

1 EINLEITUNG

1.2 Viren

Erst seit etwas mehr als 100 Jahren sind Viren als eigene biologische Einheiten bekannt. Beschreibungen von Viruserkrankungen sind jedoch sehr viel älter, ebenso wie die ersten beschriebenen Behandlungsmethoden. Viren haben sich während der Evolution in Millionen von Jahren entwickelt. Ihr Ursprung und ihre Entwicklung sind eng mit der Evolution von Einzellern, Pflanzen, Tieren und Menschen verbunden.

Da Viren weder für eine eigene Proteinbiosynthesemaschinerie (Ribosomen) noch für Energie bildende Stoffwechselsysteme codieren, gelten Viren als intrazelluläre Parasiten, welche auf eine Wirtszelle angewiesen sind. Außerhalb lebender Zellen sind Viren vermehrungsunfähig und biologisch inaktiv. Im Laufe der Evolution haben Viren unterschiedliche Strategien entwickelt, die Wirtszelle zu infizieren und sich deren Proteinsynthese und Replikationszyklus zu nutze zu machen. Sie sind also in der Lage, zelluläre Prozesse umzusteuern und für den optimalen Ablauf ihrer Vermehrung zu modifizieren.

Viren existieren in verschiedenen Zustandsformen, dabei unterscheidet man den replikationsaktiven Zustand und den Latenzzustand. Im Latenzzustand wird die virale Erbinformation entweder in das Wirtszellgenom integriert oder in extrachromosomler Form als Episom in der infizierten Zelle erhalten.

Die infektiösen Viruspartikel bezeichnet man als Virionen, welche aus unterschiedlichen Grundelementen bestehen. Die etwa 15 nm bis 400 nm großen Partikel setzen sich aus Proteinen zusammen, welche bei einigen Typen von einer Lipidmembran (Envelope) umgeben sind. Des Weiteren enthalten Virionen abhängig vom Virustyp nur eine Art von Nukleinsäure, entweder DNA oder RNA, welche als Einzel- oder Doppelstrang vorliegt. Diese Nukleinsäure kann linear, ringförmig oder segmentiert sein.

Das Genom ist mit zellulären Histonen oder viralen Proteinen komplexiert und liegt damit als Nukleokapsid vor. Dieser Nukleinsäure- Protein- Komplex kann von einem Kapsid, welches aus partikulären Proteinstrukturen besteht,

umgeben sein. Diese Kapside sind sphärische oder stäbchenförmige Gebilde. Zusätzlich zu der Erbinformation für die Strukturkomponenten, besitzen Viren Gene für regulatorisch aktive Proteine und Enzyme.

Je nach Virustyp kann die Infektion für die Wirtszelle unterschiedliche Folgen haben. Neben dem Tod der Wirtszelle kann es zu einer chronisch (persistierenden) Infektion der Zelle kommen, wobei kontinuierlich geringe Mengen an Viren produziert werden. Außerdem kann das Virusgenom in einem latenten Zustand bleiben, ohne dass infektiöse Partikel gebildet werden, wie zum Beispiel bei Retroviren. Auch die Immortalisierung, wodurch die Zelle die Fähigkeit zur kontinuierlichen Teilung erhält, ist eine der möglichen Folgeerscheinungen einer Virusinfektion (nach Modrow et al., 2003).

1.2 Retroviren

Nach Ellermann und Bang stellte Peyton Rous 1911 (Ellermann und Bang, Centralbl. Bakteriol., 1908; Rous, J Exp Med., 1911) fest, dass mit zellfreien Filtraten aus Hühnersarkomen gesunde Hühner infiziert werden konnten, welche daraufhin ebenfalls Tumore entwickelten. Das Virus wurde später Rous- Sarkom- Virus (RSV) genannt und Rous erhielt 1966, 54 Jahre nach seiner Erstbeschreibung, den Nobelpreis. Diesem Nobelpreis sollten bis heute zahlreiche folgen, welche die intensive Erforschung der Retroviren würdigen.

Retroviren kommen bei einer Vielzahl von Lebewesen vor und sind mit unterschiedlichen Krankheiten assoziiert. Neben tierpathogenen Vertretern wie dem Rous- Sarkomvirus und MMTV (Maus- Mammatumor- Virus) sind wichtige humanpathogene Vertreter wie HTLV-1 (humanes T-Zell- Leukämie- Virus) und HIV (humanes Immundefizienzvirus) bekannt, welche zur Ausbildung zahlreicher klinisch relevanter Krankheitsbilder führen. Luc Montagnier und seiner Arbeitsgruppe gelang es 1983 erstmals am Pariser Pasteur-Institut bei einem Patienten mit chronischer Lymphknotenerkrankung das humane Immundefizienzvirus als Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS zu isolieren und dessen Zugehörigkeit zu den

Retroviren zu dokumentieren (Barre-Sinoussi et al., 1983). Jene revolutionäre Entdeckung und die damit verbundene Forschungsaktivität machen die Vertreter der Familie der Retroviren heute zu der wohl am intensivsten erforschten und am meisten beachteten viralen Familie in der medizinisch/biologischen Forschung mit großer Bedeutung für die Gesundheitswissenschaften. Françoise Barre-Sinoussi und Luc Montagnier erhielten für die wegweisende Entdeckung des HI-Virus 2008 den Nobelpreis für Medizin. Neben infektiösen exogenen Retroviren gibt es auch endogene Retroviren, welche Ende der 1960er Jahre entdeckt wurden. Letztere integrierten sich in das Wirtsgenom, wurden so Bestandteil des Genoms und werden vertikal über die Keimbahn nach den Mendelschen Gesetzen vererbt. In die Familie der Retroviren sind solche viralen Erreger eingeordnet, welche eine Reverse Transkriptase (RT) besitzen. Diese enzymatische Ausstattung macht sie innerhalb der Viren einzigartig. Funktion der RT ist die Umschreibung der viralen RNA in ein komplementäres DNA- Intermediat, welches als Provirus in die genomische DNA der Wirtszelle integrieren kann. Dieser Prozess wird als „reverse Transkription“ bezeichnet. Das auf diese Weise integrierte Provirus verliert seine Individualexistenz. Das virale Genom ist nun konstitutiver Bestandteil des Genoms der Zelle. Entdeckt wurde dieser Mechanismus 1970 durch Howard Martin Temin, der damit das „Zentrale Dogma der Molekularbiologie“, nämlich den Informationsfluss von DNA über RNA zum Protein, widerlegte (Temin, 1974). Temin erhielt 1975 zusammen mit David Baltimore und Renato Dulbecco den Nobelpreis „Für ihre Entdeckungen auf dem Gebiet der Wechselwirkungen zwischen Tumoviren und dem genetischen Material der Zelle“ (www.nobelpreis.org). 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* orientiert sich an genetischen und morphologischen Aspekten, antigenen Eigenschaften, der Wirtsspezifität und der Pathogenese. Zum heutigen Zeitpunkt wird die Familie der *Retroviridae* in die Subfamilien *Orthoretrovirinae* und *Spumaretrovirinae* untergliedert. Die Subfamilie der *Orthoretrovirinae* umfasst die Genera *Alpharetroviren*, *Betaretroviren*, *Gammaretroviren*, *Deltaretroviren*, *Epsilonretroviren* und *Lentiviren*, während die Subfamilie *Spumaretrovirinae* einzig das Genus *Spumaretrovirus* beinhaltet („Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses“ Part II, p 421, 2005; „Fields Virology“, Chapter 55, 2007) (s.Tab.1). Die Retroviren können des Weiteren nach der Beschaffenheit ihres Genoms klassifiziert werden. Danach besitzen die α -, β -, γ -, und ϵ -Retroviren relativ einfache Genome, während δ - Retroviren, Lenti- und Spumaviren hingegen komplexe Genome besitzen. Einige Mitglieder der α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren besitzen aufgrund onkogener Elemente innerhalb ihres Genoms pathogenes Potential und werden daher als kausale Agenzien in der Tumorgenese diskutiert. Während auch die Pathogenität von Lentiviren sicher belegt ist, konnten den Spumaviren noch keine definierten Krankheitsbilder zugeordnet werden („Fields Virology, Chapter 60, 2007). Lentivirusinfektionen sind generell charakterisiert durch eine anfänglich inapparente, progressiv fortschreitende Immundefizienz mit meist letalem Ende für den Wirtsorganismus. In der Unterfamilie der Spumaviren sind pathogene Retroviren zusammengefasst, die persistierende Infektionen auslösen können. Neben den exogenen Retroviren existieren in den Genera Alpha-, Beta- und Gammaretrovirus auch endogene Retroviren (s. Abb. 1.1).

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

	Genus	Mensch	Tier	Typ	Erkrankung
Orthoretrovirinae	α -Retrovirus		RSV	exogen	Sarkome
	β -Retrovirus	HervK	MMTV	endogen endogen/exogen	Keimzell- tumore
	γ -Retrovirus	Erv-3	FelV	endogen exogen	
	δ -Retrovirus	HTLV-1 HTLV-2	BLV	exogen	Leukämie
	ϵ -Retrovirus		Fisch- retroviren	exogen	
	Lentivirus	HIV-1 HIV-2	SIV	exogen	Immun- defizienz
Spumaretrovirinae	Spumavirus	HSRV	Affen- spumavirus	exogen	

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

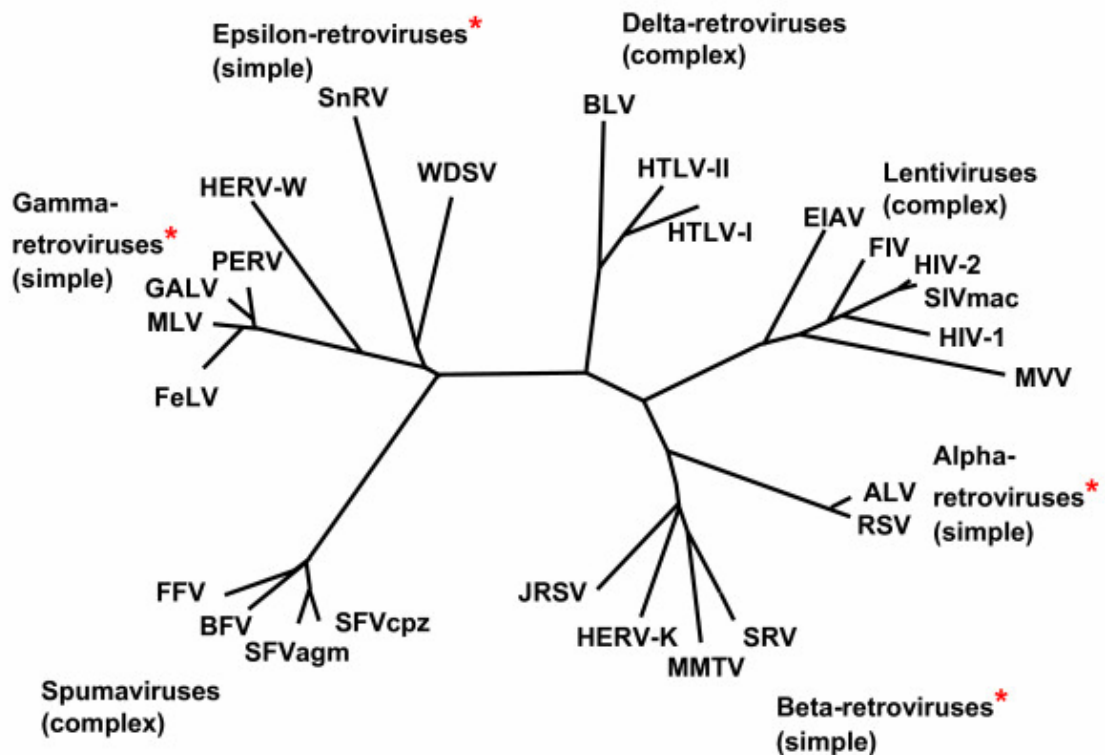


Abb.1.1: Phylogenetik der Retroviren. Genera, welche endogene Genome enthalten sind mit einem Stern gekennzeichnet.

1.3 Humane endogene Retroviren (HERV's)

1.3.1 Entstehung und Verbreitung im Genom

Das menschliche Genom besteht nur zu einem geringen Anteil aus Proteinkodierenden Sequenzen. Nur etwa 28 % des Genoms werden transkribiert und nur ca. 1,4 % kodieren für Proteine. Ein großer Teil des menschlichen Genoms besteht dagegen aus verschiedenen Familien repetitiver Sequenzen. Im Laufe der phylogenetischen Entwicklung akkumulierten sich hoch konservierte Sequenzen viralen Ursprungs, wodurch das menschliche Genom heute bis zu 8% retroviralen Ursprungs ist (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Viele der integrierten Retroviren (Proviren) sind aufgrund einer Anhäufung so genannter „nonsense“

Mutationen, großer innerer Deletionen oder der Reduktion zu solitären LTRs (*long terminal repeats*) nach homologer Rekombination, defekt.

Dabei zeigen Untersuchungen bezüglich der Verteilung dieser retroviralen Elemente im menschlichen Organismus eine hohe Verteilungsdichte auf den Chromosomen 4 und 20 sowie auf den beiden Geschlechtschromosomen X und Y (Kim et al., 2004). Nachdem die ersten humanen endogenen retroviralen Elemente 1981 von Martin et al. beschrieben wurde, konnten in den beiden letzten Jahrzehnten über zwanzig neue HERV- Familien identifiziert werden (Martin et al., 1981; Coffin et al., 1985; Leib-Moesch et al., 1990; Tristem et al., 2000).

Neben den Mitgliedern der LTR- Retrotransposons, existieren noch zwei weitere Gruppen mobiler Retroelemente, LINEs (*long interspersed elements*) und SINEs (*short interspersed elements*). Dabei nehmen LINEs im menschlichen Genom einen Sequenzanteil von etwa 17 % ein und SINEs einen Anteil von ca. 13 %.

HERVs gehören zur Familie der LTR- Retrotransposons und stellen die provirale Form exogener Retroviren dar. Ihr Genom setzt sich aus den Regionen *gag*, *pol* und *env* zusammen, welche von den LTRs flankiert werden. Diese LTRs sind etwa 500 bis 1000 bp lang und bleiben bei ihrer Insertion/Integration unverändert. Fast 98000 HERVs oder HERV-Fragmente wurden in der menschlichen Genomsequenz bisher lokalisiert (Paces et al., 2002, <http://herv.img.cas.cz>).

HERVs sind bekanntlich das Resultat der Infektion einer Keimzelle durch ein aktives exogenes Retrovirus (Boeke et al., 1997; Lower et al., 1996; Sverdlov et al., 1998). Endogene Retroviren durchlaufen keinen vollständigen Replikationszyklus und die Weitervererbung erfolgt als Provirus zusammen mit der genomischen DNA. Nach Integration des Provirus in das Genom einer Keimzelle wird es nach den Mendelschen Gesetzen weitergegeben. Daher findet sich dieses Provirus letztlich in allen Körperzellen wieder. Nach Etablierung kann sich das Provirus 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 die Proviren ihre eigenen transkriptionellen Promotoren und Regulatoren innerhalb der LTRs tragen, sind HERV- Sequenzen zur Initiation der Transkription der proviralen Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env*, aber auch benachbarter zellulärer Gene, fähig. *Splicing*- Signale innerhalb der HERVs können ebenso in transkriptionellen Varianten zellulärer Gene resultieren (Flockerzi et al., 2008).

Da zum Zeitpunkt der Integration beide LTRs keine Sequenzunterschiede besitzen dürfen, kann man durch einen Vergleich der LTR- Sequenzen und der Mutationsrate für genomische, nicht kodierende 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-Tumorviren, 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 LTRs 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 Seifarth, 1995; Hughes und Coffin, 2004).

Es ist anzunehmen, dass einige HERVs in regulatorische Regionen des humanen Genoms integriert werden und so einen Effekt auf die Expression angrenzender Gene haben, was letztendlich die menschliche Evolution beeinflusst haben könnte (Khodosevich et al, 2002). Es scheint, als würden

HERV- Sequenzen eher ihre kodierende Kapazität verlieren, als Ihre Promotoraktivität einzubüßen. Darum zeigen viele HERV-Promotorsequenzen, nach Millionen von Jahren im menschlichen Genom, transkriptionelle Aktivität.

Tatsächlich besagen jüngere Studien, dass nahezu jedes humane Gewebe HERV- Transkripte aufweist und, dass Transkripte verschiedener HERV-Familien in humanen Geweben gefunden werden (Flokerzi et al., 2008).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Bedeutung endogener retroviraler Genome und anderer Retroelemente nahezu ungeklärt und es bleibt weiterhin offen, ob retrovirale Insertionen eine Rolle in der genetischen Regulation des Wirtes spielen oder Retroviren etwa als Vektoren für den horizontalen Genaustausch dienen (Weiss et al., 2006).

1.3.2 Klassifizierung

Während die Klassifikation humaner endogener Retroviren sich über lange Zeit an Sequenzvergleichen mit animalen Retroviren orientierte (Wilkinson et al., 1994; Loewer et al., 1996), wird derzeit die tRNA- assoziierte Aminosäure als Einteilungskriterium genutzt, welche bei der Initiation der reversen Transkription als Primer dient. In der Nomenklatur wird das entsprechende Kürzel des Einbuchstabencodes der Aminosäuren an die Abkürzung HERV angefügt.

In Tabelle 2 ist eine Auswahl der wichtigsten HERV- Familien aufgeführt, gegebenenfalls mit den simultan verwendeten Bezeichnungen (nach Mager und Medstrand, 2003, gekürzt und modifiziert). Die Unterteilung der beim Menschen gefundenen retroviralen Elemente erfolgt in die Klassen I, II und III. HERVs der Klasse I zeigen eine große Ähnlichkeit mit den Gamma-Retroviren und nutzen zur Initiation der reversen Transkription tRNAs, welche ein Glutamat (E)-, Argin (R)-, Histidin (H)- oder Tryptophan (W)-spezifisches Antikodon besitzen. Sie werden entsprechend als HERV-E, -R, -I, -H oder -W bezeichnet. Retroviren der Klasse II nutzen eine Lysin (K)-assoziierte tRNA und werden als HERV-K bezeichnet (Jurka et al., 2000). Sie zeigen eine Sequenzhomologie zu den Beta- Retroviren. Aufgrund der großen Ähnlichkeit zu MMTV im Bereich der *pol*- Region werden die HERV-

Ks um den Terminus HML (human MMTV-like) ergänzt und –basierend auf Sequenzhomologien im RT-Bereich– in die Gruppen HML-1 bis 6 untergliedert. Diese sechs Subfamilien wurden 1999 von Andersson et al. um vier neue Vertreter erweitert. Klasse III, deren Mitglieder eine schwache Homologie zu den Spumaviren aufweisen, stellt insgesamt eine sehr heterogen zusammengesetzte Klasse dar (Andersson et al., 1999). Da bis heute noch keine einheitlich definierte Nomenklatur der Virustaxonomie existiert, werden die Mitglieder der einzelnen HERV- Klassen gewöhnlich als Familien bezeichnet, obwohl es sich dabei jedoch nur um phylogenetisch verwandte Gruppen handelt. Tabelle 2 ermöglicht eine Übersicht über die bedeutendsten HERV- Familien. Die in Klammern angegebene Zahl in Spalte drei bezieht sich auf die Anzahl solitärer LTRs im humanen Genom.

