau (linkes Bild) und in dem rechten Bilde ist die Überlagerung der Proteine gezeigt (Merge). Die Aufnahmen wurden mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop und dem angeschlossenen Bildbearbeitungsprogramm erstellt.

4.4.3 Bestätigung der NP9/61K Interaktion und Eingrenzung der Bindungsstellen durch GST-Pulldown Analysen

Um die Proteininteraktion, bzw. Kolokalisation in den Cos1 Zellen von Np9 und dem 61K Protein zu unterstützen, wurden GST- Pulldown Analysen durchgeführt. Auch hierbei wurden die in Abbildung 4.16 aufgeführten Klone *in vitro* transkribiert und translatiert, wobei die Cysteine und Methionine mittels ³⁵S radioaktiv markiert wurden. In diesem Versuch wurde das Fusionsprotein GST-Np9 und als Negativkontrolle wiederum das GST- Protein eingesetzt. Eine Bindung der eingesetzten *in vitro* markierten 61K Klone mit Np9, zeigt sich als diskrete Bande auf Höhe des Vollängen 61K- und des 61K-Mitte-Klons. Da sich diese Banden ausschließlich in den Spuren befindet, welche Np9 als GST- Fusionsprotein enthalten und nicht in der Negativkontrolle, handelt es sich bei der Proteinbande um die kopräzipitierten Proteine Np9 und 61K. Auch Np9 ist, wie Rec nicht in der Lage an den C-Term des 61K Proteins zu binden. Des Weiteren findet keine Bindung zwischen Np9 und den Klonen GFP-61K-N-Term und GFP-61K-YuTang statt.

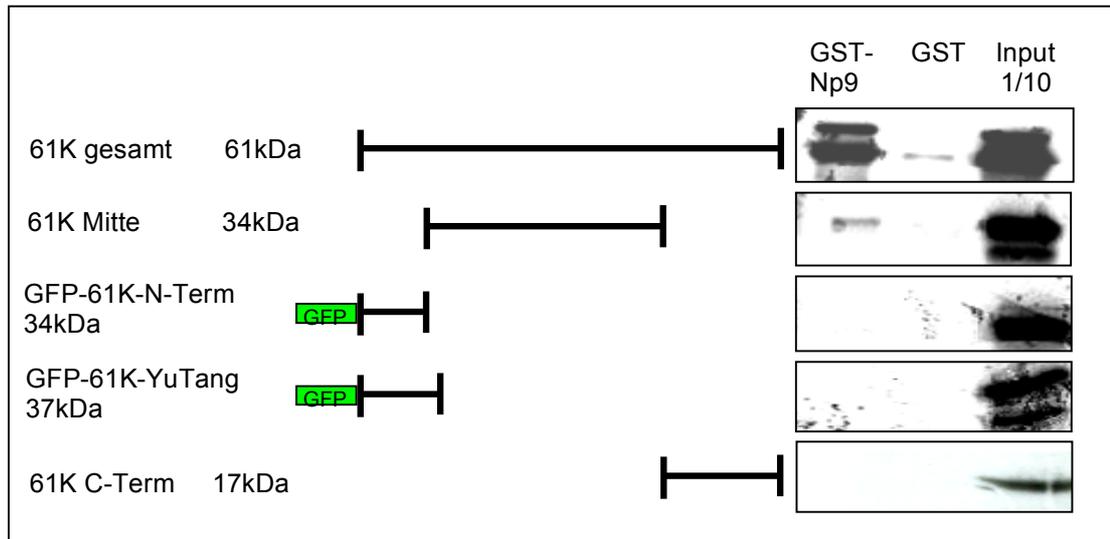


Abb. 4.19: Nachweis der Bindung zwischen Np9 und des 61KD Proteins und der Deletionsmutante 61K-Mitte. Die Abbildung 4.19 zeigt das Ergebnis einer GST-Pulldown Analyse mit dem bakteriell von dem Konstrukt pGEX-Np9 exprimierten GST-Np9-Derivat und dem *in vitro* translatierten S^{35} radioaktiv markierten Volllängen- 61K- und dem S^{35} radioaktiv markierten 61K-Deletionsmutanten, von denen je 1/10 in der Inputkontrolle aufgetragen wurden. GST alleine dient als Negativkontrolle. Auf der linken Seite ist eine schematische Darstellung mit Bezeichnung und Größe der eingesetzten Klone zu sehen.

5 DISKUSSION

Ungefähr 8% des menschlichen Genoms bestehen aus retroviralen Sequenzen, daher stellt sich die Frage, ob und inwiefern diese retroviralen Elemente den zellulären Metabolismus beeinflussen. Von den exogenen Retroviren ist bekannt, dass sie pathogenes Potential besitzen. In den letzten Jahren wurde dieses auch den HERVs zugeschrieben. Die stärkste Korrelation zeigt hierbei die Expression von HERV-K Proviren in Keimzelltumoren (germ cell tumors, GCT). In einem hohen Prozentsatz der Patienten mit GCT können sowohl Antikörper gegen die HERV-K kodierenden Proteine Gag und Env als auch auf Tumorzellen begrenzte HERV-K Expression nachgewiesen werden (Sauter et al., 1996). Auch in den Vorläuferläsionen dieser Tumore (Carcinoma in situ), sowie in den Zelllinien, die von GCTs abgeleitet werden, z.B. Tera1, lässt sich HERV-K Expression detektieren (Herbst et al., 1998).

Nachdem von Ono et al. erstmals 1986 ein humaner endogener retroviraler Vertreter mit wenigen Mutationen (HERV-K10(+)) beschrieben wurde, kennt man heute 2 Varianten von HERV-K, die in der Lage sind, neben den Genprodukten Gag, Prt, Pol und Env, zusätzliche akzessorische Proteine zu exprimieren.

HERV-K Typ 1 exprimiert das 9 kDa große Np9 Protein, dessen RNA in verschiedenen Tumorgeweben als auch in transformierten Zellen, aber nicht in gesundem Gewebe, nachgewiesen werden konnte (Armbruster et al., 2002). Np9 und das von dem HERV-K Typ 2 exprimierte 14,5 kDa große Rec Protein teilen sich die ersten 44 Basen der *env* Sequenz. Rec ähnelt aufgrund seiner Fähigkeit, RNA aus dem Kern zu shutteln den Proteinen Rev/Rex von HIV/HTLV. 2000 wurde von Boese et al. gezeigt, dass Rec tumorigenes Potential enthält, da Rec-transfizierte Rat-1-Zellen in Nacktmäusen zu Tumoren auswuchsen (Boese et al., 2000). Diese These wurde von Galli et al. unterstützt, nachdem rec-transgene Mäuse im Alter von 12 Monaten Neoplasien in den Testis aufwiesen. Im Alter von 19 Monaten kommt es zu einem Verlust der Differenzierung von Spermatozyten über Spermatogonien

5.1 Rec interagiert mit dem Transkriptionsrepressor PLZF

Die Funktionen vieler retroviraler akzessorischer und regulatorischer Proteine werden nicht durch intrinsische enzymatische Funktionen, sondern durch ihre Interaktion mit zellulären Faktoren in einer Art Adapterwirkung vermittelt. Alleine das Nef Protein der primaten Lentiviren besitzt 19 publizierte Interaktionspartner und soll hierdurch an der Beeinflussung mindestens acht verschiedener zellulärer Regulationsmechanismen beteiligt sein (Herna und Saksela, 2000). Daher war von Bedeutung, Interaktionsproteine von Rec zu identifizieren. Von den mit Hilfe des Hefe-II-Hybrid Systems identifizierten Bindungspartnern von Rec, wurde in der vorliegenden Arbeit unter anderem die Interaktion mit dem PLZF Protein bestätigt und die Bindungsstellen eingegrenzt. Das *p/zf*-Gen wurde erstmals beschrieben in Patienten mit akuter Promyelozytischer Leukämie (Chen et al., 1993). Bei dieser bestimmten Form liegt das *p/zf*-Gen zum *rara*-Locus transloziert vor (t11/17 q23;q21). *Rara* spielt eine große Rolle bei der Differenzierung myeloider Zellen und ist ein retinolsäureinduzierbarer Kernrezeptor. Alle APL-Subtypen weisen charakteristischerweise eine Translokation verschiedener Gene mit dem *rara*-Lokus auf. Durch diese Translokationen kommt es zur Synthese aberranter Retinolsäure-Rezeptoren, welche die retinolsäure vermittelte Genexpression beeinflussen. Dies resultiert darin, dass sich die Zellen nicht mehr differenzieren können und letztendlich unkontrolliert proliferieren. Im Gegensatz zu den anderen APL-Subtypen sind PLZF- *Rara* assoziierte APLs nicht sensitiv gegenüber einer Differenzierungstherapie mit all-trans Retinolsäure (ATRA) (Melnick und Licht, 1999).

Aber nicht nur die Verbindung zur Leukämie und die Funktion als Transkriptionsrepressor, sondern auch die Assoziation von PLZF zur Regulation der Spermatogenese macht es zu einem interessanten Interaktionspartner von Rec.

Das 82 kda große PLZF Protein wurde erstmals 2000 von Boese et al. als Interaktionspartner von Rec beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte die Bindungsstelle von Rec auf die Zinkfingerdomäne mittels GST-Pulldown eingegrenzt werde. Rec ist in der Lage sowohl an ein verkürztes Fragment von PLZF zu binden, das nur die ersten 5 Zinkfinger umfasst als auch an das

Fragment, das nur die letzten vier Zinkfinger beinhaltet. Jedoch die stärkste Bindung, wenn man die Bandenstärke vergleicht, ist an das Fragment, das alle neun Zinkfinger umfasst (siehe Abb. 5.2).

Von PLZF ist bekannt, dass es als Transkriptionsrepressor fungiert und spezifisch DNA bindet über seine vier äußersten C-terminalen (C2-H2)-Zinkfinger (Sitterlin et al., 1997; Li et al., 1997). Der N-Terminus ist in der Lage einen Komplex aus Korepressorproteinen, wie N-CoR, SMRT, Sin3A und HDAC1, zu binden und besteht aus einer POZ (Pox Virus und Zinkfinger)-Domäne. Diese Domäne vermittelt die für die Repressorfunktion notwendigen Veränderungen des Chromatingerüsts sowie die Histondeacetylierung (siehe Abb. 5.1) (Hong et al., 1997; He et al., 1998; Lin et al., 1998; Grignani et al., 1998; David et al., 1998). Außerdem ist die Lokalisation von PLZF in subnukleären Strukturen, der Effekt der Unterdrückung der Zellteilung durch PLZF, die Homomultimerisierung des Proteins sowie die Bindung an das homologe TZFP/FAZF Protein abhängig von der POZ-Domäne (Bardwell und Teisman, 1994; Hoatlin et al., 1999; Melnick und Licht, 1999). Im zentralen Bereich, der aus der sogenannten pro- Region und den ersten Zinkfingern besteht, binden zusätzlich weitere Faktoren an das Protein und beeinflussen wahrscheinlich dessen Funktion (Hyman et al., 2000; Melnick et al., 2000; Melnick und Licht, 1999). Da Rec zwei unabhängige Bindungsstellen hat, ist anzunehmen, dass es durch seine Bindung nicht nur in die spezifische DNA Bindung, die über die 4 C-terminalen Zinkfinger vermittelt wird, die PLZF als Transkriptionsrepressor benötigt, eingreift, sondern auch durch die Bindung an die zentrale Region, deren Funktionen stört. Diese pro-Domäne bindet unter anderem an Sumo1, PML und Epsin 1. Das sind Kofaktoren, mit deren Hilfe PLZF als Transkriptionssuppressor agieren kann.

Auch PLZF ist in der Lage an zwei unabhängigen Domänen an Rec zu binden. Um die Bindungsdomäne zu charakterisieren, wurden verschieden verkürzte Mutanten hergestellt, denen jeweils definierte Bereiche an N- bzw. C-Terminus oder an beiden Termini fehlen. Diese Mutanten wurden als GST-Rec Fusionsproteine bakteriell exprimiert und mit dem Vollängen ³⁵S markierten PLZF inkubiert. Aus Abbildung 5.2 kann man ersehen, dass PLZF an eine zentrale (AS 21-47) und eine C-terminale (AS 89-105) Region von Rec binden kann. Im Rahmen ihrer Promotion konnte Frau Dr. Annette Böse

zeigen, dass Rec eine NES-Sequenz besitzt, die die AS 53-59 umfasst. Diese ist notwendig für den Crm1 abhängigen Export, da diese an Crm1 bindet und den Exportablauf sichert (Promotion, Annette Böse). Weiterhin besitzt Rec die entsprechende Sequenz für den Kernimport (NLS= Kernlokalisierungssignal), die aus der Aminosäuresequenz 13-20 besteht (Loewer et al., 1995). Außerdem ist Rec in der Lage über die AS 75 bis 87 Oligomere bis hin zu mindestens Tetrameren zu bilden (Boese et al., 2001). Diese Domäne ist zusätzlich eine von 2 Domänen, die jeweils eine alpha-helikale Sekundärstruktur ausbildet. Die Sekundärstruktur besitzt einen hydrophilen, der sich präferentiell dem Lösungsmittel zuwendet, und einen hydrophoben Bereich, der mit anderen Proteinen in Kontakt treten könnte. Auffällig ist, dass PLZF, obwohl es zwei unterschiedliche Bindungsdomänen auf dem Rec-Protein einnimmt, mit keiner der beschriebenen Domänen korreliert. Was auf der einen Seite daraufhin schließen lässt, dass es nicht die von Rec beschriebenen Funktionen beeinflusst, wie z.B. den Export, aber auf der anderen Seite, dass es diese Domänen nicht bindet, damit es von der Ex- und Import Funktion auch profitieren kann. Um diese Frage zu klären, müssten weiterführende Analysen durchgeführt werden.

5.2 Np9 interagiert mit dem Transkriptionsrepressor PLZF

Da Rec und Np9 identische 44 Basenpaare am N-Terminus haben, stellte sich die Frage, ob auch Np9 in der Lage ist an Rec zu binden, da man bisher nur die Bindungsstelle von Rec zu PLZF auf die letzten 9 Zinkfinger eingegrenzt hatte. Somit nahm man an, dass beide HERV-K Proteine über diese identischen 15 AS am N-Terminus an PLZF binden könnten. Eine weitere Übereinstimmung der beiden akzessorischen Proteine von HERV-K(HML-2) ist die Lokalisation. Beide befinden sich in den Nukleoli (Armbruster et al., 2002). Von Rec ist bekannt, dass es mit PLZF kolokalisiert. Daher wurden in Fluoreszenzexperimenten erste Hinweise auf eine Interaktion bzw. Kolokalisation zwischen Np9 und PLZF gesucht. Hierzu wurden nicht nur Cos-1 Zellen, sondern auch Tera-1 mit gleichen Mengen an PLZF und Np9 kotransfiziert. Wir nutzen 2 unterschiedliche Zelllinien um die Spezifität der

Lokalisation zu unterstreichen. Anhand der Abbildung 4.4 kann man deutlich erkennen, dass beide Proteine innerhalb des Zellkerns in distinkten Strukturen kolokalisieren. Von Np9 ist bekannt; dass es in den Nukleoli von Säugerzellen lokalisiert (Armbruester et al., 2002, Armbruester et al., 2004). Die spezifische nukleäre Lokalisation wird hierbei vermittelt durch das erste Kernlokalisationsignal. Für die nukleoläre Lokalisation scheinen hingegen C-terminale Bereiche der Np9-Sequenz verantwortlich zu sein, da Deletionsmutanten, denen der äußerste C-Term fehlt oder bei denen dieser durch gezielte Mutagenese verändert wurde, eine unspezifische diffuse Verteilung im Zellkern aufweisen (pers. Mitteilung, Dr. Vivienne Armbruester, 2004). Die Nukleoli stellen neben dem Hauptort für die rRNA-Transkription auch ein Assoziationspunkt für verschiedene weitere Kernstrukturen wie den „speckles“ (oder SC35), den GEM's oder den Cajal-Bodies dar, die alle in Spleißereignisse der hnRNA zu mRNA involviert sind (Lamond und Earnshaw, 1998; Wang et al., 2002). Von PLZF konnte gezeigt werden, dass es im Nukleus lokalisiert ist. In MDS-Zellen (eine primitive leukämische Zelllinie) konnten Dong et al. (1996) mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie zeigen, dass PLZF in ca. 50 kleinen nukleären Subdomänen lokalisiert ist. Dieses Muster der subnukleären Expression von PLZF ist abhängig von der intakten POZ/BTB Domäne (Dong et al., 1996). Ist diese nicht intakt, liegt PLZF diffus im Zellkern vor. Obwohl die Kolokalisation der beiden Proteine in den beiden Zelllinien fast komplett war, lässt sich nicht sicher sagen in welchem subnukleären Kompartiment sie kolokalisieren. Somit gehen wir davon aus, dass Np9 als auch PLZF sich in den Nukleoli befinden.

Weitere Hinweise auf eine spezifische Bindung zwischen Np9 und PLZF gaben die Ergebnisse der GST-Pulldown- und der Koimmunpräzipitations-Analysen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Np9 ausschließlich an die vier N-terminalen Zinkfinger von PLZF bindet, was auf eine spezifische Hemmung der DNA-Bindung, die von diesen Zinkfingern vermittelt wird (s. Kapitel 5.1), hinweist (s. Abb. 5.2). Weiterhin kann man der Abbildung 5.2 entnehmen, dass PLZF an die erste NLS (AS 23-29) von Np9 bindet, von der man weiß, dass sie für die nukleäre Lokalisation von Np9 notwendig ist. Ein anderes NLS1-bindendes Protein ist das LNX (*ligand of Numb protein X*) –Protein. Np9 ist im Gegensatz zu Rec in der Lage an LNX zu binden und dieses auch

funktionell zu beeinflussen. Das 80 kDa große LNX Protein wurde erstmals 1998 als Ligand des Numb-Protein X beschrieben (Dho et al., 1998). Es besitzt 5 konservierte Domänen, einen aminoterminalen Ringfinger und vier PDZ- Domänen sowie ein LDNPAY-Motiv, das zusammen mit der ersten PDZ-Domäne die Interaktion mit Numb vermittelt. LNX ist eine E2-abhängige E3-Ubiquitin-Ligase, die Numb für den proteasomalen Abbau markiert (Nie et al. 2002). In Armbruster et al. (2004) konnte die Translokation von LNX in die Nukleoli in Anwesenheit von Np9 sowie die spezifische Kolokalisation beider Proteine in diesem Kernkompartiment gezeigt werden. Da die E2-abhängige E3-Ubiquitin-Ligase LNX den Transkriptionsfaktor Notch über die Degradation von Notch, dem Antagonist von Numb, reguliert, lässt vermuten, dass Np9 in diesen Pathway eingreift und damit mit auch in die von den Proteinen beeinflusste Tumorgenese (Armbruster et al., 2004). Kürzliche Arbeiten zeigten sogar eine Verbindung von einer Dysfunktion von Notch zur Entwicklung von Keimzelltumoren (Adamah et al., 2006). Auch Fehlfunktionen von PLZF konnten mit Leukämien als auch Keimzelltumoren in Zusammenhang gebracht werden (Zelent et al., 2001). Weiterhin spielen beide Proteine eine Rolle bei der Erhaltung der Stammzellen. Hayashi et al. (2001) konnte zeigen, dass die Expression von Notch-1 in Notch-1 defizienten Ratten ab Tag 5-7 eine verminderte Spermatidenbildung und reduzierte Durchmesser der seminiferous tubuli 7 zur Folge hat. Gleichzeitig wurde ein Ansteigen der Spermatozytenproliferation beobachtet (Hayashi et al., 2001). Im Falle von PLZF konnte Costaya et al. (2004) diesem Protein eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Spermatogonien zuweisen. PLZF „knockout“ Mäuse zeigten schon früh Degenerationen in den Tubuli, welchen die Keimzellen und Spermatogonien fehlten, somit hatten diese Tiere mit fortschreitendem Alter einen Verlust an Keimzellen. Wenn man betrachtet, dass beide Interaktionspartner von Np9 in der Spermatogenese eine entscheidende Rolle spielen und Np9 nur in Tumorgewebe nachweisbar ist, könnte man spekulieren, dass Np9 über den LNX/Notch/Numb als auch über den PLZF-Pathway die Tumorgenese beeinflusst.