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)
Klasse II HERV`s		
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)
Klasse III HERV`s		
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. So sind zum Beispiel mehr als ein Drittel der Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53 in LTR-Regionen der HERVs angesiedelt. Diese gehören wahrscheinlich zu dem Transkriptionsprogramm von p53 und vermögen p53-Zielgene zu regulieren (Wang et al., 2007). 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 besteht darin, dass kohlenhydrathaltige Nahrung durch den süßen Geschmack erkannt werden kann. Die Arbeit von Bieche 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, welcher man einen selektiven Vorteil für den Wirt zuschreibt. HERV-W ist in der Lage das Env-Protein zu exprimieren. Das als Syncytin-1 bezeichnete Genprodukt erhält seinen Namen durch die Expression in der Plazenta und seine in verschiedenen Zelllinien nachgewiesene Fähigkeit, Syncytien, d.h. mehrkernige Riesenzellen, zu bilden. Es partizipiert an der Fusion von Cytotrophoblasten zu Syncytiotrophoblasten. Dazu 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 (Mi et al., 2000; Blond et al., 1999). Frendo et al. konnten 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. Ein Beispiel dafür ist das Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV), welches in einer Schafpopulation sowohl exogen als auch endogen existiert. So wird dem endogenen Jaagsiekte Sheep Retrovirus (enJSRV) durch den Mechanismus der Rezeptorinterferenz eine positive Auswirkung auf den Wirtsorganismus zugesprochen. Durch die Transkripte des *env*- Gens des endogenen JSRV kommt es zur Absättigung des zellulären Rezeptors Hyal-2 und somit zum Schutz vor einer Infektion mit dem exogenen JSRV (Leroux et al., 2007). Ein ähnliches Phänomen beobachtet man bei bestimmten Mausstämmen, welche ein unter der Kontrolle eines zellulären Rezeptors stehendes *env*-Gen (Fv-4) exprimieren. Das entstehende Fv4- Protein schützt die Zellen vor einer exogenen MLV (*murine leukemia virus*) -Infektion, da es an den entsprechenden Rezeptor bindet (Limjoco et al., 1993; Nihrane et al., 1996). Das Fehlen exogener Pendanten zu den zahlreichen HERV- Familien könnte als Hinweis gelten, 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 bekannte endogene 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, 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 (*mouse mammary tumor virus*) rufen in ihren Wirten Leukämien bzw. Mammakarzinome hervor (Coffin et al., 1997). Das exogene JSRV induziert aufgrund der onkogenen Eigenschaften seines Hüllproteins selbst pulmonale Adenokarzinome in seinem Wirtsorganismus. Hierbei handelt es sich um eine Env-vermittelte Aktivierung der zellulären Proliferation. (Leroux et al., 2007; 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) deutlich. Hier konnte die vermutete Assoziation zwischen der Entstehung von Keimzelltumoren und der Expression des *rec*-Gens von HERV-K(HML-2) bestätigt werden. Transgene *rec* exprimierende Mäuse entwickelten Vorläuferläsionen, so genannte *carcinoma in situ* (Cis). Die Arbeitsgruppe um Herbst konnte schon 1998 belegen, dass sich verschiedene Keimzelltumorarten alle von einer gemeinsamen Vorläuferläsion ableiten lassen (Herbst et al., 1998).

Aber auch sonst scheint die Expression der Transkripte des *env*-Leserahmens mit dem Auftreten neoplastischer Gewebe wie Keimzelltumoren, Mammakarzinomen 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). In Keimzelltumoren wurde neben den HERV-K-Transkripten auch Partikelbildung beschrieben und im Serum von Seminompatienten und Patienten mit Teratokarzinomen befinden sich signifikante Mengen an Anti-HERV-K-Antikörpern (Sauter et al., 1995; Boller et al., 1997; Goedert et al., 1999; Kleimann et al., 2004). Buscher et al. (2005) konnten zeigen, dass auch in Melanom-Patienten eine Expression von HERV-K-Genen vorhanden ist. Die Arbeitsgruppe fand in 45% der metastatischen Melanom-Biopsien und in 44% der melanomen Zelllinien eine Rec- und Env-Expression. Außerdem konnten zum ersten Mal

Antikörper gegen HERV-K Proteine in Melanom- Patienten nachgewiesen werden.

Auch der Zusammenhang zwischen dem weiblichen Brustkrebs und humanen endogenen Retroviren wird eingehend untersucht. Ono et al. zeigten, dass die Östradiol- und Progesteron induzierte Brustkrebszelllinie T 47 virus- ähnliche Partikel produziert und cytoplasmatisch HERV-K mRNA exprimiert (Ono et al., 1987). Ansteigende HERV-K- Expression wird auch im Zusammenhang mit Östrogen- und Progesteron- Behandlung bei Brustkrebs verzeichnet, weshalb vermutet wird, dass sich in der regulatorischen Region von HERV-K „*hormone responsive elements*“ befinden (Wang-Johanning et al., 2003).

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) und die Expression von MSR- 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). So konnte das bereits angesprochene HERV-W kodierte Glykoprotein Syncytin eindeutig mit der Genese der Multiplen Sklerose assoziiert werden (Antony et al., 2004). Von anderen Arbeitsgruppen werden immunsuppressive Eigenschaften des *env*- Gens von HERV-H Proviren thematisiert (Mangeney et al., 2001; de Parseval 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 verifizieren.

1.4 Die HERV-K(HML-2) Familie

1.4.1 Identifikation und Unterteilung

1986 veröffentlichten Ono et al. die aus zwei Klonen zusammengesetzte Sequenz von HERV-K 10 (+), einem neuen 9469 bp langen endogenen Retrovirus. Dieses besitzt jeweils ein Stopkodon, welches zu einer vorzeitigen Unterbrechung der funktionellen Leserahmen für Gag, Pol und Env führt (Ono et al., 1986). Es konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass HERV-K sowohl für *gag* als auch für *env* vollständige offene Leserahmen besitzt (Müller-Lantzsch et al., 1993; Löwer et al., 1993). Bisher sind zwei Typen von HERV-K bekannt. Von Löwer et al. (1993,1995) wurde eine neue Bezeichnung eingeführt, welche die Variante ohne die Deletion und mit einer Größe von 9471 bp als Typ2 und analog die um 292 bp am Übergangsbereich von *pol* zu *env* 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). Bis heute wurden zehn verschiedene HERV-K(HML-2) Typ 1 und elf verschiedene Proviren vom Typ 2 genauer charakterisiert (Barbulescu et al., 1999; Costas, 2000; Sugimoto et al., 2001; Turner et al., 2001). In Abbildung 1.2 sind jeweils zwei Vertreter repräsentativ dargestellt.

Altersbestimmungen, welche auf der gefundenen LTR- Sequenzdivergenz eines Elementes basieren, weisen auf eine Parallelentwicklung beider Provirus Typen 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 von einer parallelen Weiterentwicklung der beiden Gene nach dem „*master-gene model*“ aus (Medstrand und Mager, 1998). Costas et al. postulierten jedoch 2001 aufgrund einer „*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(HML-2) Typ

1 Elemente wesentlich später als bisher angenommen statt und lange nach den ersten Integrationsereignissen von Typ 2 Proviren.

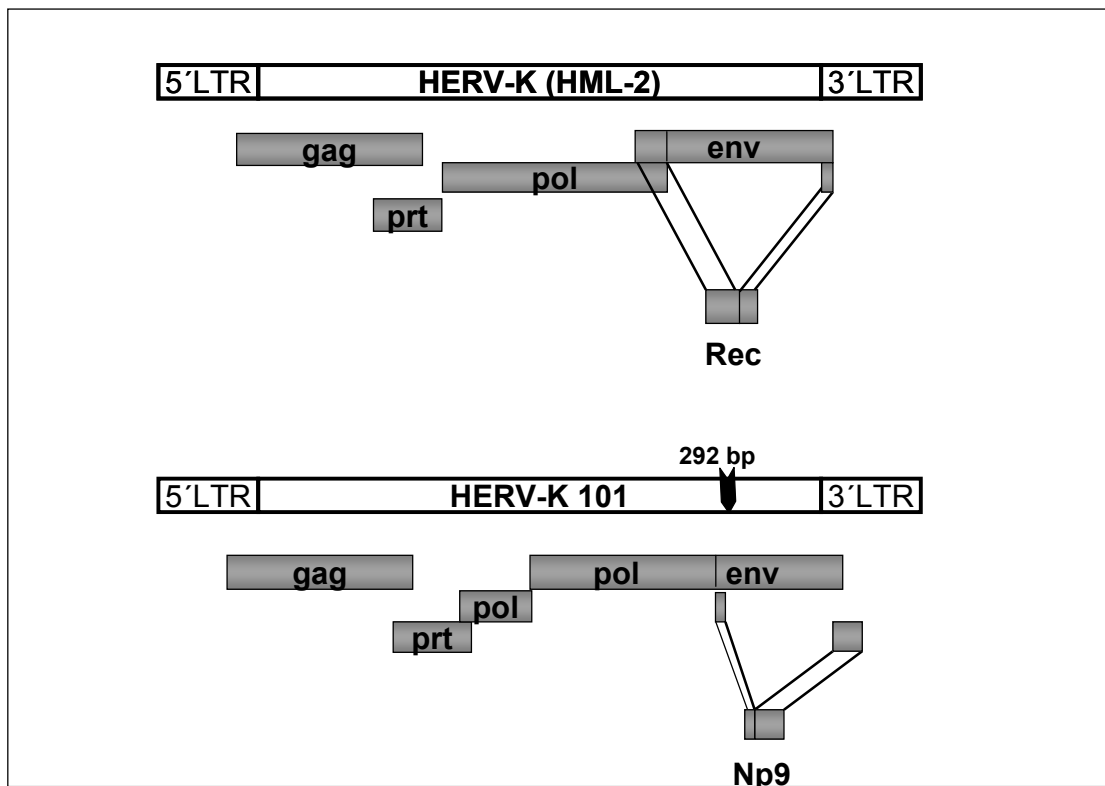


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Proviren HERV-K101 und HERV-K(HML-2). Die Abbildung zeigt die beiden Proviren mit allen anhand der Sequenzen von Barbulescu et al., 1999 und Mayer et al. 1999 abgeleiteten, offenen Leserahmen der bisher charakterisierten Gene. HERV-K101 stellt hierbei einen Repräsentanten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

1.4.2 Expression in humanen Geweben

1.4.2.1 Expression von Partikeln

HERV-K(HML-2) kodiert als einzige humane endogene retrovirale Familie retrovirale Partikel, welche *in vivo* bereits gut dokumentiert sind. 1984 gelang es Löwer et al. erstmals virale Partikel in Überständen der Zelllinie GH zu isolieren (Löwer et al., 1984). Diese HTDV- Partikel (*human teratocarcinoma-derived particle*) wurden neun Jahre später als HERV-K(HML-2) kodierte Partikel identifiziert (Boller et al., 1993). Durch diese Partikel verursachte

Infektionen konnten allerdings nicht nachgewiesen werden (Tönjes et al., 1997). Dennoch deuten Molekularbiologie, Serologie und Morphologie darauf hin, dass eine HERV-K Variante in naher Vergangenheit aktiv war oder sogar noch heute aktiv ist. Kürzlich konnten Heidmann und Mitarbeiter (Dewannieux et al., 2006) und, unabhängig, Lee und Bieniasz (2007) mutmaßliche Vorläufer der HERV-K Sequenzen rekonstruieren und deren Infektiosität aufzeigen. Eine infektiöse HERV-K Variante könnte durch Rekombination verschiedener HERV-K Sequenzen generiert werden.

Contreras-Galindo et al. gelang es 2008 erstmals mit Hilfe von Elektronenmikroskopie die Existenz von HERV-K(HML-2) Partikeln in dem Plasma von Lymphompatienten zu visualisieren.

Letztlich bleibt jedoch unklar, welche der mehr als 30 HERV-K Sequenzen für die Produktion der Viruspartikel, die in Keimzelltumoren (Boller et al., 1983; Löwer et al., 1984; Bieda et al., 2001) und Melanomen (Muster et al., 2003; Büscher et al., 2005) produziert werden, verantwortlich sind.

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, Armbruster et al., 2002; Wang-Johanning et al., 2003). Über die Regulation der Transkription ist bislang relativ wenig bekannt. Akopov et al. identifizierten die bisher nicht näher charakterisierten LTR- bindenden Proteine Erf-1, Erf-2 und Erf-3 (Akopov et al., 1998). Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt eine Aktivierung der HERV-K- LTRs durch die Bindung des Transkriptionsfaktors YY1 an diese LTRs (Knösl et al., 1999). Die regulatorischen Bereiche im LTR stellen eine Determinante der gewebsspezifischen Expression der HERVs dar. Casau et al. (1999) konnten zeigen, dass ein lacZ- Gen, welches 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) zeigten ebenfalls eine zelltypspezifische Regulierung

verschiedener HERV-K- LTRs in diversen Zelllinien. 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 detektierbar. In peripheren Blutlymphozyten, Knochenmark und Plazenta ist HERV-K RNA nur mittels hoch sensitiver Methoden zu detektieren (Brodsky et al., 1993; Medstrand und Blomberg, 1993; Tönjes et al., 1996). In Keimzelltumoren und hiervon abgeleiteten Zelllinien sind hingegen Transkripte des *env*- Leserahmens in großen Mengen nachweisbar (Herbst et al., 1996; 1998; Wang-Johanning et al., 2001; Armbruester et al., 2002; Etkind et al., 1997).

Wang-Johanning konnten weiterhin 2006 dokumentieren, dass neben HERV-K *env* mRNA auch die mRNA anderer HERV- Klassen, einschließlich ERV-3 und HERV-E, in demselben Ovarialkrebszellgewebe exprimiert werden.

Contreras-Galindo et al. wiesen 2008 deutlich erhöhte Titer viraler HERV-K(HML-2) RNA in dem Blut von Patienten mit Lymphomen oder Brustkrebs nach. Nach erfolgreicher Behandlung der Lymphome vermindern sich die RNA- Titer drastisch. Neben der RNA waren auch Reverse Transkriptase Aktivitäten und die viralen Protein Gag und Env in derselben Plasmafraktion zu finden. 2006 konnte die Arbeitsgruppe bereits HERV-K(HML-2) RNA im Plasma HIV-1 infizierter Patienten finden (Contreras-Galindo et al., 2006, 2008).

1.4.2.3 Expression von Proteinen

Die Existenz funktioneller Proteine für die meisten viralen Komponenten von HERV-K, einschließlich der viralen Protease (Mueller-Lantzsch et al., 1993) und des Env- Oberflächenproteins (Dewannieux et al., 2005), konnten bereits gezeigt werden. Sauter et al. wiesen 1995 in Zellen der Zelllinie Tera-1 und in Seminom- Patienten Proteine nach, welche vom *gag*- Leserahmen von HERV-K kodiert werden. Man stellte fest, dass diese Proteine spezifisch mit Keimzelltumoren (GTC), dem Tumor des jungen Mannes, assoziiert sind. Im Rahmen serologischer Untersuchungen fand man in einem signifikanten Prozentsatz von Patienten mit Keimzelltumoren, nicht aber in Kontrollpersonen, spezifische Immunreaktionen gegen die HERV-K Proteine Gag und Env (Sauter et al., 1995; Sauter et al., 1996; Boller et al., 1997; Kleiman et al., 2004). Die Tumorbiopsien von Patienten mit nachweisbaren Antikörpertitern wurden hinsichtlich der Expression des HERV-K Gag untersucht. Weiterhin konnte man Gag- verwandte Proteine im Cytoplasma der Tumorzellen mittels Immunhistochemie feststellen. Das umliegende Gewebe sowie das Gewebe gesunder Kontrollpersonen war negativ (Sauter et al., 1995). In der Zelllinie Tera-1 konnte Gag als 80 kDa großes Vorläuferprotein und in Form kleinerer Produkte nachgewiesen werden (Sauter et al., 1995), in der Ovarialkarzinomzelllinie PA-1 war jedoch nur das 80 kDa Vorläuferprotein detektierbar (Göttinger et al., 1996).

Das 1995 von Löwer et al. identifizierte Rec- Protein (ehemals cORF) konnte bisher in den Keimzelltumorzelllinien GH, Tera-1 und Tera-2, sowie in Melanom- Gewebe und Melanom- Zelllinien auf Proteinebene detektiert werden (Galli et al., 2005; Büscher et al., 2006). Unter Verwendung spezifischer Antikörper konnte Rec- Protein in 14% der Melanome gefunden werden. Rec wird in Melanomzellen in ähnlichen Mustern exprimiert wie auch in Teratokarzinomzelllinien (Büscher et al., 2006). Auch in diesem Fall wurden im Serum betroffener Patienten Antikörper gegen HERV-K, speziell gegen Rec und Np9, gefunden (Büscher et al., 2005). Das Protein des *env*- Spleißprodukts von HERV-K Typ 1, Np9, konnte bisher nicht ohne Behandlung mit dem Proteasomeninhibitor MG132 in Zelllinien oder in Tumorgewebe nachgewiesen werden (Armbruster et al., 2002).

Die Arbeitsgruppe um Wang-Johanning zeigte eine Expression des HERV-K-Env- Proteins auf der Oberfläche und im Cytoplasma von Ovarialkrebszellen unter Verwendung eines spezifischen anti- HERV-K- Antikörpers. Ein signifikanter Anstieg der HERV-K- Expression konnte in Tumoren mit geringem malignem Potential, verglichen mit normalem Gewebe, beobachtet werden. Weiterhin konnten anti- HERV- Antikörper, einschließlich anti- ERV3, anti- HERV-E- Antikörper und anti- HERV-K- Antikörper in Patientinnen mit Ovarialkrebs detektiert werden. HERV- Env- Proteine werden somit nachweislich vermehrt in Ovarialepithelzelltumoren transkribiert und translatiert. Zusätzlich waren verschiedene HERV- Familien in Ovarialkrebs nachzuweisen. Diese Tatsache macht jene Proteine besonders als neue Ziele zur Erkennung, Diagnose und Therapie von Ovarialkrebs interessant (Wang-Johanning et al., 2006).

Mehrere Studien belegen, dass auch HERV-K TM- und Gag- Proteine in Melanomen und Melanommetastasen exprimiert werden (Buscher et al., 2005; Muster et al., 2003). Des Weiteren beschreiben einige Arbeitsgruppen, in Anlehnung an die Ähnlichkeit von HERV-K mit MMTV, eine Überexpression von HERV-K(HML-2) *env* in Brustkrebsgewebe, wo auch neue alternative *Splicing*- Formen erscheinen (Ejthadi et al., 2005; Wang-Johanning et al., 2003; 2001). Eine Überexpression von HERV-K *gag* konnte darüber hinaus auch in peripheren Blutzellen von Leukämiepatienten nachgewiesen werden (Depil 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, welche 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) gebildet.

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). Man geht 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).

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).

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) berichteten 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, welches 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 1.4.4 ist. In der *env*- Sequenz des Typ1 Virus liegt die Information für das Np9-Protein (s. Kapitel 1.4.5).