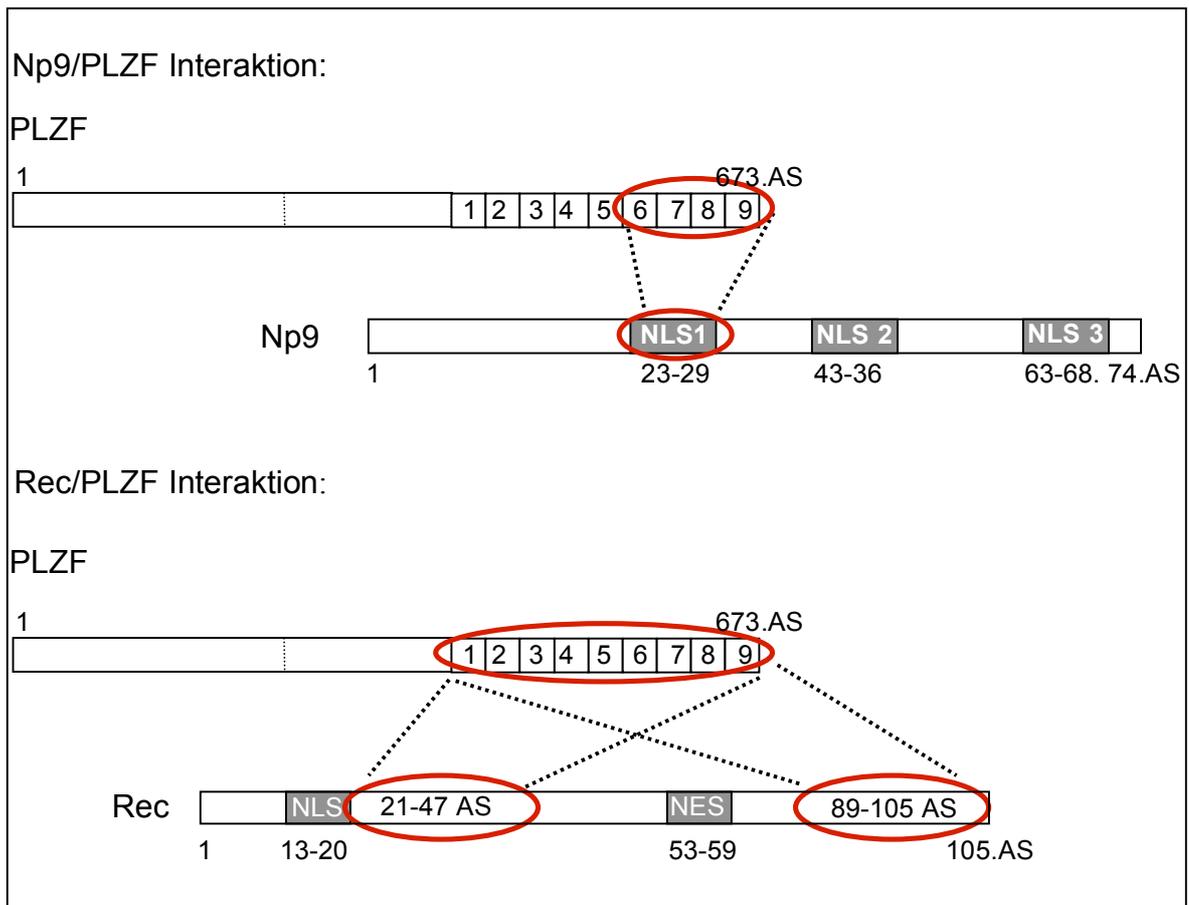


Abb. 5.2: Schematische Zusammenfassung der Interaktionen von Np9 und Rec zu PLZF: Ergebnisse aus GST-Pulldown-Experimenten. Aus dem oberen Teil der Abbildung ist zu ersehen, dass die NLS Region (AS 23-29) von Np9 an die 4 C-terminalen Zinkfinger von PLZF binden. Im unteren Teil ist die Bindung von Rec zu PLZF grafisch dargestellt. PLZF bindet mit seinen 9 Zinkfingern an 2 unabhängige Bindungsdomänen von Rec: eine mittlere (AS 21-47) und eine C-terminale (AS 89-105) Region. Die roten Kreise kennzeichnen die Bindungsdomänen.

5.3 Np9 oder Rec/PLZF Bindung ist nicht von der PLZF Azetylierung abhängig

Von endogenem PLZF ist bekannt, dass es an den Zinkfingern 6 und 9 in KG1-Zellen azetyliert vorliegt und dass diese azetylierten Lysine notwendig sind für eine intakte DNA-Bindung, die wiederum Voraussetzung ist für die Repressions- und Transkriptionsfunktion, die von PLZF vermittelt wird (Guidez et al., 2005). Darüber hinaus wird die Lokalisation von PLZF durch die Azetylierung beeinflusst. Azetyliertes PLZF liegt im Zellkern, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, in distinkten Strukturen vor. Sind die Zinkfinger 6 und 9 von PLZF nicht azetyliert, befindet sich PLZF zwar immer noch im Zellkern, aber diffus. Nachdem wir wussten, dass die Bindungsdomäne von PLZF für beide HERV-K Proteine diese azetylierten Zinkfinger umfasst, stellte sich die Frage, ob die Bindungen von Rec als auch Np9 von der Azetylierung von PLZF beeinflusst werden. Wie in Kapitel 5.1 und 5.2 beschrieben sind die Zinkfinger 5-9 für die Bindung von Np9 und die Zinkfinger 1-9 für die Bindung an Rec zuständig. Um zu klären, ob die Bindung von Rec und Np9 zu PLZF von der Azetylierung abhängig ist, wurde PLZF in zwei unterschiedlichen *in vitro* Systemen transkribiert, translatiert und mit ³⁵S markiert. Auf der einen Seite wurde das Kaninchenretikulozyten-*in-vitro*-System benutzt, bei diesem werden die Lysinreste azetyliert und auf der anderen Seite wurde das Weizenkeim-*in-vitro*-System genutzt. Hierbei bleiben die Lysinreste nicht azetyliert. Die bakteriell exprimierten Proteine Np9 und Rec wurden mit den PLZF Proteinen inkubiert und komplexierte PLZF- Proteine konnten nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Belichtung des Röntgenfilms detektiert werden. Wie in Abbildung 4.8 zu sehen ist, binden Np9 als auch Rec in gleichem Maße an das azetylierte wie an das unazetylierte PLZF. Guidez et al. (2005) beschreibt, dass die Azetylierung der Zinkfinger 6 und 9 notwendig sind für eine effiziente DNA-Bindung und die damit von PLZF vermittelte Repression, da aber Rec als auch Np9 in der Lage sind an nicht azetyliertes PLZF zu binden unterstreicht dies die Stärke, die Spezifität und Wichtigkeit der Bindung der Proteine zueinander.

5.4 Funktionelle Interaktion zwischen Rec/Np9 und PLZF

Nachdem wir wussten, dass die Proteine Rec und Np9 spezifisch aneinander binden, stellte sich die Frage, ob Rec als auch Np9 einen Einfluss auf die Funktion von PLZF haben. Von PLZF ist bekannt, dass es als Tumorsuppressor und als Transkriptionsrepressor fungiert. Neben den vielen Genen wie z.B. Cyclin A2 und HoxD11 ist seit 2003 bekannt, dass auch der Promotor des Proto-Oncogens *c-myc* von PLZF reprimiert und daher direkt die Expression des c-Myc Proteins inhibiert wird (Barna et al., 2000; McConnell et al., 2003). Mc Connell et al. (2003) konnten zeigen, dass aufgrund der direkten Bindung von PLZF an den Transkriptionsfaktor *c-myc*, dessen Expression bis zu 70 % reprimiert wird (Abb. 4.9). Die Repression findet allerdings nur statt, wenn der *c-myc* Promotor eine intakte PLZF Bindungsstelle hat. C-Myc gehört zu der Gruppe der Proto-Onkogene, die durch eine Mutation eine Entartung der Zellen bewirken können. Die Aktivität des *c-myc* Gens beeinflusst Zellzyklus, Zellwachstum und Apoptose in Vertebratenzellen (Patel et al., 2004).

Daher war es von Bedeutung, welchen Einfluss Rec als auch Np9 auf den intakten *c-myc* Promotor in Anwesenheit von PLZF haben könnten. Mit Hilfe des Luziferase Assays waren wir auch in der Lage die Repression auf den *c-myc* Promotor zu zeigen. Wurden aber in den Luziferase Ansätzen PLZF und Np9 oder PLZF und Rec kotransfiziert, wurde die 70%-ige Repression von *c-myc* aufgehoben. Die Interaktion von PLZF zu Rec bzw. die Interaktion von PLZF zu Np9 hebt die Funktion von PLZF als Repressor des Promotors des Proto-Oncogens *c-myc* auf. Dies resultiert in einer Überproduktion von c-Myc, des Transkriptionsfaktors und Induzierers des Zellwachstums und der Proliferation.

PLZF führt in „knockout“ Mäusen zu testikulären Dysfunktionen und Fehlfunktionen in der Selbsterneuerung der Stammzellen (Barna et al., 2000; Buass et al., 2004; Costaya et al., 2004). Daher könnte man spekulieren, dass Rec und auch Np9 als Oncoproteine fungieren, indem sie PLZF inhibieren. Mehr als ein Viertel aller Gene der B-lymphoiden Linie werden aufgrund der von PLZF vermittelten veränderten c-Myc Expression beeinflusst (McConnell et al., 2003).

In den Luziferase Assays konnte man die Aufhebung der von PLZF ausgelösten *c-myc* Repression in Anwesenheit von Rec oder Np9 erkennen. Zur Unterstützung dieser Ergebnisse, wollten wir mit Hilfe der uns zur Verfügung stehenden Zelllinien U937:PLZF eine Zelllinie generieren, die in Lage ist, Rec bzw. Np9 stabil zu exprimieren. Wie in Abbildung 4.10 zu sehen ist, ist Np9 aufgrund seiner Instabilität nur nachweisbar, wenn die Zellen zuvor mit dem Proteaseinhibitor MG132 behandelt wurden. Allerdings wird die Expression von PLZF in Anwesenheit von MG132 unterdrückt. MG132 ist ein zytotoxischer Hemmstoff, der sich als Substrat-Analogon reversibel in das chymotrypsinähnliche katalytische Zentrum des 26S Proteasomenkomplexes einlagert und den Abbau zellulärer Proteine blockiert, d.h. es greift grundlegend in die zellulären Prozesse ein. Aus diesem Grund wurden die folgenden Versuche nur mit der Zelllinie durchgeführt, die stabil Rec exprimiert. In den verwendeten Zelllinien konnte man die Repression, die PLZF auf den Promotor von *c-myc* ausübt auch auf Proteinebene sehen. Darüber hinaus konnte man deutlich den Einfluss von Rec erkennen: in Anwesenheit von Rec ist eine signifikant höhere c-Myc Expression detektierbar (s. Abb. 5.3). Der Grund, dass *c-myc* auch bei einer Tetrazyklinmenge von 0,1 µg/ml bei der PLZF ausgeschaltet sein sollte, in einer geringeren Menge vorliegt als mit Rec, liegt sicherlich darin, dass immer noch eine Restmenge an PLZF in den Zellen nachweisbar ist.

Die genaue Funktion von c-Myc in den Zellen ist bislang noch nicht ausreichend verstanden. Es scheint aber eindeutig, dass c-Myc notwendig ist für den Eintritt der Zellen von der G0 Phase in den Zellzyklus. Außerdem ist c-Myc involviert in die Proliferation, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung (Patel et al., 2004). Obwohl man nicht alle Funktionen von c-Myc kennt, ist bekannt, dass das Protein an der Tumorgenese von Leukämie beteiligt ist (Dang et al., 1999; Nesbit et al., 1999). Da Rec in Keimzelltumoren exprimiert wird und es direkt an PLZF, dem *c-myc* Antagonist und Regulator der Keimzellendifferenzierung, bindet, deuten die Ergebnisse daraufhin, dass auch c-Myc eine Rolle in der Keimzelltumorgenese spielt.