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, welche durch alternatives Spleißen entstehen. 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 14 kDa großen Proteins, welches damals cORF (*central open reading frame*) genannt wurde, mittels Immunfluoreszenz und Immunpräzipitationen in zwei Keimzelltumoren abgeleiteten Zelllinien zeigen (Löwer et al., 1995). Mit dem heute als Rec bezeichneten Protein erhielt man erstmals einen Hinweis auf die Komplexität der HERV-K(HML-2)- Familie, da Rec von einer doppelt gespleißten mRNA abgelesen wird. Mit der Lokalisation des Proteins in den Nukleoli, der Identifikation potentieller Domänen für Kernimport (NLS), -export (NES) und RNA-Bindung (Löwer et al., 1995), sowie der Spleißcharakteristika wurde dem Protein eine Verwandtschaft mit den Rev/Rex Proteinen des HTL/II-Virus zugeschrieben (Magin et al., 1999; Yang et al., 1999) und analog dazu die Bezeichnung Rec eingeführt. Rec ist in der Lage, HERV-K(HML-2) Vollängentranskripte zu binden und deren Transport ins Cytoplasma zu vermitteln (Magin et al., 1999). Durch zwei leucinreiche Domänen im C-Term (50-59 AS und 77-83 AS), welche das nukleäre Exportsignal (NES) bilden, wird Rec in Abhängigkeit von dem zellulären Exportrezeptor Crm1 aus dem Zellkern transportiert. Rec

transportiert demnach einfach- oder ungespleißte Transkripte über den Crm1-Weg ins Cytoplasma (Yang et al., 1999). Für Rec wurde bereits gezeigt, dass die Zugabe von Leptomycin B, einem spezifischen Crm1 Inhibitor, den viralen Export blockiert (Mager et al., 2000). Auch eine Multimerisierung des Proteins, wie sie auch für die Funktionalität der Rev/Rex Proteine erforderlich ist, konnte bestätigt werden (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 Nacktmäusen *rec*- exprimierende Rattenfibroblasten nach subkutaner Injektion zu Tumoren auswuchsen (Boese et al., 2000). Tiere der Kontrollgruppe zeigten keine Neoplasien. 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*) sein. Bei PLZF handelt es sich um einen Transkriptionsrepressor, welcher beim Menschen mit der Genese von Leukämien assoziiert wird (Boese et al., 2000). Im Mausmodell wird dem Protein eine bedeutende Rolle in der Regulation von Prozessen zugeschrieben, welche während der embryonalen Anlage der Extremitäten, des Zentralnervensystems und der Testis ablaufen (Hawe et al., 1996; Barna et al., 2000). Eine Störung der Spermatogenese aufgrund einer funktionellen Beeinträchtigung von PLZF könnte die Grundlage für weiterführende Schädigungen mit einem erhöhten Risiko testikulärer Tumore darstellen (Heimdal et al., 1997).

Galli et al. konnten folgend einen Nachweis für die Korrelation zwischen der Expression von *rec* und der Entstehung von Keimzelltumoren in Mäusen erbringen. *Rec*- transgene Mäuse wiesen im Alter von 12 Monaten erste histopathologische Veränderungen des Hodengewebes auf, welche dann im Alter von 19 Monaten mit einem spezifischen Verlust der Differenzierung von Spermatozyten über Spermatogonien zu Spermatisden und einem verminderten Durchmesser der Seminiferi tubuli und schließlich mit Hodentumoren einhergingen (Galli et al., 2005).

In Verbindung mit den beobachteten Studien deuten das transformierende Potential von Rec und die Bindung an PLZF 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, Ovarialkarzinome) und transformierten Zelllinien identifiziert. Eine der Spleißvarianten zeigte hierbei eine auffällig signifikante Präsenz in allen untersuchten Seminombiopsien. Dieses Transkript, welches im Folgenden *np9* genannt wird, teilt sein erstes verkürztes Exon mit den ersten 44 Basen von *env* und *rec*, verwendet dann jedoch zur Translation des zweiten Exon ein von *rec* und *env* verschiedenes Leseraster (siehe Abb. 1.2). Die Translation ergibt somit eine Übereinstimmung des ersten Exons von *np9* mit den ersten 15 Aminosäuren der 87 Aminosäuren, welche das erste Exon von *rec* darstellen. Bedeutenderweise stammen alle *np9*- Gene von HERV-K(HML-2) Typ-1 Sequenzen ab, welche aufgrund der Typ-1 spezifischen 292 bp- Deletion nicht dazu in der Lage sind, intaktes Rec zu exprimieren (Löwer et al., 1993). Die Fähigkeit zur Expression von Np9 durch Typ-1 Proviren ist lediglich durch die Präsenz einer alternativen Spleißdonorstelle möglich. Barbulescu et al. (1999) und Sugimoto et al. (2001) charakterisierten bisher insgesamt sieben HERV-K Typ-1 Sequenzen (HERV-K101, HERV-K102, HERV-K103, HERV-K 107/HERV-K10, HERV-K106 und HERV-K(II)), welche dem proviralen Typ-1 entsprechen und somit aufgrund der 292 bp- Deletion eine Grundvoraussetzung zur Bildung von Np9 erfüllen.

Innerhalb des zweiten Exons von *np9* wurden neben einer putativen Casein-Kinase-II- Phosphorylierungsdomäne drei mögliche Kernlokalisationssignale (NLS`s) detektiert. Weitere Sequenzanalysen ergaben, dass sich die *np9*- Gensequenz auf den Chromosomen 3q13 und 22q11 wieder findet.

Seinen Namen erhält Np9 (nukleäres Protein von 9 kDa) durch seine Lokalisation in distinkten subnukleären Strukturen, welche mit Hilfe von auf

EGFP- Fluoreszenz basierenden Zelllokalisationsanalysen, bestimmt wurde. Die nukleäre Anordnung 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 sind, war es von großem Interesse Interaktionspartner des Proteins zu finden und damit einen weiteren eventuellen Hinweis auf die Bedeutung von Np9 in der Tumorigenese zu erhalten. 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, welches Numb ubiquitiniliert 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 Kolokalisationsstudien wurden mindestens 2 Interaktionsdomänen der Proteine beschrieben. Weiterhin konnte eine Veränderung der subnukleären Lokalisation von LNX detektiert werden, bei der 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 das instabile Np9 erst durch Hemmung des 26S Proteasoms mit MG132 in der Teratokarzinom- Zelllinie Tera-1 stabilisiert wird, wodurch erstmals ein Nachweis des zellulären Np9- Proteins möglich wurde (Armbruster et al., 2004).

1.5 Die Interaktionspartner

1.5.1 Das Testis Zink Finger Protein (TZFP) und seine Funktion als transkriptioneller Repressor

Lin und Mitarbeiter konnten 1999 durch Yeast two-hybrid- Experimente und anschließende Datenbankrecherchen TZFP als einen neuen, zinkfingerhaltigen Transkriptionsfaktor identifizieren (Lin et al., 1999). Durch Northern Blot - Experimente zeigten sie, dass TZFP hauptsächlich in humaner Testis exprimiert wird. TZFP ist in diskreten Punkten im Nukleoplasma lokalisiert und ist während spezifischer Stadien der Spermatogenese aktiv (Inoue et al., 2000). Das Protein vermag die Histondeacetylase 2 (HDAC2) zu Promotoren zu rekrutieren und scheint primär als transkriptioneller Repressor von bestimmten Genen zu agieren (Tao et al., 2006). Einige Tumorzelllinien und Gewebe, welche ursprünglich nicht aus der Testis stammen, exprimieren ebenfalls TZFP. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass TZFP an der Tumoronkogenese und -progression beteiligt sein könnte. Letztendlich jedoch bleiben Zielgene sowie biologische Funktion weitgehend unbekannt.

Die cDNA des transkriptionellen Repressors ist 1960 bp groß und wird zu einem 487 Aminosäuren großen Protein translatiert. Das Testis Zink Finger Protein ist sehr eng verwandt mit PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger protein*), welches ebenfalls als transkriptioneller Repressor fungiert. Statt TZFP wird das Protein daher in der Literatur nicht selten als PLZF 2 (McConnell und Licht, 2007) oder PLZF (*PLZF-like zinc finger protein*; Piazza et al., 2004) bezeichnet. TZFP- Maushomologe sind unter TZF (Ishizuka et al., 2003), ROG (*repressor of GATA*, Miaw et al., 2000) bzw. Tzfp (Dai et al., 2002) bekannt. 1999 wurde TZFP auch als FAZF (Fanconi Anämie Zink Finger Protein) benannt (Hoatlin et al., 1999), basierend auf seiner Fähigkeit, mit FANCC (Fanconi Anämie Komplementationsgruppe C Protein) zu interagieren. Fanconi Anämie (FA) ist eine sehr seltene Erbkrankheit, bei der alle drei Blut- Zellreihen (weiße und rote Blutkörperchen, sowie Thrombozyten) nicht mehr ausreichend gebildet werden. Die FA- Gene sind beteiligt an korrektem Wachstum und Differenzierung von primitiven, hämatopoietischen Zellen. Häufige Charakteristika der Krankheit sind

congenitale Missbildungen, Rückbildungen des Knochenmarks sowie erhöhtes Risiko für Leukämien und solide Tumore. Das TZFP- Gen ist auf Chromosom 19 codiert und beinhaltet fünf Exons (Lin et al., 1999).

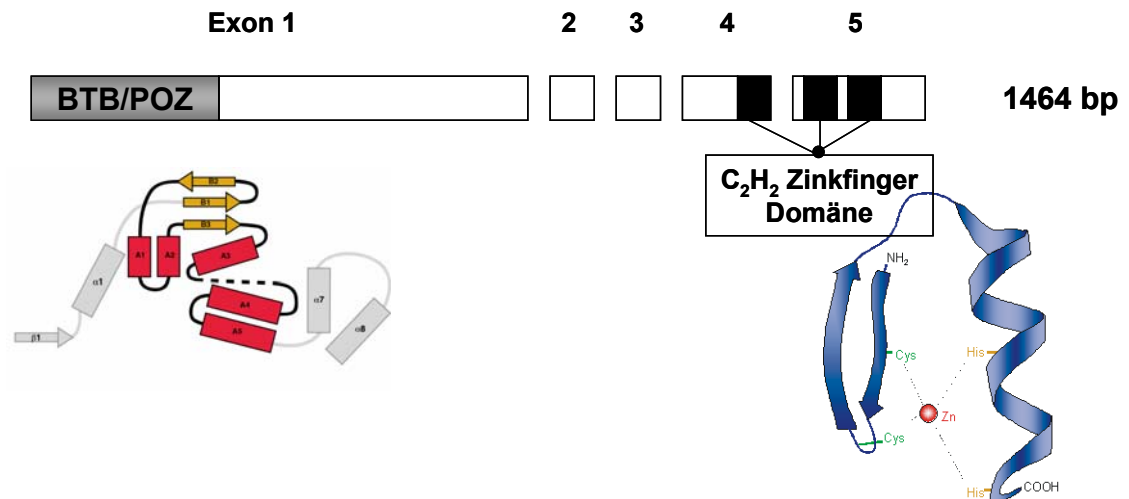


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des codierenden Teils der TZFP-Sequenz

Der 1464 bp- große Genabschnitt besteht aus fünf Exons. Die POZ- Domäne (Pox Virus und Zink Finger) ist unmittelbar nach dem Startcodon im ersten Exon lokalisiert, die drei C- terminalen Zinkfinger befinden sich in Exon 4 bzw. 5 (nach Lin et al., 1999).

Das TZFP- Protein ist in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt. TZFP besitzt am C-Terminus drei C₂H₂- Zinkfinger motive, welche von Aminosäure 375-450 reichen (Lin et al., 1999). Als Zinkfinger werden eine große Familie DNA-bindender Proteindomänen bezeichnet, welche in ihrer Struktur hoch konserviert sind und aus zwei antiparallelen Beta-Strängen sowie einer Alpha- Helix bestehen (Wolfe et al., 2000). Im Allgemeinen kommen Zinkfinger vermehrt in Transkriptionsfaktoren, regulatorischen Proteinen und anderen DNA- interagierenden Proteinen vor. Die Anwesenheit eines Zinkions ist dabei unabdingbar für die Stabilität der Domäne, welche sich in

Abwesenheit des Zinks erst entfaltet. C₂H₂- Zinkfinger bilden eine eigene Klasse unter den Zinkfingermotiven und sind charakterisiert durch ein Paar von Cysteinresten in den Beta- Strängen, sowie zwei Histidinresten in der Alphahelix, welche für die Bindung des Zinkions verantwortlich sind. Die einzigartige Fähigkeit der Zinkfinger- Motive, DNA binden zu können, ermöglicht Proteinen wie TZFP ihre Funktionen zu erfüllen.

Zusätzlich zu den drei C- terminalen Zinkfingern als charakteristische Struktur motive besitzt TZFP am N-Terminus eine so genannte „BTB/POZ-like“- Domäne (Broad Complex, tramtrack, bric à brac / Poxvirus und Zinkfinger) (Albagli et al., 1995). Diese hoch konservierte Domäne besteht aus 115 Aa und tritt hauptsächlich am N-Terminus von Zinkfingerproteinen bzw. transkriptionellen Repressoren auf (Zollman et al., 1994). Bei einigen Proteinen wurde gezeigt, dass die POZ- Domäne als spezifische Protein-Protein- Interaktionsdomäne agiert (Bardwell et al., 1994). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte durch einen Gelmobilitätsretardierungsassay bei insgesamt drei POZ- enthaltenden Proteinen zeigen, dass die POZ- Domäne eine DNA- Bindung inhibiert. Die Vermutung liegt nahe, dass TZFP seine Transkriptionsrepression durch eben diese BTB/POZ- Domäne vermitteln kann (Lin et al., 1999).

Als Protein, welches TZFP sehr ähnlich ist, wurde zuvor bereits PLZF (Promyelozytische Leukämie Zink Finger Protein) erwähnt. PLZF ist mit einer Größe von 674 Aminosäuren länger als TZFP und besitzt am C- terminalen Ende neun Zinkfinger. Die C₂H₂- enthaltenen C-Termini der beiden Zinkfingerproteine jedoch in hohem Maße homolog (McConnell et al., 2007). Die letzten drei der neun Zinkfinger motive von PLZF stimmen zu 91 % mit den Zinkfingern von TZFP überein (Ikeda et al., 2007). TZFP und PLZF ist auch die charakteristische BTB/POZ- Domäne am N-Terminus gemein. Ein Vergleich der ersten 120 Aa- Reste der BTB/POZ- Domäne ergab eine Aminosäureidentität von 33%, sowie eine Ähnlichkeit von 58% (BLAST-Analysen). Das PLZF Protein wurde bereits von Boese et al., Denne et al. und diversen anderen Arbeitsgruppen intensiv untersucht.

PLZF „knock out“ Mäuse weisen neben Defekten in der Extremitätenbildung, eine gestörte Geschlechtsreifung auf (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, welcher an der Testisentwicklung in Mäusen beteiligt ist (Sweeney et al., 1996; Ravnik und Wolgemuth, 1996; Ravnik und Wolgemuth, 1999).

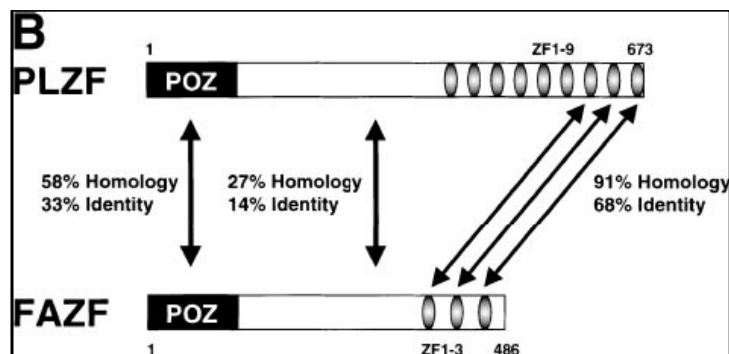


Abb.1.4: Schematische Darstellung der Homologie zwischen TZFP und PLZF (Hoatlin et al., 1999)

Besonders die BTB/POZ- Domäne, welche zur Proteininteraktion dient, und die DNA- bindenden C- terminalen Zinkfinger zeigen einen hohen Grad an Homologie.

1.5.2 Der humane Androgenrezeptor (AR)

Androgene sind Sexualhormone, welche die Entwicklung und Erhaltung der männlichen Merkmale stimulieren und kontrollieren.

Die Wirkung von Androgenen wie Testosteron oder seinem Metabolit Dihydrotestosteron (DHT) wird durch einen Androgenrezeptor (AR), auch bekannt als NR3C4 (*nuclear receptor subfamily, group C, member 4*), vermittelt. Dieser ligandenabhängige Transkriptionsfaktor gehört zu der Superfamilie von Kernrezeptoren (Tao et al. 2005), genauer zu den Steroidhormonrezeptoren. Diese regulieren wichtige biologische Prozesse wie Zellwachstum und Differenzierung, aber auch die Entwicklung, Homöostase und die Funktion verschiedener Organe (Wilson et al., 1991;

Mangelsdorf et al., 1995; Cato und Peterzierl, 1998). Androgene und ihr Rezeptor sind daher unter anderem essentiell für die Differenzierung, Entwicklung und Aufrechterhaltung der männlichen Fortpflanzungsorgane, aber auch der nicht-reproduktiven Organe (Trapman und Brinkmann, 1996; Jenster et al., 1999). Unabhängig von den zahlreichen normalen physiologischen Funktionen kann AR als onkogenes Protein agieren, beispielsweise durch die Unterstützung der Zellzyklus- Progression (Balk und Knudsen, 2008). Da der Androgenrezeptor in sekretorischen Epithelzellen der Prostata exprimiert wird, wird vermutet, dass AR eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Prostatakrebs spielt, welcher meistens in Epithelzellen seinen Ursprung findet. Wachstum und Überleben der primären Prostatakrebszellen sind kritisch abhängig von Androgenen (Gregory et al., 1998). Aus diesem Grund ist die Verabreichung von Androgenen Bestandteil der klinischen Standardtherapie, um das Prostata- Tumor- Wachstum zu inhibieren. Trotzdem erreichen viele Prostata Tumore ein terminales Stadium. Der molekulare Mechanismus für das erneute Auftreten von Tumoren bleibt also weiterhin relativ unverstanden und ist somit von großem Interesse für die Forschung.

Das Gen für den humanen Androgenrezeptor ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms Xq11.2 -13 lokalisiert (Migeon et al., 1981) und codiert für ein Protein mit einer molekularen Masse von etwa 110 kDa oder 919 Aminosäuren (Lubahn et al., 1988). Das Gen besteht aus acht kodierenden Exons. Dabei ist die strukturelle Organisation der kodierenden Exons identisch zu jener der Gene, welche für andere Mitglieder der Kern- Hormon-Rezeptorfamilie kodieren. Analog zu anderen Kernrezeptoren besteht das Androgenrezeptor- Protein aus unterschiedlichen funktionellen Domänen. Die NH₂- terminale Domäne des Androgenrezeptors beinhaltet hauptsächlich die funktionellen Strukturen, welche der Transkriptionsaktivierung dienen. Des Weiteren enthält das Protein eine DNA-Bindungsdomäne. Diese ist die am höchsten konservierte Domäne innerhalb der Mitglieder der Rezeptor- Superfamilie und ist charakterisiert durch einen hohen Gehalt basischer Aminosäuren und neun konservierter Cysteinreste. Die Region enthält zwei Substrukturen mit zentralen Zinkatomen, welche mit jeweils vier Cysteinresten interagieren. Eine weitere, deutlich kleinere Domäne, ist die Hinge- Region. Diese nicht konservierte, in der Größe variable Region dient als flexibles Glied zwischen der ligandenbindenden Domäne und dem Rest des Rezeptormoleküls und ist wichtig für die nukleäre Lokalisation des Rezeptors. Die letzte Region ist die Liganden- Bindungs- Domäne. Diese gut konservierte Region wird durch fast 250 Aminosäuren codiert und befindet sich im C- terminalen Bereich des Rezeptormoleküls. Neben der Hormonbindung vereint diese Domäne eine Reihe von Funktionen wie die transkriptionelle Aktivierung und Repression oder die Rezeptordimerisierung (Mangelsdorf et al., 1995; Moras et al. 1998; Cheng et al., 2002).

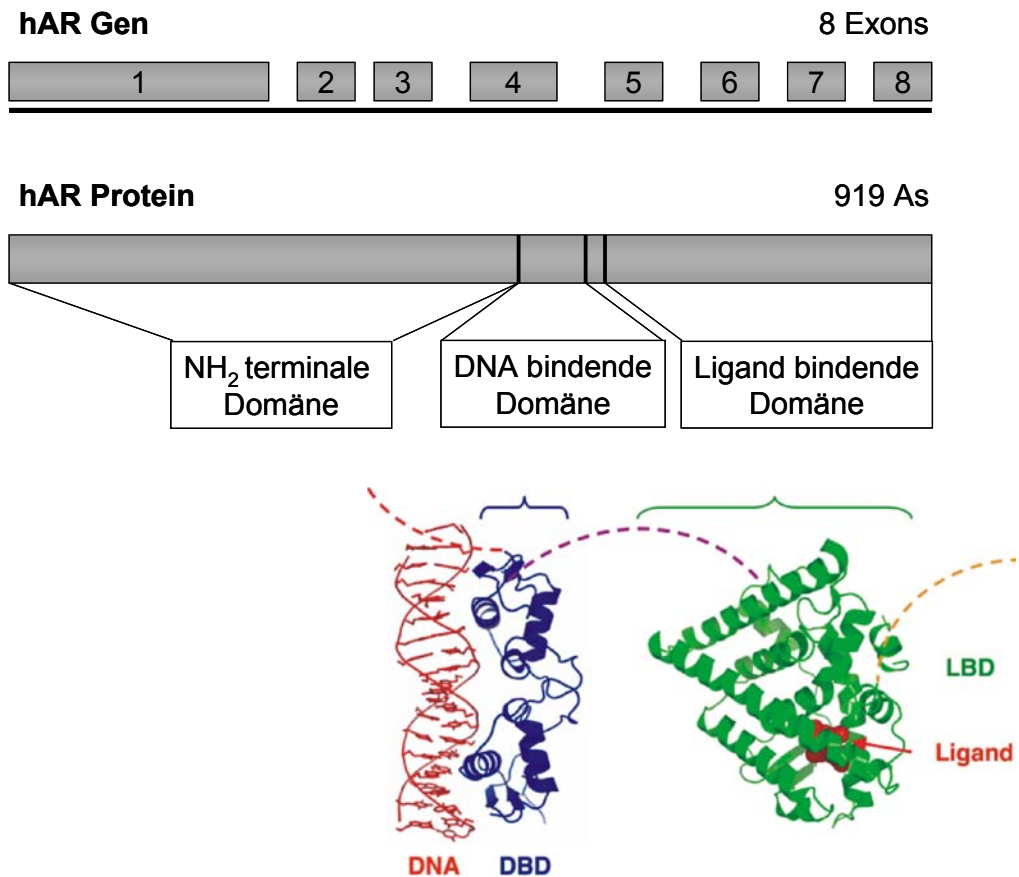


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des humanen Androgenrezeptors

Der obere Teil der Abbildung zeigt das humane Androgenrezeptorgen mit seinen acht Exons. Darunter ist das entsprechende Protein mit den einzelnen funktionellen Domänen dargestellt (nach Mangelsdorf et al., 1995; Chang et al., 2002).

Die Aktivierung des Androgenrezeptors erfolgt in mehreren Schritten und ist schematisch in Abbildung 1.8 dargestellt. Nach Eintritt des Testosterons in die Zielzelle bindet dieses Molekül den Rezeptor entweder direkt oder nach einer Konvertierung in 5 α -Dihydrotestosteron. Der Bindung des Androgenrezeptors folgt eine Dissoziation der Hitzeschockproteine in das Zytoplasma. Gleichzeitig kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins resultierend in einer Transformation und einer Translokation in den Zellkern durch ein intrinsisches Kernlokalisationsignal. Hat der Rezeptor das Steroidhormon gebunden, entweder im Zytoplasma oder im Zellkern, bindet er als Homodimer an spezifische DNA-Elemente in Androgen-Ziel-Genen. Im nächsten Schritt werden weitere zusätzliche

Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren, RNA- Polymerase II rekrutiert. Dadurch wird spezifisch die Transkription auf diskreten Bereichen des Chromatins aktiviert (Cato und Peterziel, 1998).

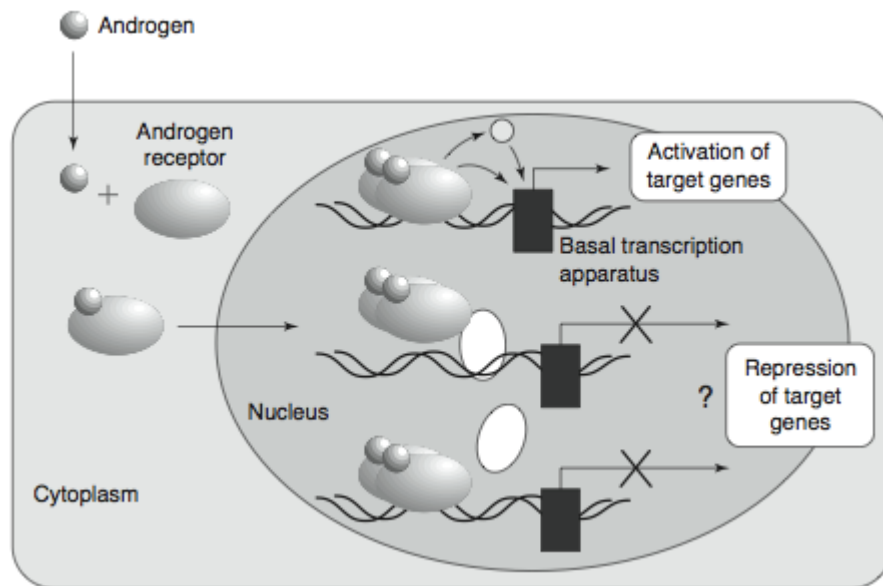


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus der Androgene und ihres Androgenrezeptors (Cato und Peterziel, 1998).

1.6 Ziele der Arbeit

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist das humane Testis Zinkfinger Protein TZFP, welches zusammen mit PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger protein*) in einem Yeast II Hybrid Screen mit HERV-K Rec gefunden wurde. Die Charakterisierung der Bindung der Proteine TZFP und HERV-K(HML-2) Rec soll dabei *in vitro* durch GST- Pulldown Assay und *in vivo* durch Coimmunopräzipitation erfolgen. Spezifische Bindungsstellen sollen mit Hilfe verschiedener Deletionsmutanten genau kartiert werden. Dazu sollen Mutanten kloniert werden, denen bestimmte, bereits bekannte Interaktionsdomänen des TZFP fehlen. Zur funktionellen Analyse der Wechselwirkung zwischen dem akzessorischen Protein Rec, welches in Verdacht steht an der Entwicklung von Keimzelltumoren beteiligt zu sein, und dem Transkriptionsrepressor TZFP, einem Homolog des potenziellen Tumorsuppressors PLZF, sollen Luciferase- Reporter Assays unter Verwendung verschiedener Promotoren etabliert werden. Ein weiterer Teil der Arbeit sollen die kürzlich von unserer Arbeitsgruppe identifizierten humanen Spleißvarianten von TZFP, welche aus einer Testis cDNA- Bank amplifiziert wurden, sein. Diese Spleißvarianten, welche im Gegensatz zu den TZFP- Deletionsmutanten tatsächlich *in vivo* exprimiert werden, können eventuell Rückschlüsse auf zelluläre Vorgänge zulassen. Zur Charakterisierung der Bindungsstellen sollen GST- Pulldown Analysen sowie Coimmunopräzipitationen durchgeführt werden. Um Hinweise auf eine Funktion der zellulären Proteininteraktion zu erhalten, sollen ebenfalls Reporter Assays etabliert werden. Ishizuka et al. beschrieben 2005 eine funktionelle Interaktion zwischen TZFP und dem Androgenrezeptor AR in der Maus. Neben den bereits zuvor beschriebenen Bindungsstudien *in vitro* und *in vivo*, sollen Reporter Assays die funktionelle Bedeutung der Interaktion von TZFP, AR und Rec aufklären.

Da der Androgenrezeptor eine essentielle Rolle bei der Entstehung von Prostata-Krebs zu spielen scheint, ist es von Interesse ein mögliches Interaktionsmodell für den menschlichen Organismus zu erstellen, welches TZFP als auch das HERV-K(HML-2) Protein Rec beinhaltet.

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 (w/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
Blockingreagenz:	5 % Magermilchpulver (w/v) in PBS
Entfärbelösung:	10 % Isopropanol (v/v); 10 % Eisessig (v/v)
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; f risch zugeben: 2 mM Dithiothreitol (DTT), 0,2 mM PMSF, 20 µg/ml Aprotinin, 50 mg/m Lysozym

AB-Puffer: 0,02 M Tris-HCl, pH 7,4; 0,05 M NaCl; 0,001 M EDTA; 0,5 % Np40 (Ipegal); 0,5 % Desoxycholat; 0,5 % SDS; Proteaseinhibitoren (frisch): PMSF 4 µl/ml; Iodacetamid 10 µl/ml; Aprotinin 1 µl/ml

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

2.2 Enzyme und dNTP`s

Alkalische Phosphatase	Roche
DNase I	Roche
dNTP`s	Roche
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs Inc.
Superscript II RT	Invitrogen
Taq- Polymerase	Sigma
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 GE Healthcare 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 (GE Healthcare, 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 wurde den Medien je nach Selektionsmarker des zu transformierenden Plasmides 100 µg Ampicillin bzw. 30 µg Kanamycin zugesetzt. 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)

293T: „Human Embryonic Kidney“. 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.

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- HA aus der Ratte (Kooperation Dr. E. Kremmer, München)
- anti- TrpE aus der Ratte (Kooperation Dr. E. Kremmer, München)

2.7.2 Polyklonale Antikörper

- anti- Np9 (2.Exon)K82 aus Kaninchen (Armbrüster et al., 2002))
- anti- Rec K3086 4° aus Kaninchen (Boese et al., 2000)
- anti- PLZF aus Kaninchen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Müller- Lantzsch)
- anti- TZFP aus Kaninchen (siehe Kapitel 3.2.5)
- anti- AR (N-20): sc-816 aus dem Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

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>	GE Healthcare
<i>FuGene-6 transfection reagent</i>	Roche
Nanofectin™	PAA
NucleoSpin® Extract	Macherey und Nagel
Nucleobond Plasmidextraktion	Macherey und Nagel
<i>T7- TNT reticulocyten-coupled in vitro transcription and translation system</i>	Promega
Luciferase Assay System	Promega

2.8.3 Photochemikalien

- | | |
|----------------------------------|-------------------|
| - Röntgen- Entwickler Konzentrat | ADEFO Chemie GmbH |
| - Röntgen- Fixier Konzentrat | ADEFO Chemie GmbH |
| - ECL- Hyperfilm | GE Healthcare |

2.8.4 Radiochemikalien

- | | |
|--|----------------|
| - ³⁵ S- translabled Methionin/Cystein | MP Biomedicals |
|--|----------------|

2.9 Membranen

- | | |
|---------------------------------|-----------|
| - Immobilon- P Transfer Membran | Millipore |
|---------------------------------|-----------|

2.10 Oligonukleotide

Primer (MWG/Invitrogen/Operon):

Die nachfolgend aufgelisteten Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Herstellung von Plasmidkonstrukten verwendet. Angehängte Restriktionsenzymststellen sind jeweils durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

Tabelle 3.1 Bezeichnung und Sequenzen der verwendeten Primer und Bezeichnung der entsprechenden klonierten Konstrukte.

Konstrukt	Primerpaare (forward/revers)	Primersequenz
pGEX TZFP	TZFP pGEX Eco For TZFP/Red/EcoRev	5' - GGT TGG gaa tcc TCC CTG CCC CCC ATA - 3' 5' - GAC ACg aat tcC GGT GGT GAA GAA GAA AGA AGG - 3'
pSG5HA TZFP	TZFP GFP Eco For TZFP BglIII Rev	5' - G CCG gaa ttc CAT GTC CCT GCC CCC CAT AAG - 3' 5' - GGT GGT aga tct GGT GGT GGA GGA AG - 3'
pSG5HA TZFP ohne POZ	TZFP minus POZ pSG5 For TZFP BglIII Rev	5' - C GCG CGC aag ctt GGA TGG CTC GAG GGG ACA GG - 3' 5' - GGT GGT aga tct GGT GGT GGA GGA AG - 3'
pSG5HA TZFP ohne Zn	TZFP GFP Eco For TZFP ohne Zn BglIII Rev	5' - G CCG gaa ttc CAT GTC CCT GCC CCC CAT AAG - 3' 5' - CCC CCC aga tct CCG AGC AGG AGG GGC - 3'
pSG5HA Mitte	TZFP minus POZ pSG5 For TZFP ohne Zn BglIII Rev	5' - C GCG CGC aag ctt GGA TGG CTC GAG GGG ACA GG - 3' 5' - CCC CCC aga tct CCG AGC AGG AGG GGC - 3'
pSG5HA TZFP Splice 3/8/14	TZFP Splice For TZFP Splice Rev TZFP-HA-Eco For TZFP/Red/Eco Rev	5' - GAG TGC AGT CCC TGG AAG AG - 3' 5' - AAG GGC TTC TCT CCT GTGTG - 3' ???? 5' - GAC ACg aat tcC GGT GGT GAA GAA GAA AGA AGG - 3'

pATH TZFP Kanin	TZFP Kanin-C-Term Fp	5'-AGA GAG gaa ttc GAG GGC TCG AGG GGA C – 3'
	TZFP Kanin-C-Term Rp	5'-aag ctt TCA GGT GGT GGA GGA AGA AGG ACA ACA GGG AGA GGT CGA GGG CCG AGA CGG CCT CGA GGA GAT CCT CTG TTC CC – 3'
pSG5HA AR	AR BglII For	5' - CCC GGG aga tct ATG GAA GTG CAG TTA - 3'
	AR C-Term BamHI Rev	5' – CTC TCT gga tcc CTG GGT GTG GAA ATA - 3'
pSG5 TrpE	pSG5 TrpE Eco For	5'- CCC GCG gaa ttc ATG CAA
	pSG5 TrpE BglII Rev	ACA CAA AAA C – 3' 5'- CGC GCG aga tct TCA CTC AAT CT GGC GGC – 3'

Sequenzierprimer

pSG5-For 5' - ATACACTGTTTGAGATGAGG - 3'

pSG5-Rev 5' - GATACATTGATGAGTTTGG - 3'

2.11 Vektoren, Reporterplasmide und Konstrukte[^]

2.11.1 Parentale Vektoren

- pGEM[®]-T Vektor

Der pGEM[®]-T Vektor der Firma Promega wird zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Taq- Polymerase verwendet, da diese Polymerase allen Amplifikaten am 3'Ende ein Desoxyadenosin anhängt. Diese DNA-Fragmente können ohne einen vorherigen Restriktionsverdau direkt nach der

PCR 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 die Unterbrechung des lacZ- Markergens und den damit verbundenen Funktionsverlust in einem Blue/White Screening angezeigt. Nach erfolgter Insertion erscheinen die Bakterienkolonien weiß. 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“, welches 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, welches zur Selektion transformierter Bakterien dient.

- pGEX-4T-1 Vektor:

Der pGEX-4T-1 Vektor der Firma GE Healthcare wird verwendet, um Fusionsproteine mit einer 26kDa großen Glutathion- S- Transferase (GST) herzustellen. Hierfür besitzt er eine Multiple- Cloning- Site (MCS), welche 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

- pSG5- Vektor:

pSG5 ist ein 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.

- pSG5-HA-C1- Vektor

Der von der AG Grässer (Virologie Homburg) zur Verfügung gestellte, modifizierte pSG5- Vektor unterscheidet sich von pSG5 (Stratagene) lediglich durch das Vorhandensein einer HA-Sequenz C- terminal einer Multiple Cloning Site. In pSG5-HA-C1-Vektor ist es somit möglich, die gewünschte Gensequenz vor oder nach einem HA- tag ein zu klonieren. Als „tags“ werden kurze Peptide bezeichnet, mit deren Hilfe Proteine markiert werden können; bei dem HA- tag handelt es sich um eine Aminosäuresequenz des Hämagglutins. Bei Expression des entsprechenden Proteins wird auch die Sequenz des HA- tags abgelesen und diese an das Protein synthetisiert. Somit kann das Protein zum Beispiel im Western Blot durch spezifisch gegen den tag gerichtete Antikörper nachgewiesen werden.

- 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. Die gebildeten Transkripte werden aufgrund des nachfolgenden SV40- Polyadenylierungssignals mit einem Poly- A- Schwanz versehen. Außerdem enthält der Vektor die Resistenzgene für Kanamycin und Neomycin zur Selektion in Bakterien und eukaryotischen Zellen sowie ein *E.coli* „ori“ und ein f1-Phagen „ori“ für die Bildung von Einzelstrang DNA.

- pDsRed-C1-Vektor:

Der 4700 bp große Vektor der Firma Clontech, der einen Enhancer im CMV Promotor (P_{CMV}) trägt, enthält ein Gen, welches für ein rotfluoreszierendes Protein (DsRed) kodiert. Der Vektor ist ein effizienter Expressionsvektor in Säugerzellen 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 dem C-terminalen DsRed1- Gensequenz besteht. Die Fusionsproteine können auf diese Weise *in vivo* in den Zellen lokalisiert werden. Distal des DsRed1-Gens 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, welche das Antigen SV40 T produzieren. Der SV40 Promotor ($P_{SV 40}$) ist den Resistenzgenen für Kanamycin und Neomycin vorgeschaltet, so dass die transfizierten Zellen gegen diese beiden Antibiotika resistent sind und die Kultur und Selektion in den Antibiotika enthaltenden Medien ermöglicht wird. Durch den pUC *ori* kann der Vektor auch in Bakterien repliziert werden.

2.11.2 Reporterplasmide

- pXP2-myc2.5:

pXP2 ist ein promotorloser Luciferase- Vektor, welcher das Reporter-gen Luciferase enthält und mit einer Ampicillin- Resistenz versehen ist (Nordeen, 1988). In diesen Vektor ist ein 2,5 kb großes Fragment der *c-myc*- Promotor-Sequenz über *SmaI* und *BglII* einkloniert. Diese Sequenz besitzt 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 Luciferase- Vektor, welcher das Reporter-gen Luciferase enthält und mit einer Resistenz für Ampicillin versehen ist (Nordeen, 1988). In diesen ist ein 2,5 kb großes Fragment 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).

- MMTV- Luc

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Roland Schüle, Zentrum für Tumorbologie, Freiburg)

Das MMTV- Luc- Reporter-gen, welches insgesamt eine Größe von 7,32 kb hat, besitzt vier verschiedene *Glukokortikoid Responsible Elements* (GRE's) (Ham et al., 1988), sowie Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NF-1 („*nuclear factor 1*“), Oct-1 („*octamer binding transcription factor 1*“) und den „*TATA-box binding factor*“ (Hebbar und Archer, 2003; Jenster 1998; Préfontaine et al., 1999). Zur Messung der Aktivierung enthält das MMTV- Luc- Reporterkonstrukt die Luciferase- cDNA. Eine schematische Darstellung des Konstrukts befindet sich in Abb 2.5.