5.5 Rec beeinflusst c-Myc regulierte Gene über PLZF

C-Myc übt seine verschiedenen biologischen Aktivitäten wie Proliferation, Wachstum oder Apoptose durch die Regulation von spezifischen Zielgenen aus. In den letzten Jahren wurden mittels Genchip-, SAGE- (serial analysis of gene expression) Analysen über 1000 potentielle c-Myc-Zielgene bekannt. Diese sind an den verschiedenen zellulären Stoffwechselprozessen und Signalwegen beteiligt sind, wie z.B. Aminosäure- und Proteinsynthese, Fettstoffwechsel, Nukleotid-/DNA-Synthese, Apoptose, Adhäsion und Zytoskelett, Transporter und Kanäle, Signaltransduktion und DNA-Reparatur. Da der Level an endogenem c-Myc in Anwesenheit von Rec und PLZF verändert wird, stellte sich die Frage, ob auch nachweislich *c-myc* regulierte Gene unter Einfluss von PLZF und Rec ein verändertes Expressionsmuster aufweisen. Der Tumorsuppressor P53, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), das in den Zellzyklus involviert ist und I κ B- α , das bei der Signaltransduktion eine Rolle spielt, sind 3 Gene, deren Expression von *c-myc* beeinflusst werden (Abb. 4.13). Allerdings zeigt sich der Expressionslevel dieser drei Gene auch in Anwesenheit von Rec und PLZF verändert. Neuere Arbeiten ergaben, dass c-Myc ungefähr 10% der Gene innerhalb des menschlichen Genoms bindet und möglicherweise deren Expression beeinflusst (Fernandez et al., 2003; Orian et al., 2003). Wie groß die Anzahl der indirekt regulierten Zielgene ist, kann man nur abschätzen. Eine ausführliche Genliste ist auf der Datenbank der Webseite www.myccancergene.org beschrieben. Den Einfluss den Rec über PLZF auf die Expression von c-Myc vermittelt, hat wie man an den 3 Beispielen P53, PCNA und I κ B- α sehen kann, auch Konsequenzen für die Zielgene von *c-myc*. Ein anderes Tumorsuppressorprotein, das von *c-myc* inhibiert wird, ist BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1). BRCA1 interagiert mit einer Domäne von c-Myc und interferiert so wahrscheinlich auch mit der Myc/Max Dimerisierung (Wang et al., 1998). Die Inaktivierung von BRCA1 hat ein erhöhtes Risiko für Brust- und Eierstockkrebs zur Folge und wird in Verbindung mit der familiären Vererbung dieser Krebsarten gebracht (Arver et al., 2000). Ob die Inaktivierung von BRCA1 die Tumorentstehung von c-Myc, das bei der Progression dieser Tumoren eine signifikante Rolle spielt, fördert,

bleibt zu untersuchen. Aber es ist ein weiterer Hinweis, dass c-Myc an der Entstehung von Keimzelltumoren eine Rolle spielen könnte, genau wie Rec und Np9, das in mehr als 50% der untersuchten Brustkrebsfälle nachgewiesen werden konnte.

Bis heute ist *c-myc* allerdings noch nicht in diesem Kontext in Zusammenhang gebracht worden. Eine klinische Studie hat gezeigt, dass der Level von c-Myc in acht Seminomen unverändert blieb und nur in einem von 12 Seminomen angestiegen war (Schmidt et al., 1997). Allerdings werden Translokationen von *c-myc* in vielen Tumoren gefunden. Eine Überexpression von c-Myc in Folge eines putativen Rec/Np9-PLZF-c-myc Pathway könnte in Zellen transient vorliegen.

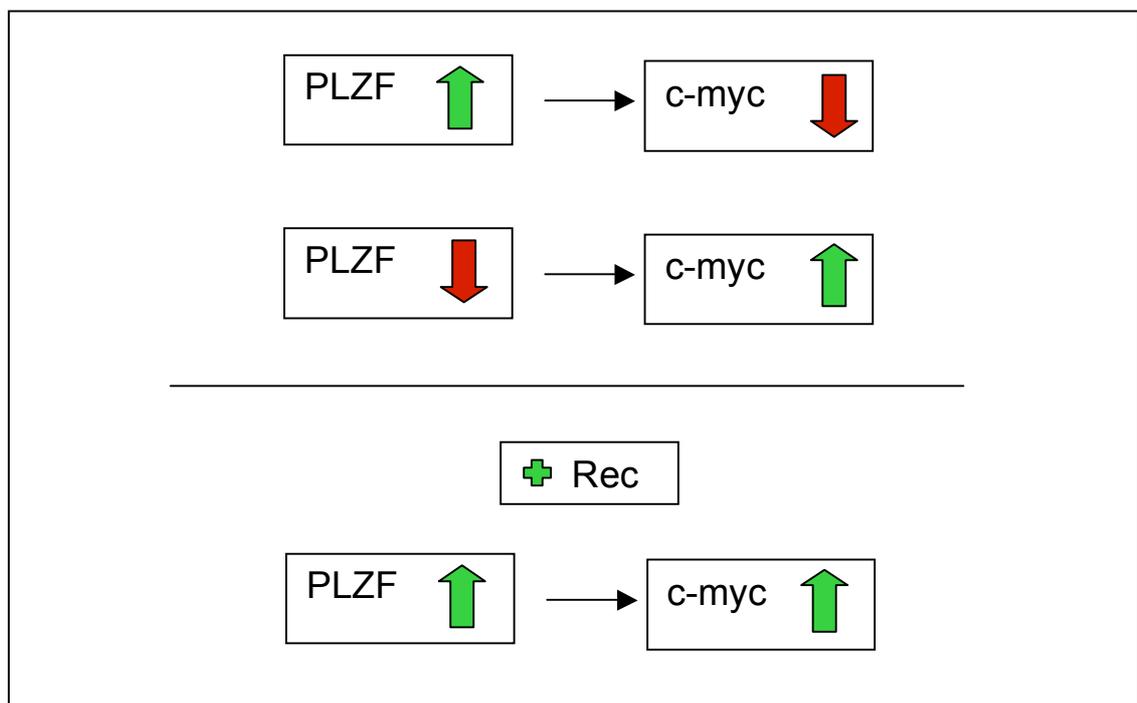


Abb. 5.3: Schematische Zusammenfassung der Expressionslevel von c-Myc in Anwesenheit von PLZF und von PLZF und Rec. Im oberen Teil der Abbildung ist der veränderte Expressionslevel von c-Myc in An- und Abwesenheit von PLZF zu erkennen. Die grünen Pfeile deuten einen Expressionsanstieg an und die roten Pfeile einen Abstieg. Im unteren Teil ist der veränderte c-Myc Level in Anwesenheit von PLZF und Rec (grünes Plus) dargestellt.

5.6 Zellproliferation und Apoptose in Abhängigkeit von der Rec Expression

Im Gegensatz zu der proapoptotischen Rolle von PLZF in der Ausbildung der Extremitäten, scheint PLZF bei der Testisreifung antiapoptotisch zu wirken (Barna et al., 2000). PLZF negative Mäuse zeigen eine erhöhte Apoptoserate in den Zellen der Seminiferi Tubuli. In diesen findet die Reifung der Spermatozyten statt. Da der genaue Apoptose-Mechanismus, der von PLZF ausgelöst wird noch nicht verstanden ist, kann man davon ausgehen, dass die Rolle von PLZF vom Kontext abhängig ist. Daher war es auch interessant, die Apoptoserate als auch die Wachstumsrate der Zelllinie U937:PLZF in An- und Abwesenheit von Rec zu untersuchen. Eine erhöhte Menge an PLZF führt zu einer reduzierten Proliferationsrate und zu einer erhöhten Apoptoserate in Abwesenheit von Rec. In Anwesenheit von Rec und PLZF kommt es zu einem gesteigerten Zellwachstum und einer reduzierten Apoptoserate. Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt werden konnte, ist Rec in der Lage, den von PLZF reduzierten c-Myc Level auszugleichen. Eine Hauptfunktion von c-Myc ist die Progression des Zellzyklus zu fördern (Dang, 1999; Amati, 2001). In ruhenden Zellen ist die Expression von c-Myc kaum nachweisbar. Nach Stimulation jedoch werden die *c-myc* RNA und das c-Myc Protein sofort stark induziert und die Zellen treten in die G1-Phase des Zellzyklus ein. Ist das c-Myc Protein nicht mehr detektierbar, arretieren die Zellen (Coller et al., 2000; Guo et al., 2000; Schuhmacher et al., 2001; Fernandez et al., 2003). C-Myc „Knockout“ Mäuse sterben am Tag 9,5-10,5 der embryonalen Entwicklung, was die entscheidende Rolle vom *c-myc* für das Überleben des Embryos ab dieser Zeit beschreibt (Davis et al., 1993). Somit könnte ein möglicher Weg über den Rec eine veränderte Apoptose- und Proliferationsrate auslöst, über PLZF/c-Myc sein.

5.7 Rec und Np9 assoziieren mit dem humanen Spleißfaktor 61K

In vorangegangenen Arbeiten wurde in unserer Arbeitsgruppe von Frau Yuzuh Tang eine humane Testis cDNA-Bank durchmustert und das 61K Protein als zellulärer Interaktionspartner von Rec identifiziert. Das 61K Protein ist ein humaner Spleißfaktor, der für die Bildung von tri-snRNP Komplexen in Spleißosom benötigt wird (Makarova et al., 2002). Sobald in einem Allel des für 61K kodierenden Gens PRPF31 Substitutionen, Insertionen oder Deletionen auftauchen, wird dieses mit der dominant autosomal vererbten Erkrankung *retinitis pigmentosa* (adRP) in Zusammenhang gebracht. Mit Hilfe eines Datenbankabgleichs konnte festgestellt werden, dass der zentrale Abschnitt des PRPF31 Gens homolog ist zu dem durch die SEREX-Methode (*serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries*) identifizierten Brustkrebsantigen NY-BR-99. Die kodierende Sequenz enthält ein Kernlokalisierungssignal (AS 17-34) und eine DNA-Bindungsstelle gefolgt von Leucin Zipper Motiven (bZIP, AS 1077-1104). Zusätzlich wurde eine Domäne identifiziert durch die Protein-Protein Interaktionen zustande kommen können, welche aus fünf Ankyrinen, die in Tandemwiederholungen vorliegen (AS 49-81; AS 82-114; AS 115-147; AS 148-180), besteht. Daher handelt es sich wahrscheinlich um einen Transkriptionsfaktor, der spezifisch im Brustgewebe exprimiert wird (Jäger et al., 2001). Dr. Uwe Galli führte während seiner Promotion erste Bindungsstudien zwischen Rec und dem 61K Protein durch, wobei er in GST-Pulldown-, Koimmunpräzipitations- und Kolo-kalisationsexperimenten die Interaktion der beiden Proteine bestätigen konnte (Promotion Uwe Galli, 2004). Um zu klären, ob Rec spezifisch mit NY-BR-99 interagiert, wurden verschiedene verkürzte Klone hergestellt. Die kleinste im Hefe-System verwendete Deletionsmutante (CB-Yu), die noch in der Lage war mit Rec zu interagieren, umfasst die N-terminalen 107 AS, wobei davon die ersten 80 AS ein Teil des Spleißfaktors 61K sind und die folgenden 27 AS zu NY-BR-99 gehören. Diese Klone wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 umkloniert mit ³⁵S markiert um sie im GST-Pulldown auf ihre Bindung zu Rec zu testen, allerdings war es nicht möglich die beiden Mutanten ausreichend zu markieren (Ergebnisse nicht gezeigt). Es war anzunehmen, dass sich die Markierung schwierig gestaltete, da in ersten 80

AS lediglich 4 Methionine und keine Cysteine und in den ersten 107 AS nur ein weiteres, also 5 Methionine, sind. Um für die Markierung ausreichend markierbare Methionine und Cysteine zur Verfügung zu stellen, wurden die beiden Klone am N-Terminus um die *gfp*-Sequenz verlängert. Rec war in der Lage an diese beiden Klone im GST-Pulldown zu binden. Was darauf hinweist, dass nicht nur die 27 AS, die zu dem NY-BR-99 gehören für die Bindung notwendig sind. Wie in Abbildung 4.17 zu sehen ist, war Rec in der Lage neben den N-terminalen Klonen auch an den Klon zu binden, der das komplette NY-BR-99 umfasst. Rec hat demnach zwei unabhängige Bindungsstellen an dem 61K-Protein. Es könnte somit nicht nur Einfluss auf NY-BR-99 nehmen, sondern auch auf die Vorgänge, für die 61 K beim Spleißen zuständig ist. NY-BR-99 wird spezifisch in Brustkrebsgewebe exprimiert. Aufgrund der strukturellen Merkmale vermutet man aber, dass es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt. In Patienten mit Brustkrebs wird gegen dieses Proteine eine Autoimmunreaktion ausgelöst (Jäger et al., 2001). Rec könnte durch die Interaktion mit 61 K zu Tumorgenese beitragen. Da aber Herr Dipl. Biol. Andreas Jungmann (AG Müller-Lantzsch) im Rahmen seiner Diplomarbeit untersuchte, wie weit das 61 K-Protein in Patienten mit Tumorerkrankungen, wie Mammakarzinomen oder Seminomen vorliegt und dabei zeigen konnte, dass weder Antikörper gegen das komplette noch den mittleren Teil, der NY-BR-88 entspricht, des 61K-Protein vorhanden waren, ist davon auszugehen, dass Rec eher durch die Interaktion mit dem 61K-Protein in dessen Funktion während des Spleißprozesses eingreift. Rec hat, funktionell gesehen, eine Homologie zu den HIV/HTLV kodierten akzessorischen Proteinen Rev/Rex, deren ursprüngliche Aufgabe darin besteht, ungespleißte und unvollständig gespleißte RNA vor der zellulären Spleißmaschinerie zu bewahren und diese in das Cytoplasma der Zelle transportieren um die ribosomale Translation zu ermöglichen. Eine Interaktion von Rec und 61 K könnte daher dazu führen, dass das Spleißen von Trankripten erschwert wird und unvollständige oder vollständige gespleißte virale Transkripte können so bevorzugt von Rec in das Cytoplasma transportiert und dort die Proteine translatiert werden.

Aufgrund der Assoziation des 61K Proteins mit dem Brustkrebsantigen NY-BR-99 und den ersten 44 Basenpaaren von Rec und Np9, das wiederum in über

50% von Brustkrebspatienten gefunden wurde, wurde auch die Interaktion von Np9 mit dem 61K Protein untersucht. Hierbei wurden zuerst die Kollokalisierung der beiden Proteine getestet. Hierzu wurden Cos-1 Zellen mit gleichen Mengen von 61K und Np9 kotransfiziert. Anhand der Abbildung 4.18 kann man deutlich erkennen, dass beide Proteine innerhalb des Zellkerns in distinkten Strukturen kollokalisieren. Von dem 61 K Protein ist bekannt, dass es sowohl in distinkten Strukturen als auch in den Cajal Bodies innerhalb des Zellkerns lokalisiert ist (Makarova et al., 2002). In den Cajal Bodies sind die snRNPs lokalisiert. Armbruster et al. (2002) konnte in konfokaler Laserscanning-Mikroskopie und in spezifischen Immunfluoreszenz-Analysen zeigen, dass Np9 spezifisch in den Nukleoli vorkommt. Von den Nukleoli ist bekannt, dass sie der Hauptort für die rRNA-Transkription und NAD-Synthese sind. Darüber hinaus sind sie ein Assoziationspunkt für verschiedene weitere Kernstrukturen wie die „speckles“ (oder SC35), die GEM's (*gemini of coiled bodies*) oder die Cajal Bodies. Diese Strukturen sind alle in Spleißereignisse der hnRNA zu mRNA involviert (Lamond und Earnshaw, 1998; Wang et al., 2002). Vor allem die Verbindung der Nukleoli mit den Cajal Bodies, in denen das 61K-Protein lokalisiert ist, erklärt die Kollokalisierung von Np9 und dem 61K-Protein.

Im Rahmen der Vorversuche konnte die Bindung zwischen dem Volllängenklon Np9 und dem kompletten 61K-Protein von Frau Dr. Vivienne Armbrüster in GST-Pulldown Versuchen gezeigt werden. Um die Bindungsstelle weiter einzugrenzen, wurden die zuvor schon eingesetzten Klone mit ³⁵S markiert und in GST-Pulldown Analysen auf Bindung untersucht. Wie in Abbildung 4.19 zu sehen ist, zeigt sich die Interaktion der beiden Proteine nicht nur von dem kompletten Np9 zu dem gesamten 61K Protein, sondern Np9 bindet auch an den Klon, der nur die Sequenz der Brustkrebsantigen NY-BR-99 umfasst. Im Gegensatz zu Rec ist Np9 nicht in der Lage an die N-terminalen Klone zu binden, was daraufhin deutet, dass die Bindung von Np9 eine andere Bedeutung und damit einen anderen funktionellen Einfluss haben könnte. Wie zuvor erwähnt war es nicht möglich Antikörper gegen das 61K-Protein in Patienten mit Seminomen und Mammakarzinomen zu finden, aber die Expression von 61K konnte auf RNA-Ebene in den Mammakarzinomzelllinien T47D, SKBR, PA-1 und MCF7 durch RT-PCR nachgewiesen werden. Weiterhin wurde 61K in Hela, Tera1, 293, 293gp,Raji, Cos-1 und in humanen

primären Fibroblasten transkribiert und auch translatiert, wie im Westernblot gezeigt werden konnte (Diplomarbeit, Andreas Jungmann). Auch Np9 RNA wurde z.B. in den transformierten Zelllinien Tera1, Pa1, MCF7, SKBR als auch in Hela, 293gp. Diese Verbindungen der beiden Proteine weisen daraufhin, dass Np9 über die Bindung mit 61K in die Tumorgenese eingreifen könnte. Um jedoch eine genaue Aussage über die funktionelle Assoziation treffen zu können, stehen noch die entsprechenden Versuche aus.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte die physische und funktionelle Interaktion zwischen den HERV-K(HML) Proteinen Rec und Np9 mit PLZF und die physische Bindung mit dem humanen Spleißfaktor 61 K gezeigt werden.

Boese et al. konnten die Bindung für PLZF und Rec mittels Yeast II Hybrid, Fluoreszenzanalysen und Koimmunpräzipitationen durchführen. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse weiter gefestigt werden und darüber hinaus die Bindung von PLZF auch zu Np9 nachgewiesen werden, als auch die Bindungsdomänen eingegrenzt werden. In GST-Pulldown-Analysen wurde gezeigt, dass PLZF mit seiner C-terminalen Zinkfingerdomäne an zwei unabhängige Bindungsstellen von Rec bindet: eine mittlere Domäne (AS 21-47) und eine C-Terminale Domäne, die die AS 89-105 umfasst. Eine Bindung an Np9 fand durch die letzten vier Zinkfinger von PLZF statt. Die Bindungsdomäne von PLZF auf Np9 befindet sich in der ersten NLS (AS 23-29). Die Interaktion von Np9 zu PLZF wurde weiter gefestigt in Fluoreszenzanalysen und in Koimmunpräzipitationen.

Eines der Zielgene von dem Transkriptionsrepressor PLZF ist *c-myc*. Mc Connell et al. (2003) konnten zeigen, dass aufgrund der direkten Bindung von PLZF an den Transkriptionsfaktor *c-myc*, dessen Expression bis zu 70 % reprimiert wird. PLZF bindet direkt an den Promotor von *c-myc*, solange dieser eine intakte PLZF Bindungsstelle aufweist, und inhibiert direkt die Expression des c-Myc Proteins (McConnell et al., 2003). Die Aktivität des Proto-Onkogens *c-myc* beeinflusst Zellzyklus, Zellwachstum und Apoptose in Vertebratenzellen (Patel et al., 2004). Es konnte dieses Ergebnis der Repression wiederholt werden und darüber hinaus gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Rec oder Np9 und PLZF diese Repression aufgehoben wird. Dieses Ergebnis konnte in Luziferase Assays als auch auf Proteinebene im Western Blot verifiziert werden. Weiterhin war es im Western Blot möglich, eine veränderte Expression der von c-Myc regulierten Gene p53, PCNA und IKB- α in Ab- und Anwesenheit von Rec und PLZF nachzuweisen.

In Anbetracht der Tatsache, dass c-Myc sowohl die Apoptose als auch die Proliferation beeinflusst, wurden U937:PLZF Zellen in An- und Abwesenheit von PLZF als auch Rec auf Apoptose- und Proliferationsrate getestet. Wie

bereits bekannt, konnten wir zeigen, dass die Apoptoserate in Anwesenheit von PLZF steigt und die Proliferationsrate sinkt (McConnell et al., 2003). In Anwesenheit von PLZF und Rec wurde die Apoptoserate als auch die Proliferationsrate ausgeglichen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Tumor assoziierten HERV-K Proteine Np9 und Rec an den Tumorsuppressor PLZF binden, dessen transkriptionelle Funktion hemmen und vermutlich einen Einfluss auf die Tumorenstehung haben.

In Vorversuchen konnte Frau Yutzu Tang einen weiteren Bindungspartner von Rec, der humane Spleißfaktor 61K identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindungsdomäne mittels GST Pulldown Experimenten weiter eingegrenzt. Die Ergebnisse ergaben, dass Rec in der Lage ist an einen N-terminalen als auch an einen mittleren Bereich des 61K Proteins zu binden. Np9 dagegen bindet nur an den mittleren Bereich des 61K Proteins. In Fluoreszenzanalysen wurde die Interaktion von Np9 zu dem 61K Protein verifiziert. Die Bedeutung der Bindung von Np9 und Rec an das 61K Protein ist bisher nicht bekannt und muss durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Adamah D.J.B., Gokhale P.J., Eastwood D.J., RAJPERT DE-MEYTS E., Goepel J., Walsh J.R., Moore H.D., Andrews P.W. (2006) Dysfunction of the mitotic:meiotic switch as a potential cause of neoplastic conversion of primordial germ cells. *Int J Androl.* **29**(1):219-27.
- Akopov, SB, Nikolaev, LG, Khil, PP, Lebedev, YB, Serdlov, ED (1998) Long terminal repeats of human endogenous retrovirus K family (HERV-K) specifically bind host cell nuclear proteins. *FEBS Lett.* **421**(3), 229-33
- Allman, D., Punt, J. A., Izon, D. J., Aster, J. C., and Pear, W. S. (2002). An invitation to T and more: notch signaling in lymphopoiesis. *Cell* **109** Suppl, S1-11.
- Amati B. (2001) Integrating Myc and TGF-beta signalling in cell-cycle control. *Nat Cell Biol.* **3**(5):E112-3.
- Andersson, M. L., Lindeskog, M., Medstrand, P., Westley, B., May, F., and Blomberg, J. (1999). Diversity of human endogenous retrovirus class II-like sequences. *J Gen Virol* **80** (Pt 1), 255-60.
- Armbruester V., Sauter M, Roemer K, Best B, Hahn S, Nty A, Schmied A, Philipp S, Mueller A, Mueller-Lantzsch N (2004). Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with LNX (ligand of Numb protein X). *J Virol* 2004 **78**(19),10310-9.
- Armbruester, V., Sauter, M., Krautkraemer, E., Meese, E., Kleiman, A., Best, B., Roemer, K., and Mueller-Lantzsch, N. (2002). A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res* **8**(6), 1800-7.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science* **268**(5208), 225-32.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**(5415), 770-6.
- Barbulescu, M., Turner, G., Seaman, M. I., Deinard, A. S., Kidd, K. K., and Lenz, J. (1999). Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr Biol* **9**(16), 861-8.
- Barbulescu, M., Turner, G., Su, M., Kim, R., Jensen-Seaman, M. I., Deinard, A. S., Kidd, K. K., and Lenz, J. (2001). A HERV-K provirus in chimpanzees, bonobos and gorillas, but not humans. *Curr Biol* **11**(10), 779-83.