Abb. 2.1: Schematische Darstellung des MMTV- Luc- Plasmids

Das MMTV- Luc- Konstrukt besitzt eine Größe von 7,32 kb. Neben vier *Glukokortikoid Responsible Elements* (GRE's) beinhaltet das Plasmid Bindestellen für weitere Transkriptionsfaktoren wie NF-1 („*Nuclear Factor 1*“), Oct-1 („*octamer binding transcription factor 1*“) und den „*TATA-box-binding factor*“. Außerdem enthält das MMTV- Luc- Reporterkonstrukt ein Gen für die Luciferase (Ham et al., 1988; de Ruiter et al., 1995; Dijkema et al., 1998; Abbildung modifiziert).

- PSA- Luc

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Roland Schüle, Zentrum für Tumorbiologie, Freiburg)

Bei PSA handelt es sich um das Androgen- sensitive Prostata spezifische Antigen. Der PSA- Promotor hat eine Größe von 5,8 kb und besitzt drei *Androgen Responsible Elements* (ARE) (Cleutjens et al., 1996). ARE I (bei nt 170) und II (bei nt 394) befinden sich in der proximalen Region des PSA- Promotors, ARE III (bei nt 4200) ist innerhalb eines 440 bp großen Enhancer- Elements enthalten (Schoor et al., 1996; Zhang et al., 1997). Dabei sind hauptsächlich die ARE I und II in die Bindung des Androgens involviert. Außerdem enthält das PSA- Luc- Reporterkonstrukt das Gen für die Luciferase.

PSA ist eine chymotrypsin- ähnliche Serinprotease. Die PSA- Expression wird durch Androgen über den Androgenrezeptor AR reguliert (Young et al., 1991). Nach Bindung des Androgens, transloziert der AR in den Nukleus und bindet dort die AREs, welche in dem PSA- Promotor enthalten sind (Yeung et al., 2000).

PSA wird ebenso von normaler, aber auch von krankhaftem Prostatagewebe synthetisiert (Aumuller et al., 1990; Lilja et al., 1985). PSA ist ein bekannter Serum- Marker zur Erkennung von Prostata- Krebs. Die Größe des PSA- Werts im Serum ist direkt proportional zu dem Tumolvolumen.

2.11.3 Konstrukte

Um die nachfolgenden Konstrukte zu erhalten, 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 inkloniert 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 durch Isolierung des *EcoRI/ XhoI* Fragmentes aus dem pJG4-5-Rec-1.Exon Konstrukt (Boese et al., 2000) konstruiert. 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 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) konstruiert. 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.

- pGEX- Np9, pSG5- Np9:

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

- pSG5- PLZF:

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

- pEGFP- TZFP

Dieses Konstrukt wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Müller-Lantzsch kloniert und enthält die vollständige Sequenz für das humane TZFP.

- pSG5HA- TZFP

Das Konstrukt pSG5HA- TZFP wurde durch Amplifikation aus dem Template eGFP- TZFP mit Hilfe der Primer TZFP GFP Eco F und TZFP BgIII Rev kloniert. Die Ligation in den Vektor erfolgte über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI*. Das Konstrukt enthält, wie die folgenden TZFP- Konstrukte, ein HA-tag.

- pSG5HA- TZFP ohne POZ

Das Konstrukt pSG5HA- TZFP ohne POZ wurde durch Amplifikation aus dem Template pSG5HA- TZFP mit Hilfe der Primer TZFP minus POZ pSG5 For und TZFP BgIII Rev kloniert. Das isolierte Fragment wurde anschließend mit *HindIII* und *BgIII* gespalten und anschließend über *HindIII* und *BamHI* in den Vektor subkloniert. Dem Konstrukt fehlt die komplette POZ- Domäne.

Alle Deletionsmutanten wurden von Frau Diplombiologin Matrina Schmitt im Rahmen ihrer Diplomarbeit kloniert.

- pSG5HA- TZFP ohne Zn

Das Konstrukt pSG5HA- TZFP ohne Zn wurde durch Amplifikation aus dem Template pSG5HA- TZFP mit Hilfe der Primer TZFP GFP Eco F und TZFP Zn BgIII rev kloniert. Das isolierte Fragment wurde anschließend mit *EcoRI* und *BgIII* gespalten und anschließend über *EcoRI* und *BamHI* in den Vektor subkloniert. Dem Konstrukt fehlt die komplette Zinkfinger- Domäne.

- pSG5HA- TZFP Mitte

Das Konstrukt pSG5HA- TZFP Mitte wurde durch Amplifikation aus dem Template pSG5HA- TZFP mit Hilfe der Primer TZFP minus POZ pSG5 For und TZFP ohne Zn BgIII rev kloniert. Das isolierte Fragment wurde anschließend mit *EcoRI* und *BgIII* gespalten und anschließend über in *HindIII* und *BamHI* in den Vektor subkloniert. Dem Konstrukt fehlen die POZ- und die komplette Zinkfinger- Domäne.

- pSG5HA- TZFP Splice 14/ pSG5HA- TZFP Splice 3/pSG5HA- TZFP Splice 8

Die TZFP- Spleißvarianten wurden aus der pJG4-5 Testis cDNA- Bank (Matchmaker LexA, human testis cDNA library, Clontech) amplifiziert, welche aus humanem Testisgewebe gewonnene cDNA –Fragmente enthält und in den pGEM-T Vektor ligiert. Beide Klone wurden mit Hilfe der Primer TZFP Splice Ges For und TZFP Splice Ges Rev gewonnen und über *EcoRI* / *BgIII* in den pSG5-HA-C1 Vektor umkloniert.

- pATH- TZFP Kanin

Das Konstrukt pATH- TZFP Kanin wurde durch Amplifikation aus dem Template pSG5HA- TZFP mit Hilfe der Primer TZFP Kanin- C- Term Fp und TZFP Kanin- C-Term Rp kloniert. Das isolierte Fragment wurde anschließend mit *EcoRI* und *HindIII* gespalten und anschließend in den Vektor pATH 10 subkloniert. Das Konstrukt stellt nur die C- terminalen Aminosäuren von TZFP dar, welcher als besonders immunogen gilt. TZFP Kanin diene zur Immunisierung und der anschließenden Antikörper- Gewinnung in Kaninchen.

- pSG5- AR

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Roland Schüle, Zentrum für Tumorbologie, Freiburg) enthält die Sequenz des Androgenrezeptors im Vektor pSG5 (Alen et al., 1999).

- pSG5HA- AR

Das Konstrukt pSG5HA- AR Mitte wurde durch Amplifikation aus dem Template pSG5- AR mit Hilfe der Primer AR BgIII For und AR C-Term Bam R kloniert. Das isolierte Fragment wurde mit *BgIII* und *BamHI* gespalten und anschließend in den Vektor subkloniert.

- pSG5- TrpE

Das Konstrukt pSG5- TrpE wurde durch Amplifikation aus dem Vektor pATH mit Hilfe der Primer pSG5 TrpE Eco For und pSG5 TrpE BgIII Rev von Frau Bianca Baumert im Rahmen ihres F- Praktikums kloniert.

2.12 Mikroskope, Computersoftware und Internetseiten

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurde mit einem Leitz Aristoplan 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 DNA-Techniken

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

Durch eine Agarosegelelektrophorese werden doppelsträngige DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Ladung und 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 werden kleine DNA- Fragmente von 100 bis 500 bp in 3% Agarosegelen und 500 bp bis 5 kb große 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.

3.1.2 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 geladene 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 geladene Säulen. Nach mehreren Waschschritten wird die gereinigte DNA durch Zugabe von 1x TE Puffer eluiert.

3.1.3 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 der 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, welcher 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 10x 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 einem Endvolumen von 100µl verwendet.

3.1.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Maniatis et al., 1989)

Restriktionsendonukleasen (REs) sind Enzyme, welche hochspezifisch bestimmte Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und diese durch Spaltung der Phosphodiesterbindungen spalten. Je länger die entsprechende Erkennungssequenz der RE, desto spezifischer schneidet das Enzym. Die Nomenklatur der REs 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 artfremder und eigener DNA erfolgt aufgrund unterschiedlicher Methylierungsmuster.

3.1.5 Phosphatasebehandlung von Vektoren

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

Eine Dephosphorylierung aufgeschnittener Vektorenden wird vorgenommen, um die Religation des Vektors zu verhindern. Die Vektoren sind dann aufgrund der fehlenden Phosphatgruppe nicht mehr in der Lage 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 *Nucleo-Spin*-Kits nach Angaben der Firma Macherey und Nagel aufgereinigt.

3.1.6 Ligation der DNA- Fragmente

(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.

3.1.7 Analytische Isolierung von Plasmid- DNA aus Bakterien

(Minipräparation nach Holmes und Quigley, 1981)

Die Minipräparation mittels „*Boiling- Präp*- Methode“ dient der Isolierung geringer Plasmid- DNA Mengen zur Analyse von Bakterienklonen im Verlauf einer Klonierung. Nach Transformation von *E.coli* pMOS- Kulturen mit einem Ligationsansatz werden die Transformanten auf LB- Agarplatten mit

entsprechendem Antibiotikum selektiert. Die weitere Amplifikation der einzelnen Klone erfolgt in je 1.5 ml LB- Medium mit 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, 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. Durch Zugabe von eiskaltem 70 % Ethanol und anschließender Zentrifugation (15 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) kann die Reinheit der Plasmid- DNA erhöht werden. Abschließend wird das DNA- Pellet getrocknet und in 40 µl TE- Puffer mit RNaseA (100 µg/ml) aufgenommen. Die aufgereinigte klonale Plasmid- DNA kann durch spezifische Restriktionsenzyme geschnitten werden.

3.1.8 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 im Verlaufe einer Klonierung oder zur Erhaltung bereits bestehender Plasmid- DNA. Die Maxipräparationen werden mit dem Plasmid- Isolationskit nach Angaben der Firma Macherey und Nagel durchgeführt. Die Konzentration wird durch eine photometrische Messung bestimmt und die Plasmide bei 4°C aufbewahrt.

3.1.9 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.

3.2 Protein- Techniken

3.2.1 Herstellung von Proteinextrakten

3.2.1.1 Zellaufschluss unter nativen Bedingungen

Für GST- Pulldown- Analysen müssen Proteine in ihrer gefalteten Tertiärstruktur vorliegen, um von passenden Antikörpern effektiv erkannt zu werden bzw., um Protein-Protein-Wechselwirkungen eingehen zu können. Zur Gewinnung nativer Zellextrakte aus Bakterien werden pelletierte Bakterien in Lysispuffer (s.Kap.2.1) aufgenommen. Das Zellpellet wird bei – 70°C über Nacht eingefroren, die anschließende Zelllyse erfolgt 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.

3.2.1.2 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 $6,4/OD = 15 \mu\text{g}$ errechnet und diese auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, soweit nicht anders vermerkt.

3.2.1.3 Proteinsynthese durch *in vitro* Transkription und Translation

Zur Synthese einzelner Proteine *in vitro*, d.h. außerhalb eines Zellsystems, wird das gekoppelte Transkriptions/Translationssystem auf der Basis eines Kaninchen- Retikulozyten- Lysates von Promega nach Angaben des Herstellers verwendet. Als *template*- DNA dienen in dieser Arbeit ausschließlich Derivate des pSG5-Plasmides mit einem T7-Promotorelement. Zur radioaktiven Markierung der Proteine für GST-Pulldown Analysen werden zur Synthese radioaktive Aminosäuren (³⁵S-Methionin; ³⁵S-Cystein; MP Biomedicals) eingesetzt.

3.2.2 Techniken zum Nachweis von Proteinen

3.2.2.1 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (*SDS-PAGE*) (Laemmli, 1970; Maniatis et al., 1989)

Mit Hilfe einer SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine aufgrund ihres relativen Molekulargewichtes aufgetrennt. Das in dem Gel und 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 und damit die Auftrennungskapazität des Gels. Die

Polymerisation wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch Tetramethylethyldiamid (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% sowie Gradienten- Polyacrylamidgele verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in SDS- Laufpuffer bei einer angelegten Stromstärke von 25-30 mA innerhalb von 2- 3 h. Die Bestimmung der relativen Proteinmasse wird durch den Vergleich der Laufstrecke der Proteine mit dem Laufverhalten von parallel mitgeführten Markerproteinen mit bekannten Molekulargewichten erhalten.

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

3.2.2.2 Westernblot

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

Bei einem Westernblot werden die in einer SDS- PAGE aufgetrennten Proteine über kovalente Wechselwirkungen an eine Trägermembran (hier Nitrocellulose, Millipore) gebunden und mit spezifischen Antikörpern immunologisch detektiert. Dabei erscheinen die Proteine auf dem Träger in derselben geometrischen Auftrennung, wie sie nach Auftrennung im Gel vorliegen.

Zur Durchführung eines Westernblots werden die Proteine zunächst wie oben beschrieben mittels einer SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Eintauchen der Membran in Methanol vor Durchführung des Blotting-Vorgangs verhindert durch Polarisierung eine Abstoßungsreaktion der Membranoberfläche mit dem Transferpuffer. Gel und Membran werden zwischen je 3 Whatman- Filterpapiere in eine Blottingkammer zwischen Anode und Kathode eingebracht. Der Transfer der Proteine erfolgt nach dem Tank- Blot- Verfahren in SDS- Laufpuffer über Nacht bei 10 V oder für 2 Stunden bei 30 V. Nach anschließendem Trocknen der Membran wird die Markerspür von der restlichen Membran abgetrennt, für 1 h in Amidoschwarzlösung gefärbt und in Entfärbelösung entfärbt. Bevor die getrocknete Membran weiter bearbeitet werden kann, muss sie stets kurz in Methanol inkubiert werden. Die Membran wird dann für 30 min mit Blockingreagenz inkubiert. Durch dieses Abblocken der freien Membranbereiche mit den in der Milch enthaltenen Proteinen wird die Anzahl der unspezifisch an die Membran bindenden Antikörper vermindert. Im Anschluss wird die Membran über Nacht bei 4 °C in 10 ml (der Größe der Membran entsprechend) einer Primärantikörperlösung inkubiert. Dieser primäre Antikörper besitzt spezifische Bindungsstellen für den Teil eines Proteins, welches von der SDS-PAGE auf die Membran geblottet wurde und bindet daran. Am folgenden Tag können die nicht gebundenen Antikörper durch mehrfaches Waschen in PBS-Puffer entfernt werden. Danach wird die Membran mit 10 ml einer entsprechenden Sekundärantikörperlösung für 1h bei 4°C erneut inkubiert und die nicht gebundenen Immunglobuline anschließend durch Waschen in PBS- Puffer entfernt. Der

Sekundärantikörper, welcher mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist, bindet nun spezifisch an den Primärantikörper. Das Abbild der membrangebundenen Zweitantikörper kann dann mit Hilfe der ECL-Reaktion („*enhanced chemiluminescence*“) auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Die ECL- Reaktion beruht auf der Lichtemission nach enzymatischer Umwandlung des Substrats Luminol in Anwesenheit von H_2O_2 in seine oxidierte Form. Als katalysierendes Enzym dient hierbei die Peroxidase, welche an den Zweitantikörper gekoppelt ist. Die nach enzymatischer Umwandlung des Substrats emittierte Strahlung wird auf dem Film festgehalten. Der ECL- Nachweis wurde mit dem ECL- Western-Blotting- Kit der Firma Amersham nach deren Angaben vorgenommen; die Entwicklung der Filme und deren Fixierung erfolgten ebenfalls gemäß den Angaben des Herstellers.

3.2.2.3 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.

3.2.2.4 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 bei $80^\circ C$ unter Vakuum getrocknet und zur Belichtung eines Röntgenfilms eingesetzt.

3.2.3 Techniken zum Nachweis der subzellulären Proteinlokalisierung

3.2.3.1 Detektion autofluoreszierender Proteine durch Fluoreszenzmikroskopie

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 parentalen Vektoren, unter Verwendung des FuGENE6 Reagenz (s. Kap. 3.3.5.2.1) oder des Nanofectin Reagenz (3.3.5.2.2). 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).

3.2.3.2 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. 3.2.3.1) kann eine Aussage über eine Kern- oder eine Cytoplasma- Lokalisation der untersuchten Proteine getroffen werden.

3.2.4 Methoden zur Detektion und Analyse von Proteininteraktionen

3.2.4.1 GST- Pulldown Analysen

Mit Hilfe des GST- (Glutathion S-Transferase)- Pulldowns 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 Übernachtskulturen in LB-Amp- Medium angezogen werden. Am nächsten Tag werden 110 ml frisches LB- Amp- Medium mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von zirka 0,4-0,6 kultiviert. Anschließend wird die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (0,1mM) induziert und die Bakterien werden für weitere 4 Stunden kultiviert. 5 ml der Bakterien werden abgenommen, durch Zentrifugation pelletiert und in 2x Probenpuffer aufgenommen. Die entsprechende Probenpuffermenge berechnet sich nach der Formel OD₆₀₀ x 20 x 5 (ml). Nach Ultraschall (30 s) auf Eis, Kochen für 5 min und Zentrifugation werden je 5 µl der Proteinextrakte auf ein SDS-Gel aufgetragen. Anschließend erfolgt die Kontrolle der Proteinexpression in einem Coomassie gefärbten Gel. Die übrigen Bakterien werden nach vier Stunden geerntet, abzentrifugiert, über Nacht zum Zellaufschluss eingefroren und die Pellets in Lysispuffer aufgenommen. Hier berechnet sich die Menge an zugegebenem Lysispuffer nach der Formel OD₆₀₀ x 20 x 95 (ml). Nach Resuspension der eingefrorenen Pellets in Lysispuffer erfolgt eine erneute Zentrifugation (12000 rpm [Sigma 202MK], 60 min; 4°C). Der Überstand wird aliquotiert und eingefroren. Das native Zelllysate wird jeweils frisch aufgetaut, je 250 µl des Zelllysates werden 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], 4°C) aufgereinigt werden. Nach Zugabe von 15 µl eines *in vitro* translatierten radioaktivmarkierten Proteins (s. Kap. 3.2.1.3) 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 vollständig 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 (3.2.2.1) aufgetrennt und die kopräzipitierten, *in vitro* synthetisierten Proteine mittels Autoradiographie (3.2.2.4) nachgewiesen werden.

3.4.2.2 Coimmunopräzipitation

Die Coimmunopräzipitation ermöglicht den Nachweis von Protein- Protein- Interaktionen *in vivo*. Sie basiert auf der Tatsache, dass die konstanten Regionen von Antikörpern mit hoher Affinität an Protein- G- Sepharose binden. Wird ein Zellextrakt mit einem spezifischen Antikörper inkubiert, lassen sich anschließend durch Zugabe von Protein- G- Sepharose die entstandenen Immunkomplexe präzipitieren. Hierbei lassen sich aus der Suspension nicht nur die direkt an den spezifischen Antikörper gebundenen Proteine, sondern auch an sie gebundene, zelluläre Interaktionspartner isolieren. Um unspezifische Bindungen ausschließen zu können, werden verschiedene Kontrollen mitgeführt. Zur Durchführung einer Coimmunopräzipitation werden zunächst 293T- Zellen mit den entsprechenden pSG5- Konstrukten cotransfiziert. Dies geschieht mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin der Firma PAA nach Angaben des Herstellers (3.3.5.2.2). Dazu werden die Zellen am Vortag in große Zellkulturschalen (100mm/20mm) ausgesät und am nächsten Tag mit insgesamt 16 µg DNA pro Schale transfiziert. 48h nach der Transfektion werden die Zellen geerntet und in 10 ml PBS aufgenommen. Von 1 ml jedes Ansatzes werden Proteinextrakte zur Expressionskontrolle hergestellt. Die restlichen Zellen werden abzentrifugiert (10 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) und das Pellet wird in 500 µl AB-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Nach Ultrabeschallung und einstündiger Inkubation auf Eis erfolgt eine erneute Zentrifugation (10 min, 3000 rpm [Sigma 202MK], 4°C). Die im Überstand befindlichen löslichen Proteine werden mit 30 µl des

entsprechenden Antikörpers versetzt und für 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend werden 40 µl einer Sepharosesuspension (1:1 in PBS) zugegeben und die Mischung erneut für 2 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die mit Protein beladene Sepharose wird danach pelletiert (1 min, 3000 rpm [Heraeus Biofuge Pico]) und fünfmal in AB-Puffer gewaschen. Durch die Waschschriffe werden alle unspezifisch gebundenen oder nicht gebundenen Proteine gewaschen. Danach wird das Sepharose- Pellet in 2x- Probenpuffer aufgenommen und nach Kochen abzentrifugiert. Der Überstand wird auf ein SDS-Gel aufgetragen. Bindet nun das gesuchte Protein an das durch den Antikörper präzipitierte Protein, kann dieses nach einem Western Blot und ECL- Färbung auf einem Film sichtbar gemacht werden.

3.2.4.3 Luciferase- Reportergen- Assay

Am Vortag in 24- Loch-Platten ausgesäte 293T-Zellen werden mit Hilfe von Nanofectin (3.3.5.2.2) transfiziert. Jeder Ansatz enthält 400 ng Reporter- Plasmid (MMTV-Luc, PSA-Luc), 100 ng pEGFP zur Ermittlung der Transfektionseffizienz in der FACS- Analyse (Kap. 3.3.4), sowie die zu testenden Konstrukte in DNA-Mengen von 1,6 - 2,1 µg (genaue Angaben im Ergebnisteil). In allen Ansätzen wird hierbei die Gesamt- DNA- Menge durch entsprechende Zugabe von parentalem Leervektor konstant gehalten. 48 h (37°C, 5% CO₂) nach der Transfektion werden die Zellen nach Ablösen vom Boden der 24-Loch-Platte in 500 µl PBS aufgenommen. 100 µl der Zellen werden zur Bestimmung der Transfektionseffizienz in der FACS- Analyse untersucht. Die restlichen Zellen werden abzentrifugiert und durch Resuspension in 100 µl 1x CCLR- Puffer (Promega) lysiert. Nach Zentrifugation (1 min, RT [Sigma 202MK], 13000 rpm) werden 30 µl des Überstands mit der gleichen Menge Luciferin (Luciferase assay system™ (Promega)) vermischt und die Luciferase- Aktivität dann zügig im Lumat (LB9501-Luminometer, Berthold) vermessen. Das Enzym Luciferase reagiert mit dem kurz vor der Messung im Lumat zugegebenen Luciferin durch Oxidation zu Dioxetan oder Dioxetanon. Beim Zerfall dieser sehr instabilen

Substanzen kommt es zur Biolumineszenz, die mit Hilfe des Lumats quantifiziert werden kann. Die relative Luciferase- Aktivität berechnet sich aus dem Quotient der gemessenen Luciferase- Aktivität und der Transfektionseffizienz der einzelnen Ansätze. Die erhaltenen Werte werden standardisiert, indem nur mit Leervektor transfizierte Zellen als 100 % angesehen werden. Die Auswertung und graphische Darstellung werden mit dem Programm Sigma Plot 4.1TM (SPSS9) durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung im „t-Test“ werden p-Werte kleiner 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

3.2.4.4 Kolokalisationsassay

Die unter 3.2.3.1 und 3.2.3.2 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 Kolokalisationsorte der untersuchten Proteine gedeutet werden.

3.2.5 Herstellung von Antikörpern im Kaninchen

3.2.5.1 Herstellung von Protein zur Immunisierung

Die DNA- Sequenz des zu exprimierenden Proteins liegt dazu in dem durch Tryptophan induzierbaren Vektor pATH vor. Bei dem zu exprimierenden Protein handelte es sich hier um den C- terminalen Bereich des humanen TZFP, da dieser Bereich eines Proteins in der Regel als besonders immunogen gilt.

Nachdem die Expression des gewünschten Proteins in BL 21(DE3)-Bakterien mit Hilfe von Tryptophan induziert wurde, werden im Anschluss jeweils 500µl Bakterienextrakt unter Verwendung präparativer SDS- Gele aufgetrennt. Ein präparatives SDS- Gel entspricht von seiner Zusammensetzung einer Menge von drei einfachen Gelen. Um etwa 0,5 mg Protein zu erhalten, müssen drei präparative SDS- Gele durchgeführt werden. Nach der Auftrennung des Proteins wird das Gel 6-10 Minuten lang in einer Färbelösung (Coomassie Blau in Methanol; 3% (w/v)) gefärbt und danach in einer speziellen Entfärbelösung (Tris-HCL, pH 7,4; 0,1 M) entfärbt, bis die zu isolierende Bande deutlich zu erkennen ist. Die Proteinbanden werden dann unter UV- Licht ausgeschnitten und zur Oberflächenvergrößerung durch eine 2 ml- Spritze und im Anschluss durch eine 5 ml- Spritze gedrückt. Die Gelpartikel werden in der Folge mit ca. 3 ml Elutionspuffer (NH₄HCO₃, 0,05 M; Mercaptopropandiol, 0,5% (v/v)) überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert, sodass die Proteine aus dem Gel in die Lösung diffundieren können. Die Proben werden im Abstand von mehreren Stunden abzentrifugiert (Christ- Zentrifuge, 10 min., 3000 rpm), der Überstand abgenommen und durch neuen Elutionspuffer ersetzt. Die abgenommene Proteinlösung wird bei -70°C angefroren und anschließend mehrere Tage lyophilisiert. Danach wird das getrocknete Protein in 1 ml PBS- Puffer aufgenommen. Die Quantität und Qualität des Proteins wird vor der Immunisierung mittels SDS- PAGE und Immunoblot ausgetestet. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

3.2.5.2 Immunisierung der Kaninchen

Die Immunisierung erfolgt intrakutan mit ca. 0,5 mg des Proteins gelöst in 0,8 ml des kompletten Freundschens Adjuvans. Um die Antikörper- Produktion in dem Tier anzuregen, erfolgen im Abstand von 4 Wochen subkutane Boosterungen mit Protein, welches in inkomplettem Freundschem Adjuvans gelöst ist. Vor der Grundimmunisierung wird den Tieren eine Blutprobe aus der Ohrvene als Negativkontrolle (Präserum; ca. 5 ml) entnommen.

Ungefähr 2 Wochen nach der ersten Boosterung wird dem Tier erneut Blut abgenommen und das erste Serum gewonnen, um die Antikörperproduktion mittels SDS- PAGE und Immunoblot zu überprüfen. Je nach Erfolg der Antikörperproduktion erfolgen im Anschluss noch weitere Boosterungen, um die Antikörperproduktion zu maximieren. Zur letztendlichen Gewinnung der Antikörper werden die Tiere narkotisiert und ausgeblutet. Auch zwischen den Boosterungen erfolgt jeweils eine Blutabnahme (ca. 10 ml). Die Dauer des Versuchs beträgt etwa vier Monate.

3.3 Bakterien- und Zellkultur- Techniken

3.3.1 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.

3.3.2 *Blue/White- Screening*

Mit Hilfe des Blue/White Screenings ist es möglich Klone, welche mit einem Insert- tragenden Vektor transformiert wurden, von solchen zu unterscheiden, welche nur den Leervektor 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. Diese Methode kann ausschließlich bei Bakterienstämmen, welchen die β -Galaktosidase fehlt, angewendet werden, wie zum Beispiel dem pMOS Stamm. Des Weiteren kodiert der Vektor für die β -Galaktosidase in Form eines *lacZ*-Gens. 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 35 μ l X-Gal und 20 μ l IPTG auf der Oberfläche der Agarplatte verteilt werden. Anschließend werden die Platten vor dem Auftragen der Bakterien inkubiert bis beide Substanzen vollständig in den Agar eindiffundiert sind.

3.3.3 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 überführt.

3.3.4 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 vereinzelt Zellen aufgrund hydrodynamischer Fokussierung durch Überdruck beim Messkammereintritt und Anregung durch einen Argon-Laser analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit werden Messungen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und der Apoptoserate durchgeführt. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz transfizierter 293T Zellen werden 100 μ l der

Kulturen in 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 Luciferase- Werte.

3.3.5 Transformation von Zellen

3.3.5.1 Transformation von Bakterienzellen

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

Zur Transformation von Zellen werden 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 Mg^{2+} -Stammlösung (203,3 g/l $MgCl_2 \times 6 H_2O$; 246,5 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$) 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 Aliquots 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 $MnCl_2 \times 4 H_2O$; 0,03 M CH_3COOK pH 7,5; 0.01 M $CaCl_2 \times 2 H_2O$; 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 $CaCl_2 \times 2 H_2O$; 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 gelangt in das Innere der Zellen. Vor der Kultivierung in LB-Medium zuzüglich des entsprechenden Selektionsmarkers werden die Zellen wenige Minuten zur Regeneration auf Eis gestellt.

3.3.5.2 Transfektion von Säugerzellen

3.3.5.2.1 Transfektion mit *FuGENE-6*

Die Transfektion der eukaryotischen, adhären Zelle COS-1 wird mit Hilfe des Transfektionsreagens FuGENE-6 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

3.3.5.2.2 Transfektion mit *Nanofectin*

Die Transfektionen der eukaryotischen, adhären Zelle HEK-293T wird mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin der Firma PAA nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Interaktion von HERV- K(HML-2)- Rec und Testis Zink Finger Protein TZFP

4.1.1 Studien zur Bindung von Rec und TZFP in Glutathion- S- Transferase (GST) - Pulldown Experimenten *in vitro*

In einem Hefescreen zur Identifikation von Interaktionspartnern von Rec, wurde TZFP, welches hohe Homologie zu dem Tumorsuppressor PLZF aufweist, gefunden. PLZF vermag das Proto- Onkogen *c-myc* zu reprimieren. Diese Repression kann durch Coexpression von Rec aufgehoben werden. Somit könnte Rec sein onkogenes Potential über die Derepression von *c-myc* über eine Hemmung von PLZF entfalten. Ob TZFP ähnliche Funktion besitzt, soll zunächst durch Studien zur Bindung zwischen TZFP und Rec untersucht werden. Dazu wurden GST- Pulldown Analysen mit den jeweiligen Vollängenproteinen durchgeführt. TZFP wurde durch ein *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem mit Hilfe des Vektors pSG5 synthetisiert und gleichzeitig radioaktiv markiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mit Matrix gebundenem GST-, als Negativkontrolle, und GST- Rec- Lysaten inkubiert. Die matrixgekoppelten Proteine wurden in einem SDS- Gel aufgetrennt, welches anschließend durch Autoradiographie untersucht wurde.

Wie in Abbildung 4.1 ersichtlich ist Rec in der Lage TZFP *in vitro* zu binden (Spur 3).

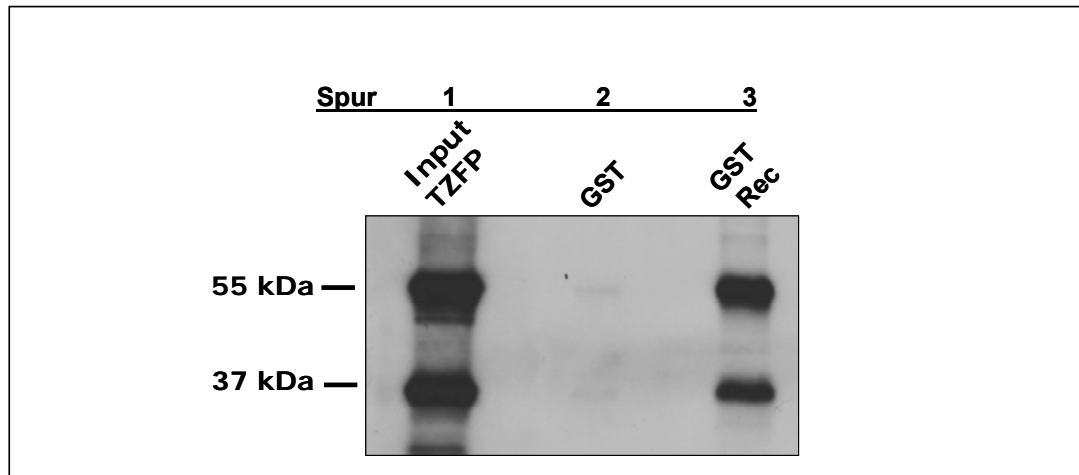


Abb. 4.1 Nachweis der Bindung zwischen Rec und TZFP *in vitro*

Abbildung 4.1 zeigt eine Autoradiographie. In Spur 1 das eingesetzte, S^{35} radioaktiv markierte TZFP- Protein als Inputkontrolle. Dieser entsprechen 10% der in einem Ansatz eingesetzten Menge an radioaktiv markiertem TZFP- Protein. In Spur 2 befindet sich GST als Negativkontrolle und in Spur 3 ist TZFP zu sehen, welches mit dem matrixgebundenen Protein GST- Rec-Derivat präzipitiert ist.

4.1.2 Studien zur Bindung von HERV-K(HML-2)- Rec und TZFP durch Coimmunpräzipitation *in vivo*

Mit Hilfe der Coimmunpräzipitation (Kapitel 3.2.4.2) sollte die Interaktion des TZFP- Proteins mit Rec *in vivo* bestätigt werden. Das TZFP- Protein wurde dazu mit Rec in 293T-Zellen rekombinant exprimiert. Im Anschluss wurde Rec an einen spezifischen Rec- Antikörper gebunden und an Protein-G- Sepharose gekoppelt. Interagieren Rec und TZFP miteinander, bildet sich ein Sepharose- Antikörper- Protein- Protein- Komplex, welcher den Nachweis von TZFP über einen anti- HA- Antikörper erlaubt. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden alle Konstrukte und die entsprechenden Leervektoren in separaten Ansätzen als Kontrolle cotransfiziert. Bei allen Ansätzen wurden die Zellen 48h nach der Transfektion geerntet und analysiert. Abb. 4.2 zeigt das Ergebnis von IP und Co- IP mit Rec und TZFP.

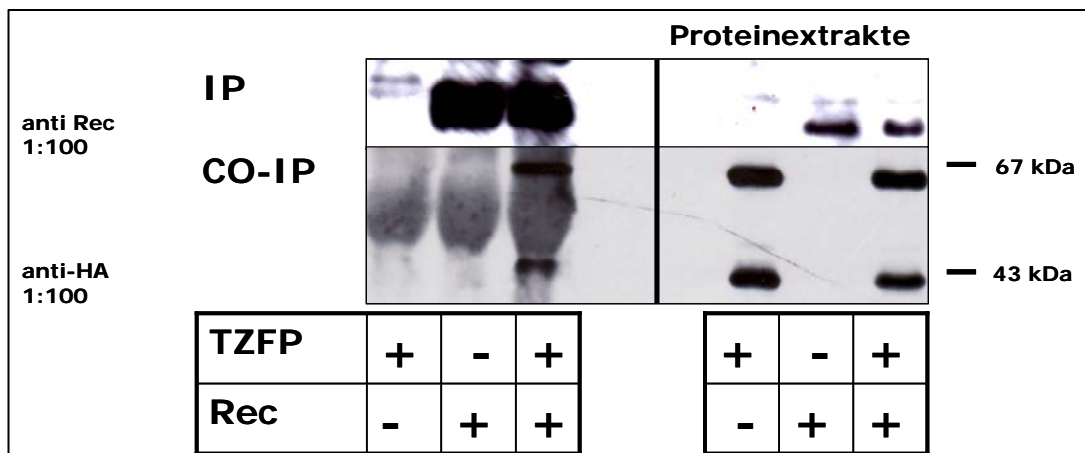


Abb. 4.2 Immunopräzipitation (IP) und Coimmunopräzipitation (Co- IP) von TZFP durch Rec

Gesamt- TZFP wurde mit Rec in 293T-Zellen rekombinant coexprimiert. Als Negativkontrollen wurden die Konstrukte mit den entsprechenden Leervektoren (pSG5-HA bzw. pSG5) cotransfiziert. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und eine Immunopräzipitation mit anti- Rec- Antikörper durchgeführt. Die Ansätze wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und in einem Western Blot analysiert. Im oberen Teil der Abbildung (IP) wurde der Western Blot mit anti- Rec- Antikörper angefärbt. Im

unteren Teil (Co- IP) erfolgte der Nachweis mit anti- HA- Antikörper. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Proteinexpression der eingesetzten Konstrukte.

IP: 12,5% SDS-Gel, 1. AK: anti- Rec (1:100); 2. AK: anti- Kaninchen- Pox (1:1000)

Co- IP: 10% SDS-Gel, 1. AK: anti- HA (1:100); 2. AK: anti- Ratte- Pox (1:1000)

Die IP (im oberen Teil von Abb. 4.2) zeigt die Kopplung von Rec an die Sepharose. In allen Ansätzen, in welchen die Zellen mit Rec cotransfiziert waren, lässt sich Rec im Bereich von 15 kDa nachweisen. Leichte Hintergrundbanden sind durch die schweren Ketten der Antikörper bedingt. Die im unteren Teil der Abbildung dargestellte Co- IP zeigt das durch Rec copräzipitierte TZFP. TZFP ist sowohl in der Co- IP, als auch in den dazu gehörigen Proteinextrakten als zwei Proteine unterschiedlicher Größe (ca. 55 kDa / 37 kDa) nachzuweisen. Die bereits *in vitro* bewiesene Bindung von TZFP und Rec, konnte somit auch *in vivo* belegt werden.

4.1.3 Studien zur Charakterisierung der Bindungsstelle zwischen TZFP und Rec *in vitro*

Denne et al. gelang es mit Hilfe von GST- Pulldown Assays die letzten vier Zinkfinger des PLZF- Proteins als interagierende Domäne in der Wechselwirkung mit Rec und Np9 zu definieren (Denne et al., 2007). Aufgrund der Homologie von 91 % (Abb. 1.6) zwischen TZFP und PLZF, besonders im Bereich der Zinkfinger, wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Diplom Biologin Martina Schmitt mehrere Deletionsmutanten des TZFP- Proteins erstellt, um die genauen Bindungsstellen zu identifizieren.

In Abb. 4.3 sind das Gesamt- TZFP sowie die Deletionsmutanten schematisch dargestellt. Die Bezeichnung der Mutanten („ohne Zn“, „ohne POZ“, „Mitte“) bezieht sich auf die Struktur ihrer Sequenz und wird im Folgenden verwendet. Das Gesamt- TZFP ist etwa 55 kDa groß. Der TZFP- Mutanten „ohne POZ“ fehlt die POZ- Domäne im N- terminalen Bereich. Ihre Sequenz beginnt in Exon I direkt hinter der POZ- Domäne und wird bis zum

Ende abgelesen, woraus sich eine Größe von 44 kDa ergibt. Die Sequenz der Mutante „ohne Zn“ beginnt am gleichen Startkodon wie das Volllängenprotein, endet jedoch unmittelbar vor dem ersten, C- terminalen Zinkfinger und umfasst 40 kDa. Die Mutante „TZFP Mitte“ enthält weder die N- terminale POZ- Domäne, noch die C- terminalen Zinkfinger. Ihre Größe beträgt 37 kDa.