- Barna M., Hawe N., Niswander L., and Padolfi P.P (2000). PLZF regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat. Genet.* **25** (2):166-172
- Bardwell V.J. and Teisman R. The POZ domain (1994): a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* **8** (14):1664-1677
- Baust, C., Seifarth, W., Germaier, H., Hehlmann, R., and Leib-Mosch, C. (2000). HERV-K-T47D-Related long terminal repeats mediate polyadenylation of cellular transcripts. *Genomics* **66**(1), 98-103.
- Beer, C., L. J., Andersen DS, Pedersen L (2004). *Retroviruses, Cold Spring Harbor, New York.*
- Berkhout, B., Jebbink, M., and Zsiros, J. (1999). Identification of an active reverse transcriptase enzyme encoded by a human endogenous HERV-K retrovirus. *J Virol* **73**(3), 2365-75.
- Bieche, I., Laurent, A., Laurendeau, I., Duret, L., Giovangrandi, Y., Frendo, J. L., Olivi, M., Fausser, J. L., Evain-Brion, D., and Vidaud, M. (2003). Placenta-specific INSL4 expression is mediated by a human endogenous retrovirus element. *Biol Reprod* **68**(4), 1422-9.
- Bieda, K., Hoffmann, A., and Boller, K. (2001). Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. *J Gen Virol* **82**(Pt 3), 591-6.
- Bishop C.B., McDonald W.H., Gould K.L. and Forsburg S.L. et al., (2000) Isolation of an essential *Schizosaccharomyces pombe* gene, prp31, that links splicing and meiosis. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2214-2220
- Blond, J. L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., Mandrand, B., Mallet, F., and Cosset, F. L. (2000). 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* **74**(7), 3321-9.
- Boese A., Galli U., Geyer M., Sauter M., Mueller-Lantzsch N. (2001) The Rev/Rex homolog HERV-K cORF multimerizes via a C-terminal domain. *FEBS Lett.* **493**(2-3):117-21.
- Boese, A., Sauter, M., Galli, U., Best, B., Herbst, H., Mayer, J., Kremmer, E., Roemer, K., and Mueller-Lantzsch, N. (2000). Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Oncogene* **19**(38), 4328-36.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., and Boyer, H. W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**(2), 95-113.

- Boller, K., Konig, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Lower, R., Lower, J., and Kurth, R. (1993). Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* **196**(1), 349-53.
- Brodsky, I., Foley, B., Haines, D., Johnston, J., Cuddy, K., and Gillespie, D. (1993). Expression of HERV-K proviruses in human leukocytes. *Blood* **81**(9), 2369-74.
- Bukrinsky, M. I., and Haffar, O. K. (1999). HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front Biosci* **4**, D772-81.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**(2), 195-203.
- Burge C.B., Tuschl T., Sharp P.A. (1999) Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp.525-560
- Buscher K., Trefzer U., Hofmann M., Sterry W., Kurth R. und Denner J. (2005). Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Research* **65**(10): 4172-80
- Caporale M., Cousens C., Centorame P., Pinoni C., De las Heras M.; Palmarini M. (2006) Expression of the jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein is sufficient to induce lung tumors in sheep. *J Virol.* **80**(16):8030-7
- Chaconas, G., and van de Sande, J. H. (1980). 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol* **65**(1), 75-85.
- Chan D.C., Fass D., Berger J.M., Kim P.S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* **89**(2):263-73
- Chen S.J., Zelent A., Tong J. H. , Yu H.Q., Wang Z.Y., Derre J., Berger R., Waxman S., and Chen Z. (1993) Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and Promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J.Clin.Invest* **91** (5):2260-2267
- Chen S.J., Wang Z.Y., and Chen Z. (1995) Acute promyelocytic leukemia: from clinic to molecular biology. *Stem Cells* **13** (1): 22-31

- Chen Z., Brand N.J., Chen A., Chen S.J., Tong J.H., Wang Z.Y., Waxman S., and Zelent A. (1993) Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with the acute promyelocytic leukemia. *EMBO J.* **12** (3): 1161-1167
- Chen Z., Guidez F., Rousselot P., Agadir A., Chen S.J., Wang Z.Y., Degos L., Zelent A., Waxman S., Chomienne C. (1994) PLZF-RAR alpha fusion proteins generated from the variant t(11;17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci* **1**; **91**(3):1178-82.
- Chen Z., Chen S.J., and Wang Z.Y. (1994) Retinoic acid and acute promyelocytic leukemia: a model of targeting treatment for human cancer. *C.R.Acad.Sci.III* **317**(12):1135-1141
- Chen Z., Tong J.H., Dong S., Zhu J., Wang ZY., Chen S.J. (1996) Retinoic acid regulatory pathways, chromosomal translocations, and acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* **15**(3):147-56
- Cheng G.X, Zhu x.H., Men X.Q., Wang L., Huang Q.H., Jin X.L., Xiong S.M., Zhu J., Guo W.M., Chen J.Q., Xu S.F., So E., Chan L.C., Waxman S., Zelent A., Chen G.Q., Dong S., Liu J.X., and Chen S.J.(1999) Distinct leukemia phenotypes in transgenic mice and different corepressor interactions generated by promyelocytic leukemia variant fusion genes *PLZF-RAR α* and *NPM-RAR α* . *Proc Natl Acad Sci* **25**;**96**(11):6318-23.
- Clerici, M., Fusi, M. L., Caputo, D., Guerini, F. R., Trabattoni, D., Salvaggio, A., Cazzullo, C. L., Arienti, D., Villa, M. L., Urnovitz, H. B., and Ferrante, P. (1999). Immune responses to antigens of human endogenous retroviruses in patients with acute or stable multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **99**(2), 173-82.
- Coffin JM, H., SH, Varmus HE (1997). "Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Coller H.A., Grandori C., Tamayo P., Colbert T., Lander E.S., Eisenman R.N., Golub T.R. (2000) Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **28**;**97**(7):3260-5.
- Conrad, B., Weissmahr, R. N., Boni, J., Arcari, R., Schupbach, J., and Mach, B. (1997). A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* **90**(2), 303-13.
- International human genome sequencing consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-922.

- Costas, J. (2001). Evolutionary dynamics of the human endogenous retrovirus family HERV-K inferred from full-length proviral genomes. *J Mol Evol* **53**(3), 237-43.
- Costoya, J. A., Hobbs, R. M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K. E., Wolgemuth, D. J., and Pandolfi, P. P. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* **36**(6), 653-9.
- Cowburn, D. (1997). Peptide recognition by PTB and PDZ domains. *Curr Opin Struct Biol* **7**(6), 835-8.
- Dam, T. K., Sarkar, M., Ghosal, J., and Choudhury, A. (1992). A novel galactosyl-binding lectin from the plasma of the blood clam, *Anadara granosa* (L) and a study of its combining site. *Mol Cell Biochem* **117**(1), 1-9.
- Dangel, A. W., Baker, B. J., Mendoza, A. R., and Yu, C. Y. (1995). Complement component C4 gene intron 9 as a phylogenetic marker for primates: long terminal repeats of the endogenous retrovirus ERV-K(C4) are a molecular clock of evolution. *Immunogenetics* **42**(1), 41-52.
- David G., Alland L., Hong S.H., Wong C.W., DePhino R.A., Dejean A. (1998) Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene* **14;16**(19):2549-56
- Davis A.C., Wims M., Spotts G.D., Hann S.R., Bradley A. (1993) A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev.* **7**(4):671-82.
- DeParseval N., Cassella J., Gressin L., Heidmann T. (2001) Characterization of the three HERV-H proviruses with an open envelope reading frame encompassing the immunosuppressive domain and evolutionary history in primates. *Virology.* **20;279**(2):558-69
- Dewannieux, M., Blaise S. und Heidmann T. (2005). Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. *J Virol* 2005 Dec; **79**(24): 15573-7
- Dho, S. E., French, M. B., Woods, S. A., and McGlade, C. J. (1999). Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem* **274**(46), 33097-104.
- Dho, S. E., Jacob, S., Wolting, C. D., French, M. B., Rohrschneider, L. R., and McGlade, C. J. (1998). The mammalian numb phosphotyrosine-binding domain. Characterization of binding specificity and identification of a novel PDZ domain-containing numb binding protein, LNX. *J Biol Chem* **273**(15), 9179-87.

- Dong S., Zhu J., Reid A., Strutt P., Guidez F., Zhong H.J., Wang Z.Y., Licht J., Waxman S., Chomienne C., Chen Z., Zelent A., Chen S.J. (1996) Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor-alpha fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(8):3624-9.
- Dugaiczyk, A., Boyer, H. W., and Goodman, H. M. (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* **96**(1), 171-84.
- Dyck, J. A., Maul, G. G., Miller, W. H., Jr., Chen, J. D., Kakizuka, A., and Evans, R. M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* **76**(2), 333-43.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**(2), 199-213.
- Etkind, P. R., Lumb, K., Du, J., and Racevskis, J. (1997). Type 1 HERV-K genome is spliced into subgenomic transcripts in the human breast tumor cell line T47D. *Virology* **234**(2), 304-8.
- Fackler, O. T., Kienzle, N., Kremmer, E., Boese, A., Schramm, B., Klimkait, T., Kucherer, C., and Mueller-Lantzsch, N. (1997). Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization. *Eur J Biochem* **247**(3), 843-51.
- Fernandez P.C., Frank S.r., Wang ., Schroeder M., Liu S., Greene J., Cocito A., Amati B. (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* **17**(9):1115-29.
- Farnet C.M., Haseltine W.A. (1991) Circularization of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. *J Virol.* **65**(12):6942-52
- Felicetti F., Bottero L., Fellini N., Mattia G., Labbaye C., Alvino E., Peschle C., Colombo M.P., Care A. (2004) Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene.* **3;23**(26):4567-76
- Fields BN, K. D., Howley PM (1996). "Virology." 3 ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, New York.
- Fogh, J., Fogh, J. M., and Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**(1), 221-6.
- Forsthoefel, P. (1958). The skeletal effects of the luxoid gene in the mouse including its interactions with luxate gene. *J. Morphol.* **102**, 247-287.