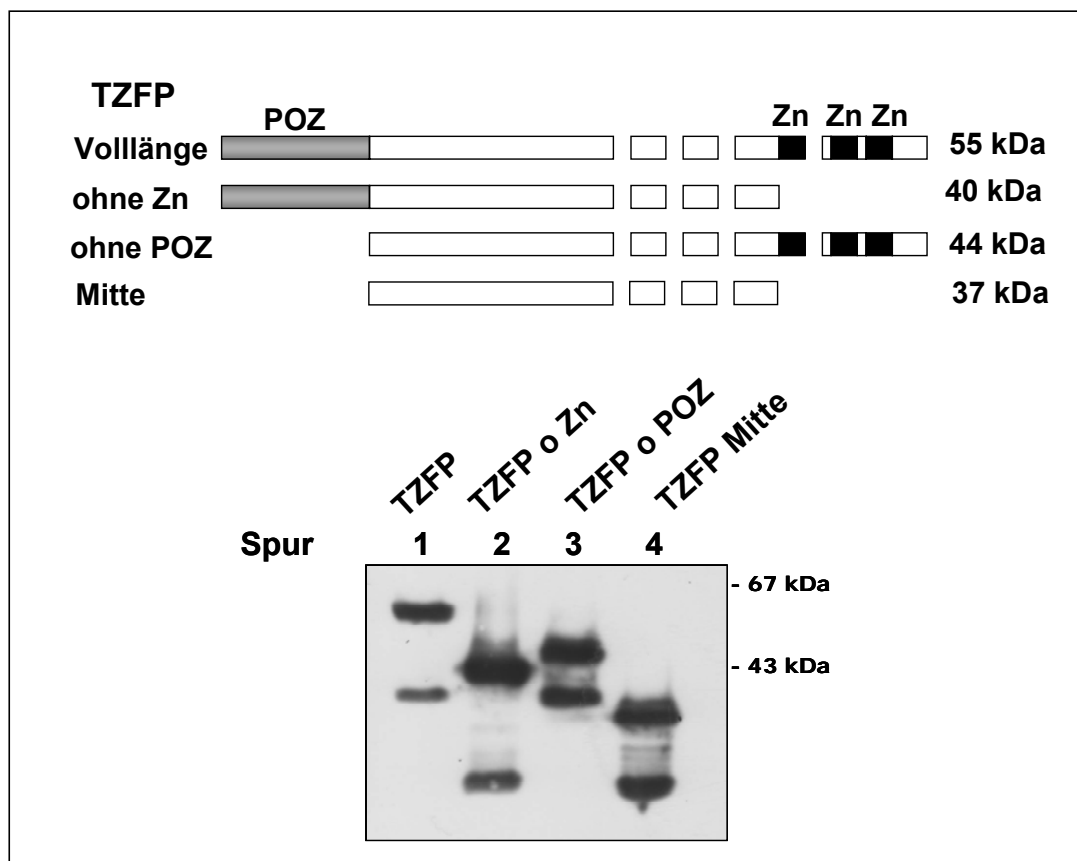


Abb. 4.3 Schematische Darstellung des Gesamt- TZFP und der Deletionsmutanten und ihr Expressionsmuster

Grau dargestellt ist der Bereich, welcher für die POZ- Domäne codiert (POZ), schwarz die Bereiche der Zinkfinger (Zn). Die fünf Exons, sowie die TZFP- Mutanten im Vergleich zum Gesamt- TZFP sind maßstabsgetreu zueinander gezeichnet. Das Gesamt- TZFP hat eine Größe von ca. 55 kDa. Für die Mutanten ergeben sich Längen von ca. 40 kDa („TZFP ohne Zn“), ca. 44 kDa („TZFP ohne POZ“) und ca. 37 kDa („TZFP Mitte“).

Um die Domäne(n) einzugrenzen, mit der / denen TZFP an Rec bindet, wurden mit Gesamt- TZFP sowie den oben dargestellten TZFP- Mutanten und dem Rec- Protein GST- Pulldown- Analysen durchgeführt. Gleichzeitig wurde auch die Bindung von TZFP und den TZFP- Mutanten an Np9 überprüft. TZFP sowie die Mutanten wurden hierzu mit Hilfe eines *in vitro*-Transkriptions- und Translationskits synthetisiert und radioaktiv markiert. Die Proteine Rec und Np9 wurden in *E.coli* BL21-DE3 als GST- Rec bzw. GST- Np9 Fusionsproteine exprimiert und Lysispufferextrakte hergestellt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden zusammen mit dem an Sepharose gekoppeltem GST- Protein als Negativkontrolle, sowie GST- Rec bzw. GST- Np9 inkubiert. Als Inputkontrolle wurden 10 % des jeweiligen Proteins auf das Gel aufgetragen. Das Ergebnis der Pulldown- Analyse ist in Abb. 4.4 dargestellt.

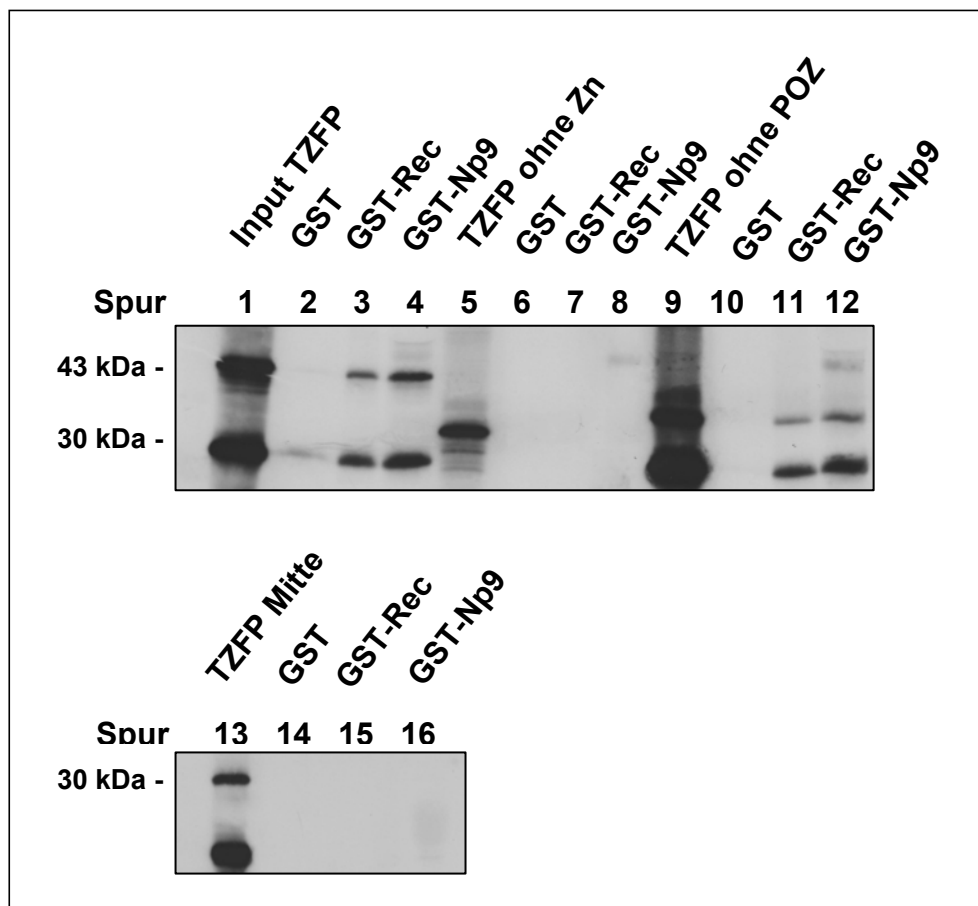


Abb. 4.4: Ergebnis der GST- Pulldown- Analyse von Rec/Np9 und Gesamt- TZFP sowie der TZFP- Deletionsmutanten

Die Autoradiographie zeigt die GST- Pulldown- Analyse der an eine Glutathion-Sepharose gekoppelten, bakteriell exprimierten GST-, GST- Rec- bzw. GST- Np9- Proteinen mit den *in vitro* synthetisiertem, ³⁵S radioaktiv markierten TZFP- Konstrukten. Zur Inputkontrolle wurde 10 % der *in vitro* synthetisierten TZFP- Proteine aufgetragen (TZFP- Spur 1-4; TZFP ohne Zn- Spur 5-8; TZFP ohne POZ- Spur 9-12; TZFP Mitte- Spur 13-16).

Die Inputkontrollen in Abb. 4.4 zeigen die *in vitro*- transkribierten und translatierten TZFP- Konstrukte (TZFP- Spur 1; TZFP ohne Zn- Spur 5; TZFP ohne POZ- Spur 9; TZFP Mitte- Spur 13). Das Volllängenprotein bindet sowohl an GST- Rec sowie an GST- Np9 (Spur 3 und 4). Auch die Deletionsmutante, welcher die POZ- Domäne fehlt („TZFP ohne POZ“) vermag an GST- Rec und GST- Np9 zu binden (Spur 11 und 12). In den Ansätzen mit GST als Negativkontrolle ließen sich keine spezifischen Proteinbanden nachweisen. Die Mutanten „TZFP ohne Zn“ und „TZFP Mitte“, welchen die Zinkfinger- Domäne fehlt, waren nicht in der Lage spezifisch an GST- Rec oder GST- Np9 zu binden. Somit wurde der potentielle Hinweis erbracht, dass die Interaktion von TZFP und den beiden HERV- K- Proteinen über den C- terminalen Bereich des Proteins funktionieren könnte.

Nachdem die Interaktionsdomäne von TZFP *in vitro* auf den C- terminalen Bereich des Proteins begrenzt werden konnte, sollte im nächsten Schritt die interagierende Domäne des Rec- Proteins durch Pulldown- Analysen definiert werden. Dazu wurden verschiedene GST- Rec- Deletionsmutanten (Abb. 4.5) (Boese et al., 2000) und das radioaktiv markierte Volllängen TZFP eingesetzt. Im unteren Teil der Abbildung 4.5 sind die eingesetzten, GST- gekoppelten Rec- Klone mit ihrer Größe skizziert. Im oberen Bereich der Abbildung ist die entsprechende Autoradiographie zu sehen. Die Inputkontrolle entspricht 10% der in einem Ansatz eingesetzten Menge an radioaktiv markiertem TZFP- Protein (Abb. 4.5; Spur 1). Wie bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben, ist Rec in der Lage an das Volllängen TZFP zu

binden (Abb. 4.5; Spur 3). Diese *in vitro* Bindungsstudie zeigte außerdem, dass TZFP an alle Rec- Deletionsmutanten binden kann (Abb. 4.5; Spur 4, 5 und 6). Eine nähere Definition der Bindungsstelle war damit allerdings im Rahmen dieses Versuchs nicht möglich.

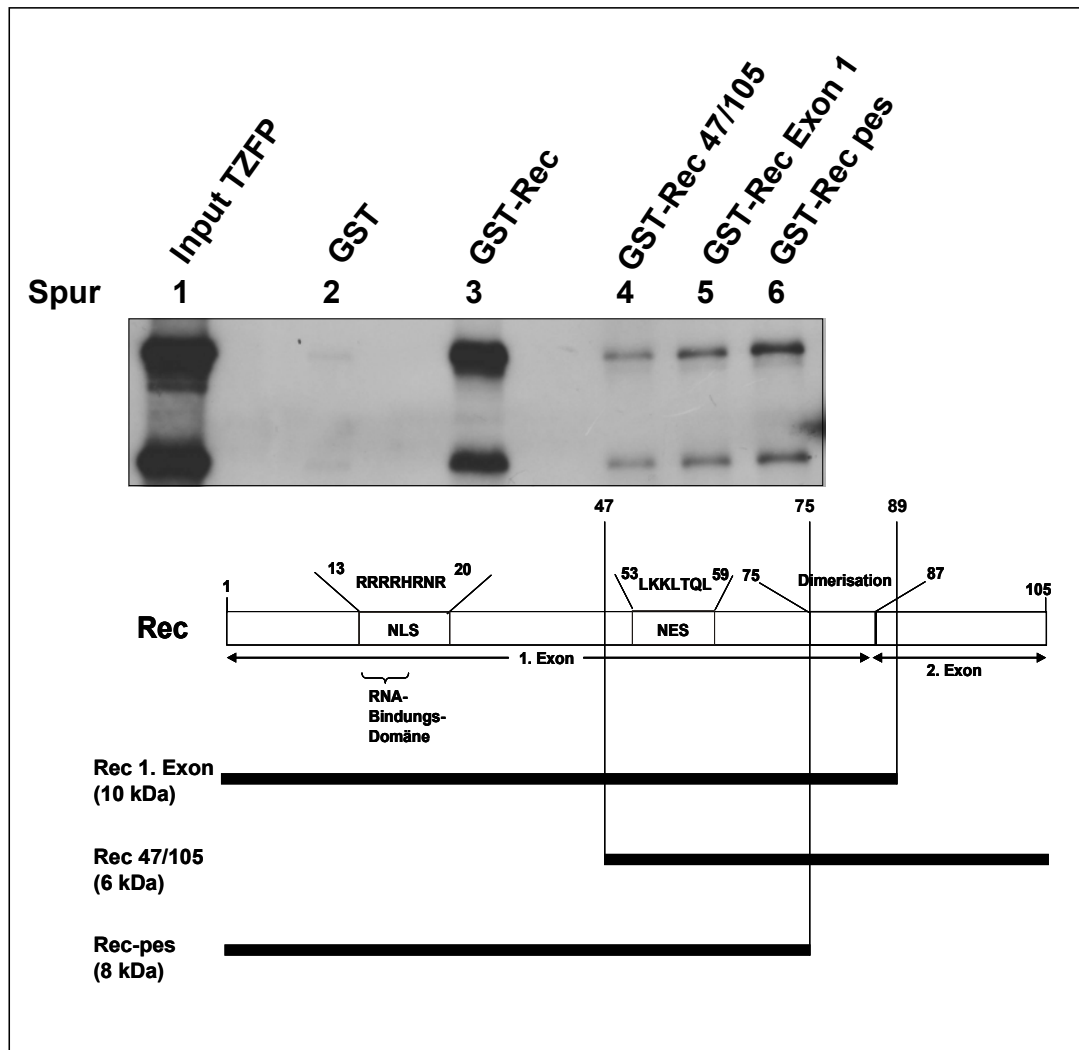


Abb. 4.5: Nachweis der Bindung zwischen TZFP und Rec und den Deletionsmutanten Rec-47/105, Rec 1. Exon und Rec-pes.

Die Autoradiographie zeigt das Ergebnis einer GST- Pulldown Analyse mit dem exprimierten GST- Rec- Derivat (Spur 3) und den GST- Rec- Deletionsmutanten (Spur 4-6) und dem *in vitro* translatierten S^{35} radioaktiv markierten Vollängen- TZFP, von dem 10% in der Inputkontrolle (Spur 1) aufgetragen wurden. GST alleine dient als Negativkontrolle (Spur 2). Im unteren Teil der Abbildung sind die Rec- Klone mit Bezeichnung und Größe schematisch dargestellt.

4.1.4 Studien zur Charakterisierung der Bindung zwischen TZFP und Rec *in vivo*

In Anlehnung an die oben beschriebenen Experimente sollten nun die Bindungen von TZFP und seinen Deletionsmutanten an Rec *in vivo* untersucht und bestenfalls bestätigt werden. Die folgende Studie beschränkt sich dabei ausschließlich auf die Charakterisierung der Bindungsstellen von TZFP, die Bindungsstellen von Rec wurden bisher nicht *in vivo* untersucht. Mit Hilfe der Coimmunopräzipitation sollte die Interaktion des TZFP-Proteins, der Deletionsmutanten und Rec *in vivo* verifiziert werden. Hierzu wurden das TZFP-Protein und die TZFP-Mutanten mit Rec in 293T-Zellen rekombinant koexprimiert. Rec wurde erneut mit einem spezifischen Rec-Antikörper präzipitiert und an Protein-G-Sepharose gekoppelt werden kann. Interagieren die TZFP-Konstrukte und Rec miteinander, bildet sich ein Sepharose-Antikörper-Protein-Protein-Komplex. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden alle Konstrukte und die entsprechenden Leervektoren in separaten Ansätzen als Kontrolle cotransfiziert. Bei allen Ansätzen wurden die Zellen 48h nach der Transfektion geerntet. Abb. 4.6 zeigt das Ergebnis von IP und Co-IP mit Rec und TZFP bzw. den mutierten TZFP-Proteinen.

nachweisen, „TZFP ohne POZ“ erscheint ebenfalls als zwei Banden einer Größe von ca. 44 kDa und 37 kDa (Spur 3, Co- IP) und „TZFP Mitte“ konnte bei etwa 30 kDa (Spur 4, Co- IP) als einzelne Bande detektiert werden. Die zunächst erwartete Bindungsdomäne in Gestalt der C- terminalen Zinkfinger konnte *in vivo* nicht bestätigt werden. Somit bleibt die genaue Bindungsstelle, welche die Protein- Interaktionen des TZFP vermittelt, weiterhin unbekannt.

4.1.5 Amplifikation von Spleißvarianten des Testis Zink Finger Proteins aus einer Testis cDNA- Bank

Um die zelluläre Bedeutung von TZFP im Menschen weiter zu erforschen, wurden aus einer Testis cDNA- Bank mehrere TZFP- Spleißvarianten amplifiziert (Diplomarbeit Martina Schmitt). Ausschlaggebend für diese Idee, war das Expressionsmuster des TZFP, welches im Western Blot stets als zwei diskrete Banden nachweisbar war. Somit stellte sich die Frage nach der Existenz von Spleißvarianten in der Zelle und darüber hinaus nach einer möglichen zellulären Bedeutung. In Abb. 4.7 sind zwei der aus der Testis cDNA- Bank amplifizierten TZFP- Spleißvarianten zusammen mit dem Gesamt- TZFP als Referenz maßstabsgetreu schematisch abgebildet.

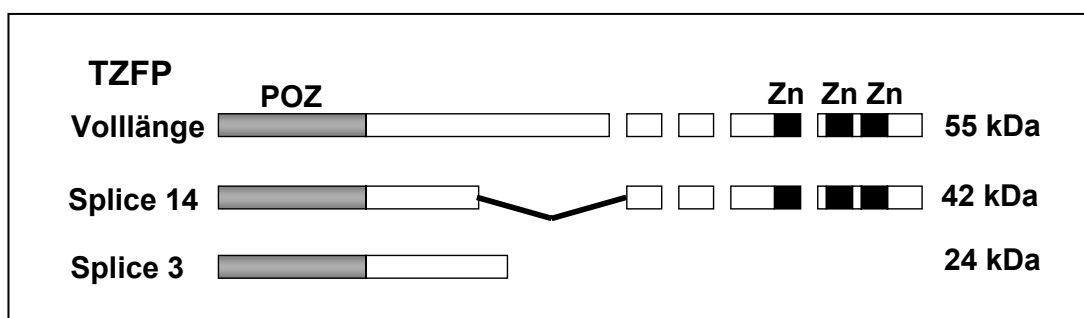


Abb. 4.7: Schematische Darstellung der aus der Testis cDNA- Bank amplifizierten TZFP- Spleißvarianten

Gezeigt sind zwei verschiedene Amplifikate im Vergleich zum Gesamt-TZFP. Die TZFP- Sequenz des Klons 3 bricht wegen eines Stopcodons, welches aus Leserasterverschiebungen resultiert nach 588 bp ab. Klon 3 besitzt eine Größe von ca. 24 kDa. Klon 14 fehlt zwischen 567 bp und 880

bp ein Teil des ersten Exons, nach diesem wird die restliche Sequenz jedoch korrekt im gleichen Raster weiter abgelesen. Klon 14 ist etwa 42 kDa groß. Die Sequenz der POZ- Domäne ist grau, die der Zinkfinger schwarz dargestellt.