- Frendo, J. L., Olivier, D., Cheynet, V., Blond, J. L., Bouton, O., Vidaud, M., Rabreau, M., Evain-Brion, D., and Mallet, F. (2003). Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* **23**(10), 3566-74.
- Galli UM, Sauter M, Lecher B, Maurer S, Herbst H, Roemer K, Mueller-Lantzsch N Human endogenous retrovirus Rec protein induces germ cell tumors in mice. *zur Veröffentlichung eingereicht*.
- Gaudin, P., Ijaz, S., Tuke, P. W., Marcel, F., Paraz, A., Seigneurin, J. M., Mandrand, B., Perron, H., and Garson, J. A. (2000). Infrequency of detection of particle-associated MSR/HERV-W RNA in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **39**(9), 950-4.
- Giasson, B. I., and Lee, V. M. (2003). Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* **114**(1), 1-8.
- Gotzinger, N., Sauter, M., Roemer, K., and Mueller-Lantzsch, N. (1996). Regulation of human endogenous retrovirus-K Gag expression in teratocarcinoma cell lines and human tumours. *J Gen Virol* **77 (Pt 12)**, 2983-90.
- Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**(2), 456-67.
- Green, M. (1955). Luxoid, a new hereditary leg and foot abnormality in the house mouse. *J. Hered.* **46**, 91-99.
- Grignani F., De Matteis S., Nevi C., Tomassoni L., Gelmetti V., Ciocce M., Fanelli M., Ruthart M., Ferrara F.F., Zamir I., Seiser C., Grignani F., Lzar M.A., Minucci S., Pelicci P.G.(1998) Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*. **19;391**(6669):815-8
- Gross L. (1970) *Oncogenic Viruses*, Pergamon Press, Oxford, United Kingdom, 1970
- Guidez F., Huang W., Tong J.H., Dubois C., Balitrand N., Waxman S., Michaux J.L., Martiat P., Degos L., Chen Z., et al. (1994) Poor response to all-trans retinoic acid therapy in a t(11;17) PLZF/RAR alpha patient. *Leukemia*. **8**(2):312-7
- Guidez F., Howell L., Isalan M., Cebrat M., Alani R.M., Ivins S., Hormaeche L., McConnell M.J., Pierce S., Cole P.A., Licht J., Zelent A. (2005) Histone acetyltransferase activity of p300 is required for transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol Cell Biol*. **25**(13):5552-66.
- Guo Q.M., Malek R.L., Kim S., Chiao C., He M., Ruffy M., Sanka K., Lee N.H., Dang C.V., Liu E.T. (2000) Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res*. **1;60**(21):5922-8.

- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**(4), 791-803.
- Harris, B. Z., and Lim, W. A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* **114**(Pt 18), 3219-31.
- Haffar O., Dubrovsky L., Lowe R., Berro R., Kashanchi F., Godden J., Vanpouille C., Bajorath J., Bukrinsky M. (2005) Oxadiazols: a new class of rationally designed anti-human immunodeficiency virus compounds targeting the nuclear localization signal of the viral matrix protein. *J Virol.* **79**(20):13028-36
- Hata, Y., Nakanishi, H., and Takai, Y. (1998). Synaptic PDZ domain-containing proteins. *Neurosci Res* **32**(1), 1-7.
- Hatfield, D., and Oroszlan, S. (1990). The where, what and how of ribosomal frameshifting in retroviral protein synthesis. *Trends Biochem Sci* **15**(5), 186-90.
- Hawe N., Soares V., Niswander L., Cattoretti G., and Pandolfi, P.P. (1996) Targeted disruption of the PLZF gene of acute promyelocytic leukemia results in phocomelia and altered spermatogenesis. *Blood* **88**:291a
- Hayashi, T., Kageyama, Y., Ishizaka, K., Xia, G., Kihara, K., and Oshima, H. (2001). Requirement of Notch 1 and its ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. *J Androl* **22**(6), 999-1011.
- Hayashida, H., and Miyata, T. (1983). Unusual evolutionary conservation and frequent DNA segment exchange in class I genes of the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(9), 2671-5.
- He L.Z., Guidez F., Tribioli C., Peruzzi D., Ruthard M., Zelent A., Pandolfi P.P. (1998) Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet.* **18**(2):126-35
- Herbst, H., Sauter, M., Kuhler-Obbarius, C., Loning, T., and Mueller-Lantsch, N. (1998). Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in germ cell and trophoblastic tumours. *Apmis* **106**(1), 216-20.
- Herbst, H., Sauter, M., and Mueller-Lantsch, N. (1996). Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. *Am J Pathol* **149**(5), 1727-35.
- Herna R.G. and Saksela K. (2000) Interactions of HIV-1 NEF with cellular signal transducing proteins. *Front Biosci.* **5**, D268-D283

- Hildinger, M., Dittmar, M. T., Schult-Dietrich, P., Fehse, B., Schnierle, B. S., Thaler, S., Stiegler, G., Welker, R., and von Laer, D. (2001). Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J Virol* **75**(6), 3038-42.
- Hoatlin M.E., Zhi Y., Ball H., Silvey K., Melnick A., Stone S., Arai S., Howe N., Owen G., Zelent A., Licht J.D. (1999) A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood*. **1;94**(11):3737-47
- Hong S.H., David G., Wong C.W., Dejean A., Privalsky M.L.(1997) SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **19;94**(17):9028-33
- Holmes, D. S., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**(1), 193-7.
- Hsieh, J. J., Zhou, S., Chen, L., Young, D. B., and Hayward, S. D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1), 23-8.
- Hughes, D. C. (2001). Alternative splicing of the human VEGFR-3/FLT4 gene as a consequence of an integrated human endogenous retrovirus. *J Mol Evol* **53**(2), 77-9.
- Hughes, J. F., and Coffin, J. M. (2004). Human endogenous retrovirus K solo-LTR formation and insertional polymorphisms: implications for human and viral evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(6), 1668-72.
- Hung, A. Y., and Sheng, M. (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* **277**(8), 5699-702.
- Hyman J., Chen H., Di Fiore P.P. De camilli P., Brunger A.T. (2000) Epsin 1 undergoes nucleocytoplasmic shuttling and its eps15 interactor NH(2)-terminal homology (ENTH) domain, structurally similar to Armadillo and HEAT repeats, interacts with the transcription factor promyelocytic leukemia Zn(2)+ finger protein (PLZF). *J Cell Biol*. **1;149**(3):537-46
- Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J., and Varmus, H. E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**(6153), 280-3.
- Jager, D., Stockert, E., Gure, A. O., Scanlan, M. J., Karbach, J., Jager, E., Knuth, A., Old, L. J., and Chen, Y. T. (2001). Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. *Cancer Res* **61**(5), 2055-61.

- Judge, S. M., and Chatterton, R. T., Jr. (1983). Progesterone-specific stimulation of triglyceride biosynthesis in a breast cancer cell line (T-47D). *Cancer Res* **43**(9), 4407-12.
- Kitamura, Y., Ayukawa, T., Ishikawa, T., Kanda, T., and Yoshiike, K. (1996). Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *J Virol* **70**(5), 3302-6.
- Knoss M., Lower R., and Lower J. (1999) Expression of the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K is enhanced by cellular transcription factor YY1. *J Virol.* **73** (2):1254-1261
- Komurian-Prade F., Paranhos-Baccala G., Bedin F., Ounanian-Paraz A., Sodoyer M., Ott C., Rajoharison A., Garcia E., Malleet F., Mandrand B., Perron H. (1999) Molecular cloning and characterization of MSRV-related sequences associated with retrovirus-like particles. *Virology.* **20;260**(1):1-9
- Krämer A.(1996) The structure and functions of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev.Biochem.*, **65**, 367-409
- Krausslich, H. G., and Welker, R. (1996). Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 25-63.
- Kushner (1979). "An improved method for transformation of Escherichia coli with coli-derived plasmids." Genet. Eng. (N. S. Boyer B, Ed.) Elsevier, Amsterdam.
- Labbaye C., Quaranta M.T., Pagliuca A., Militi S., Licht J.D., Testa U., Peschle C. (2002) PLZF induces megakaryocytic development, activates Tpo receptor expression and interacts with GATA1 protein. *Oncogene.* **26;21**(43):6669-79
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Lamond, A. I., and Earnshaw, W. C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* **280**(5363), 547-53.
- Landry, J. R., Rouhi, A., Medstrand, P., and Mager, D. L. (2002). The Opitz syndrome gene Mid1 is transcribed from a human endogenous retroviral promoter. *Mol Biol Evol* **19**(11), 1934-42.
- Lau, A. G., and Hall, R. A. (2001). Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ domains: differential regulation by association with receptor carboxyl-termini and by phosphorylation. *Biochemistry* **40**(29), 8572-80.
- Lederberg, E. M., and Cohen, S. N. (1974). Transformation of Salmonella typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **119**(3), 1072-4.

- Lee, D. H., and Goldberg, A. L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**(10), 397-403.
- Leib-Mosch, C., and Seifarth, W. (1995). Evolution and biological significance of human retroelements. *Virus Genes* **11**(2-3), 133-45.
- Lewis, P. F., and Emerman, M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* **68**(1), 510-6.
- Li J.Y., English M.A., Ball H.J., Yeyati P.L., Waxman S., Licht J.D. (1997) Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem.* **272**(36):22447-55
- Limjoco T.I., Dickie P., Ikeda H., Silver J. (1993) Transgenic Fv-4 mice resistant to Friend virus. *J Virol.* **67**(7):4163-8
- Lin R.J., Nagy L., Inoue S., Shao W., Miler W.H.Jr, Evans R.M. (1998) Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature.* **391**(6669):811-4
- Lower, R. (1999). The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *Trends Microbiol* **7**(9), 350-6.
- Lower, R., Boller, K., Hasenmaier, B., Korbmacher, C., Muller-Lantzsch, N., Lower, J., and Kurth, R. (1993). Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(10), 4480-4.
- Lower, R., Lower, J., Frank, H., Harzmann, R., and Kurth, R. (1984). Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J Gen Virol* **65 (Pt 5)**, 887-98.
- Lower, R., Tonjes, R. R., Korbmacher, C., Kurth, R., and Lower, J. (1995). Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J Virol* **69**(1), 141-9.
- Makarova O.V., Makarov E.M., Liu S., Vornlocher H.P., Luhrmann R. (2002) Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **21**(5):1148-57
- Mangeny M. and Heidmann T. (2001) Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A* **95** (25):14920-14925
- Marguerat S., Wang W.Y., Todd J.A., Conrad B. (2004) Association of human endogenous retrovirus K-18 polymorphisms with type 1 diabetes. *Diabetes.* **53**(3):852-4

- Mayer, J., Meese, E., and Mueller-Lantzsch, N. (1998). Human endogenous retrovirus K homologous sequences and their coding capacity in Old World primates. *J Virol* **72**(3), 1870-5.
- Mayer, J., Sauter, M., Racz, A., Scherer, D., Mueller-Lantzsch, N., and Meese, E. (1999). An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nat Genet* **21**(3), 257-8.
- McConnell M.J., Chevallier M.J., Berkofsky-Fessler W., Giltane J.M., Malani R.B., Staudt L.M., Licht J.D. (2003) Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol Cell Biol.* **23**(24):9375-88
- McGill, M. A., and McGlade, C. J. (2003). Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* **278**(25), 23196-203.
- Medstrand, P., and Blomberg, J. (1993). 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* **67**(11), 6778-87.
- Medstrand, P., Lindeskog, M., and Blomberg, J. (1992). Expression of human endogenous retroviral sequences in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals. *J Gen Virol* **73** (Pt 9), 2463-6.
- Medstrand, P., and Mager, D. L. (1998). Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family. *J Virol* **72**(12), 9782-7.
- Meese E., Gottert E., Zang K.D., Sauter M., Schommer S., Mueller-Lantzsch N. (1996) Human endogenous retroviral element k10 (HERV-K10): chromosomal localization by somatic hybrid mapping and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet* **72**(1):40-2
- Melnick A., Fruchtman S., Zelent A., Liu M., Huang Q., Boczkowska B., Calasanz M., Fernandez A., Licht J.D., Najfeld V. (1999) Identification of novel chromosomal rearrangements in acute myelogenous leukemia involving loci on chromosome 2p23, 15q22 and 17q21. *Leukemia.* **13**(10):1534-8
- Melnick A., Ahmad K.F., Arai A., Polinger A., Ball H., Borden K.L., Carlile G.W., Prive G.G., Licht J.D. (2000) In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional functions. *Mol Cell Biol.* **20**(17):6550-67.
- Melnick A., Licht J.D. (1999) Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* **93**(10):3167-215

- Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G. M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X. Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J. C., Jr., and McCoy, J. M. (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* **403**(6771), 785-9.
- Modrow S, F. D. (2003). "Molekulare Virologie." Spektrum, Akad. Verlag.
- Mueller-Lantzsch, N., Sauter, M., Weiskircher, A., Kramer, K., Best, B., Buck, M., and Grasser, F. (1993). Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**(4), 343-50.
- Nesbit C.E., Grove L.E.; Yin X., Prochownik E.V. (1999) Differential apoptotic behaviors of c-myc, N-myc, and L-myc oncoproteins. *Cell Growth Differ.* **9**(9):731-41.
- Nie, G. Y., Li, Y., Minoura, H., Batten, L., Ooi, G. T., Findlay, J. K., and Salamonsen, L. A. (2003). A novel serine protease of the mammalian HtrA family is up-regulated in mouse uterus coinciding with placentation. *Mol Hum Reprod* **9**(5), 279-90.
- Nie, J., Li, S. S., and McGlade, C. J. (2004). A novel PTB-PDZ domain interaction mediates isoform-specific ubiquitylation of mammalian Numb. *J Biol Chem* **279**(20), 20807-15.
- Nie, J., McGill, M. A., Dermer, M., Dho, S. E., Wolting, C. D., and McGlade, C. J. (2002). LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation. *Embo J* **21**(1-2), 93-102.
- Nilsen T.W.(1998) RNA-RNA interactions in nuclear pre mRNA splicing. In Simons, R.W. an dGrunberg-Manago, M. (eds.), *RNA Structure and Fiction*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp.279-307
- Ogg, C.S., and Lamond, A.I. (2002) Cajal bodies and coilin - moving towards function. *Journal of Cell Biology* **1**, 17-21
- Ohno M, F. M., Mattaj IW (1998). Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* **92**, 327-336.
- Ono, M., Yasunaga, T., Miyata, T., and Ushikubo, H. (1986). Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* **60**(2), 589-98.
- Orian A., van Steensel B., Delrow J., Bussemaker H.J., Li L., Sawado T., Williams E., Loo L.W., Cowley S.M., Yost C., Pierce S., Edgar B.A., Parkhurst S.M., Eisenman R.N. (2003) Genomic binding by the Drosophila Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev.* **1**;17(9):1101-14.

- Perron H., Jouvin-Marche E., Michel M., Ounanian-Paraz A., Camelo O., Dumon A., Jolivet-Reynaud C., Marcel F., Souillet Y., Borel E., Gebuhrer L., Santoro L., Marcel S., Seigneurin J.M., Marche P.N., Lafon M. (2001) Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology*. **1;287**(2):321-32.
- Patel J.H., Loboda A.P., Showe M.K., Showe L.C., McMahon S.B. (2004) Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer*. **4**(7):562-8.
- Ravnik S.E., Wolgemuth D.J. (1996) The developmentally restricted pattern of expression in the male germ line of a murine cyclin A, cyclin A2, suggests roles in both mitotic and meiotic cell cycles. *Dev Biol*. **10**;173(1):69-78.
- Ravnik S.:E, Wolgemuth D.J. (1999) Regulation of meiosis during mammalian spermatogenesis: the A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases are differentially expressed in the germ-cell lineage. *Dev Biol*. **207**(2):408-18.
- Reid A., Gould A., Brand N., Cook M., Strutt P., Li J., Licht J., Waxman S., Krumlauf R., and Zelent A.(1995) Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood* **86** (12):4544-4552
- Sakalian, M., and Hunter, E. (1998). Molecular events in the assembly of retrovirus particles. *Adv Exp Med Biol* **440**, 329-39.
- Sauter, M., Roemer, K., Best, B., Afting, M., Schommer, S., Seitz, G., Hartmann, M., and Mueller-Lantzsch, N. (1996). Specificity of antibodies directed against Env protein of human endogenous retroviruses in patients with germ cell tumors. *Cancer Res* **56**(19), 4362-5.
- Sauter, M., Schommer, S., Kremmer, E., Remberger, K., Dolken, G., Lemm, I., Buck, M., Best, B., Neumann-Haefelin, D., and Mueller-Lantzsch, N. (1995). Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J Virol* **69**(1), 414-21.
- Schommer, S., Sauter, M., Krausslich, H. G., Best, B., and Mueller-Lantzsch, N. (1996). Characterization of the human endogenous retrovirus K proteinase. *J Gen Virol* **77 (Pt 2)**, 375-9.
- Schommer, S. (1996). Charakterisierung der Proteine, die vom Protease und Reverse Transkriptase homologen offenen Leserahmen des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K) kodiert werden. Dissertation, Universität des Saarlandes

- Schuhmacher M., Kohlhuber F., Holzel M., Kaiser C., Burtscher H., Jarsch M., Bornkamm G.W., Laux G., Polack A., Weidle U.H., Eick D. (2001) The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res.* **15;29(2)**:397-406.
- Sitterlin D., Tiollais P., and Transy C.(1997) The RAR alpha-PLZF chimera associated with Acute Promyelocytic Leukemia has retained a squenece-specific DNA-binding domain. *Oncogene* **14 (9)**:1067-1074
- Staley J.P. and Guthrie C. (1988) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs and things. *Cell.* **92**, 315-326
- Sugimoto, J., Matsuura, N., Kinjo, Y., Takasu, N., Oda, T., and Jinno, Y. (2001). Transcriptionally active HERV-K genes: identification, isolation, and chromosomal mapping. *Genomics* **72(2)**, 137-44.
- Sweeney C., Murphy M., Kubelka M., Ravnik S.E., Hawkins C.F., Wolgemuth D.J., Carrington M. (1996) A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Development.* **122(1)**:53-64
- Tonjes, R. R., Czauderna, F., and Kurth, R. (1999). Genome-wide screening, cloning, chromosomal assignment, and expression of full-length human endogenous retrovirus type K. *J Virol* **73(11)**, 9187-95.
- Tonjes, R. R., Limbach, C., Lower, R., and Kurth, R. (1997). Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in insect and mammalian cells. *J Virol* **71(4)**, 2747-56.
- Tonjes, R. R., Lower, R., Boller, K., Denner, J., Hasenmaier, B., Kirsch, H., Konig, H., Korbmacher, C., Limbach, C., Lugert, R., Phelps, R. C., Scherer, J., Thelen, K., Lower, J., and Kurth, R. (1996). HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **13 Suppl 1**, S261-7.
- Turner, G., Barbulescu, M., Su, M., Jensen-Seaman, M. I., Kidd, K. K., and Lenz, J. (2001). Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* **11(19)**, 1531-5.
- Vithana E.N. et al. (2001) A human homolog of yeast pre m_RNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol.Cell.* **8**,375-381, 2001
- Wang-Johanning F., Frost A.R., Johanning G.L., Khazaeli M.B., LoBuglio A.F., Shaw D.R., Strong T.V. (2001) Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* **7(6)**:1553-60
- Wang-Johanning F., Frost A.R., Jian B., Epp L., Lu D.W., Johanning G.L. (2003) Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene.* **13;22(10)**:1528-35.

- Ward J.O., McConnell M.J., Carlile G.W., Pandolfi P.P., Licht J.D., and Freedman L.P.(2001) The acute promyelocytic leukemia-associated protein, promyelocytic leukemia zinc finger, regulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced monocytic differentiation of U937 cells through a physical interaction with vitamin D₃ receptor. *Blood*, **12**, pp. 3290-3300
- Weijzen, S., Rizzo, P., Braid, M., Vaishnav, R., Jonkheer, S. M., Zlobin, A., Osborne, B. A., Gottipati, S., Aster, J. C., Hahn, W. C., Rudolf, M., Siziopikou, K., Kast, W. M., and Miele, L. (2002). Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med* **8**(9), 979-86.
- Weiss, R. (1984). The search for human RNA-tumor viruses. 2 ed. *In* "RNA-tumor viruses" (N. T. R Weiss, H Varmus, J Coffin, Ed.), pp. 1205-1281. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Wilkinson DA, M. D., Leong JAC (1994). Endogenous human Retroviruses. *In* "The Retroviridae" (L. JA, Ed.), Vol. 3. Pleunum Press, New York.
- Xie, Y., Zhao, W., Wang, W., Zhao, S., Tang, R., Ying, K., Zhou, Z., and Mao, Y. (2001). Identification of a human LNX protein containing multiple PDZ domains. *Biochem Genet* **39**(3-4), 117-26.
- Yang, J., Bogerd, H. P., Peng, S., Wiegand, H., Truant, R., and Cullen, B. R. (1999). An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23), 13404-8.
- Yeyati P.L., Shaknovich R., Boterashvili S., Li J., Ball H.J., Waxman S., Nason-Burchenal K., Dmitrovsky E., Zelent A., Licht J.D. (1999) Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene*. **18**(4):925-34.
- Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T. H., and Essex, M. (1992). The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol* **66**(8), 4966-71.
- Zelent A., Guidez F., Melnick A., Waxman S., Licht J.D. (2001) Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. **29**;20(49):7186-203.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Miriam Denne
Anschrift	Spiesermühle 5 66583 Spiesen
Telefon	0177/5523325
Familienstand	ledig
Geboren am	25.05.1976 in St.Ingbert

Schulischer Werdegang

1982 – 1986	Grundschule, Spiesen
1986 – 1993	Albertus-Magnus Gymnasium, St.Ingbert
1993 – 1997	Leibniz Gymnasium, St.Ingbert Abschluss: Abitur

Studium

1997-2003 Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes

Thema der Diplomarbeit	„Die <i>in vivo</i> Translokation des HDEL-Rezeptors <i>erd2p</i> in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> “ angefertigt am Institut für angewandte Molekularbiologie Abschluss: Diplom Biologin
------------------------	---

seit Februar 2004	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Uniklinikum des Saarlandes-Institute für Infektionsmedizin Fachbereich: Virologie
-------------------	---