4.1.6 Studien zur Bindung von Rec und den TZFP- Spleißvarianten in Glutathion- S- Transferase (GST) -Pulldown Experimenten *in vitro*

Um die TZFP- Spleißvarianten in Bezug auf die Interaktion mit den HERV-K- Proteinen Rec und Np9 zu untersuchen, wurden erneut GST- Pulldown- Analysen durchgeführt und die Konstrukte *in vitro*- transkribiert und translatiert und dabei radioaktiv markiert. Rec wurde bakteriell als GST- Rec Fusionsprotein synthetisiert. GST- Protein diente als Kontrolle. Abb. 4.8 zeigt das Ergebnis der GST- Pulldown- Analyse von Rec und den TZFP- Spleißvarianten.

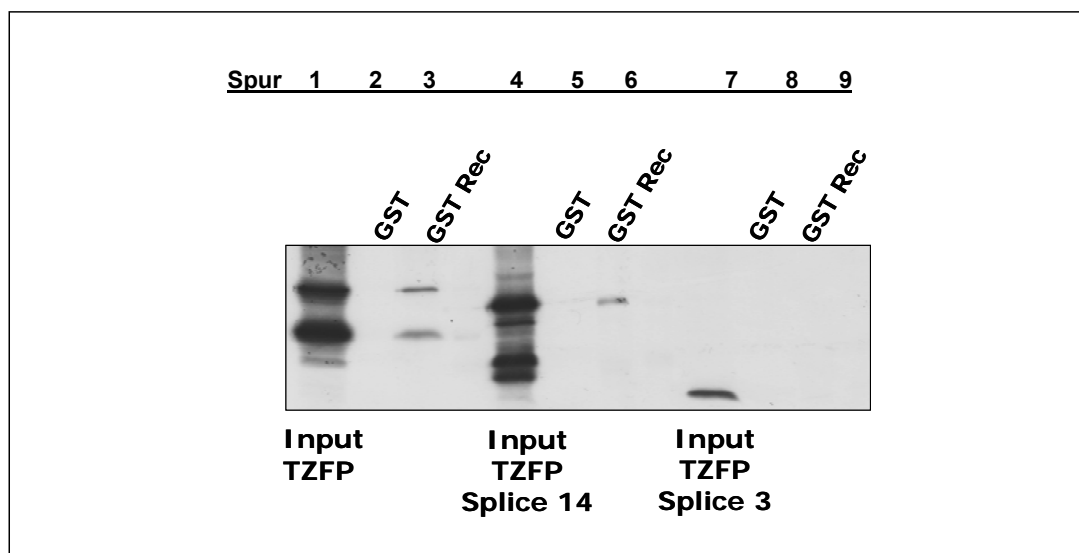


Abb. 4.8: Autoradiographie der GST- Pulldown- Analyse von Rec und den TZFP- Spleißvarianten 3 und 14

GST- Pulldown- Analyse der an eine Glutathion- Sepharose gekoppelten, bakteriell exprimierten GST- und GST -Rec- Proteinen (Spur 3, Spur 6, Spur 9) und den *in vitro*- synthetisierten, ³⁵S radioaktiv markierten TZFP- Spleißvarianten 3 und 14. Zur

Inputkontrolle wurde 1/10 der *in vitro*-synthetisierten TZFP- Varianten (Spur 1, Spur 4, Spur 7) aufgetragen.

Die Inputkontrollen in Abb.4.8 zeigen die *in vitro* transkribierten und translatierten TZFP- Konstrukte (Spur 1, 4, 7). Das TZFP- Volllängenprotein dient in diesem Versuch als Vergleich der Bindung und Größe. Wie TZFP- Gesamt (Spur 3) bindet auch die Spleißvariante 14 bindet an Rec (Spur 6). In den Ansätzen mit GST als Negativkontrolle ließen sich keine spezifischen Proteinbanden nachweisen. Für die Spleißvariante 3 lässt sich keine Bindung an Rec (Spur 9) nachweisen.

4.1.7 Studien zur Bindung zwischen HERV-K(HML-2)- Rec und den TZFP- Spleißvarianten *in vivo*

Zur Bestätigung der bereits *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse, wurde im Anschluss an die GST- Pulldown- Analyse eine Coimmunopräzipitation durchgeführt. Mit Hilfe der Coimmunopräzipitation sollte die Interaktion der TZFP- Spleißvarianten mit Rec *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden TZFP, die TZFP- Spleißvarianten und Rec in 293T-Zellen rekombinant coexprimiert. Rec wurde mit einem spezifischen Rec- Antikörper präzipitiert. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden alle Konstrukte und die entsprechenden Leervektoren in separaten Ansätzen als Kontrolle cotransfiziert (Spur 1-4). Bei allen Ansätzen wurden die Zellen 48h nach der Transfektion geerntet. Abb. 4.9 zeigt das Ergebnis von IP (oberer Teil) und Co- IP (unterer Teil) mit Rec und TZFP (Spur 5) bzw. den Spleißvarianten. Im Gegensatz zu dem Ergebnis der Pulldown- Analyse *in vitro* können *in vivo* beide Spleißvarianten mit Rec interagieren (Spur 6, Spur 7).

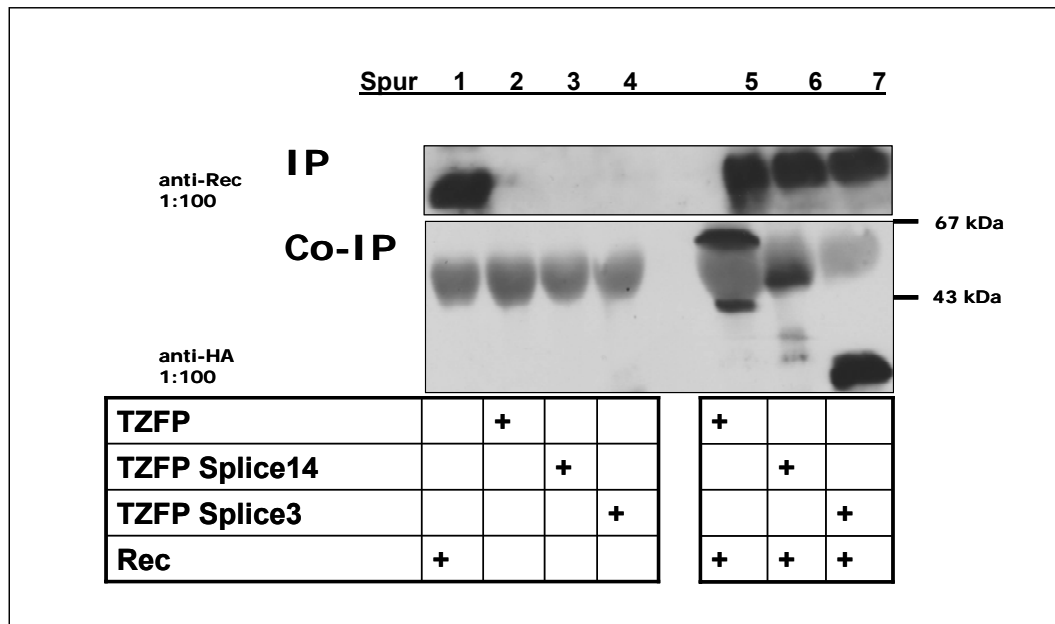


Abb. 4.9: Immunopräzipitation (IP) und Coimmunopräzipitation (Co-IP) von TZFP und den Spleißvarianten durch Rec

Gesamt- TZFP und die TZFP- Spleißvarianten 3 und 14 wurden mit Rec in 293T-Zellen rekombinant coexprimiert (Spur 5-7). Als Negativkontrollen wurden die Konstrukte mit den entsprechenden Leervektoren (pSG5-HA bzw. pSG5) cotransfiziert (Spur 1-4). Die Ansätze wurden auf SDS- Gelen aufgetrennt und in Western Blots analysiert. Im oberen Teil der Abbildung (IP) wurde der Western Blot mit Anti- Rec- Antikörper angefärbt. Im unteren Teil (Co- IP) erfolgte die Analyse mit Anti- HA- Antikörper, welcher die mit HA- getaggen TZFP- Proteine erkennt.

IP: 12,5% SDS-Gel, 1. AK: anti- Rec (1:100); 2. AK: anti- Kaninchen- Pox (1:1000)

Co- IP: 10%-SDS-Gel, 1. AK: anti- HA (1:100); 2. AK: anti- Ratte- Pox (1:1000)

4.2 Interaktion von HERV- K(HML-2) Rec, TZFP und dem humanen Androgenrezeptor

4.2.1 Studien zur Bindung von TZFP und AR in Glutathion- S-Transferase (GST)- Pulldown Experimenten *in vitro*

Ishizuka und Mitarbeiter zeigten 2005, dass TZFP aus der Maus den Androgenrezeptor (AR) zu reprimieren vermag und somit eine Interaktion besteht (Ishizuka *et al.*, 2005). Um zu überprüfen, ob diese Wechselwirkung auch zwischen dem humanen TZFP und AR existiert, wurde AR als *in vitro* transkribiertes, translatiertes und ^{35}S -markiertes Protein in ein Pulldown-Experiment eingesetzt. Hier wurde die Bindung des Androgenrezeptors an GST- TZFP im Vergleich zu GST als Kontrolle betrachtet. Abb. 4.10 zeigt das Ergebnis des Pulldown- Experiments.

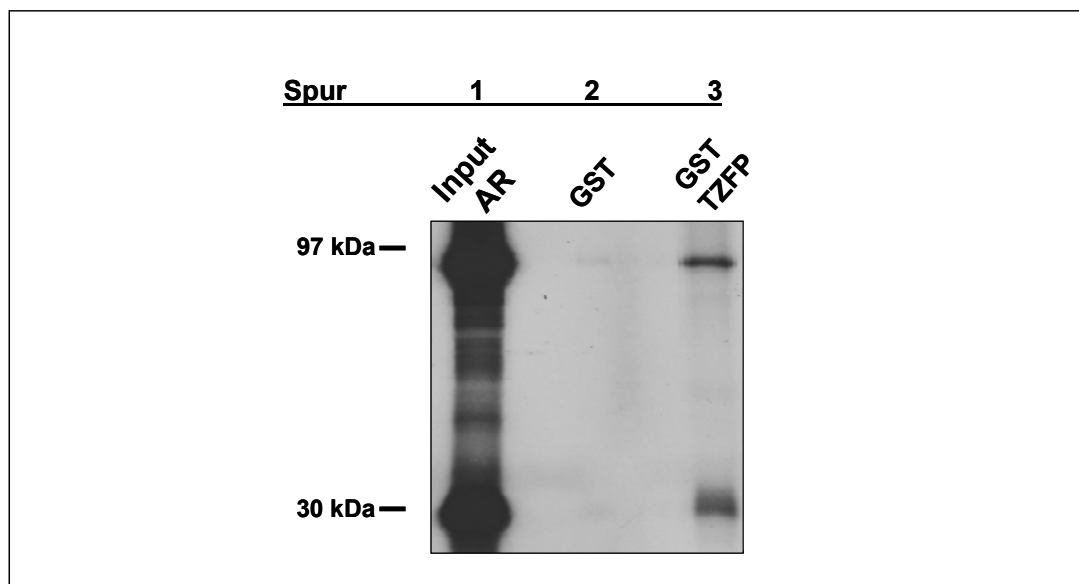


Abb. 4.10: Autoradiographie der GST- Pulldown- Analyse von TZFP und Androgenrezeptors

GST- Pulldown- Analyse der an Glutathion- Sepharose gekoppelten, bakteriell exprimierten GST- und GST –TZFP- Proteine (Spur 2 und 3) und dem *in vitro*-synthetisierten, ^{35}S radioaktiv markierten AR. Zur Inputkontrolle wurde 1/10 der *in vitro*-synthetisierten AR aufgetragen (Spur 1).

Aus Abb. 4.10 geht hervor, dass der humane Androgenrezeptor genau wie sein Maus- Analogon an GST- TZFP (Spur 3) bindet. Die Sequenzlänge des Androgenrezeptors beträgt 2,7 kb, woraus sich eine Proteingröße von etwa 100 kDa ergibt. *In vitro* können zwei Proteine mit einer Größe von ca. 100 kDa und 33 kDa nachgewiesen werden. Es besteht keine Bindung von AR an GST alleine (Spur 2).

4.2.2 Studien zur Bindung der HERV-K(HML)- Proteine Rec und Np9 mit dem Androgenrezeptor in Glutathion- S- Transferase (GST)- Pulldown Experimenten *in vitro*

Unter Betrachtung der oben beschriebenen Bindungsstudien der HERV-K-Proteine Rec und Np9 mit TZFP *in vitro* und *in vivo* und der Erkenntnis, dass das humane TZFP mit dem humanen Androgenrezeptor *in vitro* interagiert (Abb. 4.10), bestand nun der Verdacht, dass der Androgenrezeptor auch mit Rec bzw. Np9 zu interagieren vermag. Mit ³⁵S radioaktiv markiertem AR wurden dazu weitere Pulldown- Experimente durchgeführt. Dabei wurden Rec und Np9 erneut als bakteriell exprimierte GST- Fusionsproteine eingesetzt wurden. GST diente als Kontrolle. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.11 zu sehen.

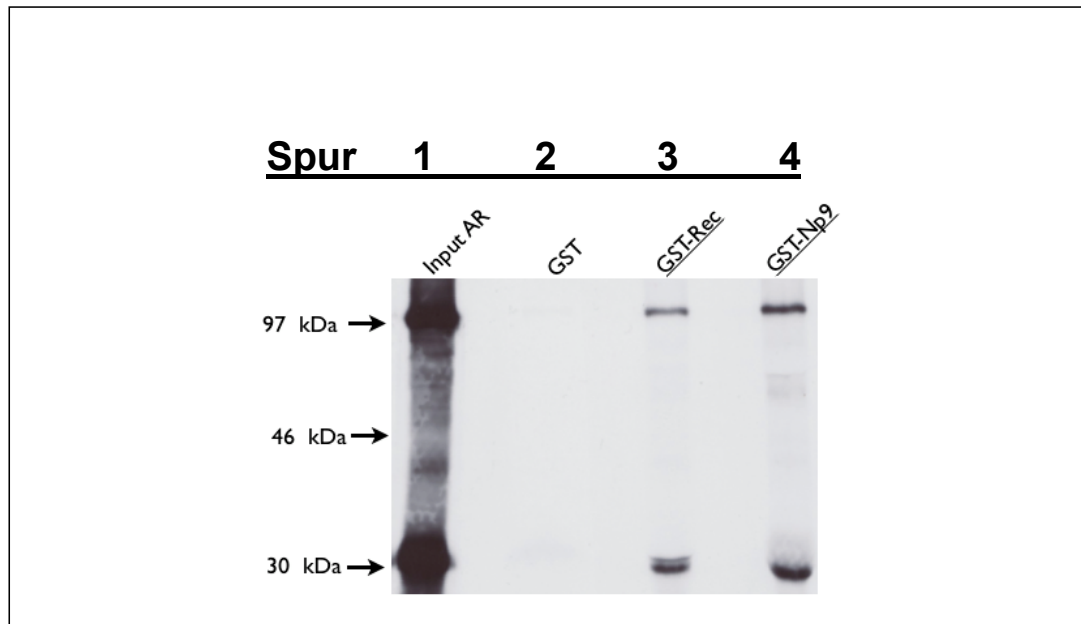


Abb. 4.11: Autoradiographie der GST- Pulldown- Analyse des humanen Androgenrezeptors und HERV-K Rec bzw. HERV-K Np9

GST- Pulldown- Analyse der an Glutathion- Sepharose gekoppelten, bakteriell exprimierten GST- und GST –Rec/Np9- Proteine (Spur 2-4) und dem *in vitro*-synthetisierten, ^{35}S radioaktiv markierten AR (Spur 1). Zur Inputkontrolle wurde 1/10 der *in vitro*- synthetisierten AR aufgetragen.

Wie in Abb. 4.11 dargestellt, bindet der AR, welcher nach bakterieller Expression in Form von zwei Proteinbanden von ca. 100 kDa und 33 kDa erscheint, sowohl an HERV-K Rec (Spur 3) als auch an HERV-K Np9 (Spur 4). GST dagegen wird nicht gebunden (Spur 2).

4.2.3 Studien zur Bindung zwischen dem humanen Testis Zinkfinger Protein TZFP und dem humanen Androgenrezeptor *in vivo*

Die in der GST- Pulldown- Analyse *in vitro* gezeigte Bindung des humanen Androgenrezeptors an das humane TZFP sollte nun auch *in vivo* bestätigt werden. Dazu wurden zwei verschiedene Coimmunopräzipitationen unter Verwendung verschiedener Antikörper durchgeführt. Hier wurde der Androgenrezeptor immunpräzipitiert und das copräzipitierte TZFP wurde nachgewiesen (Abb. 4.12)

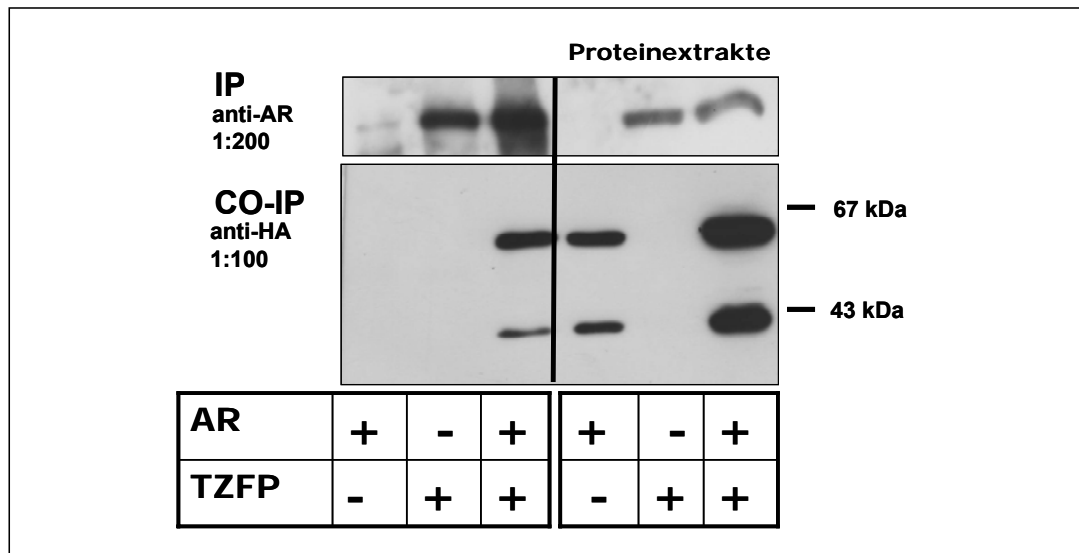


Abb. 4.12: Immunopräzipitation (IP) und Coimmunopräzipitation (Co-IP) von TZFP durch den Androgenrezeptor

Gesamt- TZFP wurde mit AR in 293T-Zellen rekombinant coexprimiert (Spur 3). Als Negativkontrollen wurden die Konstrukte mit den entsprechenden Leervektoren (pSG5-HA bzw. pSG5) cotransfiziert (Spur 1 und 2). Nach 48h wurden die Zellen lysiert und eine Immunopräzipitation mit Anti- AR- Antikörper durchgeführt. Die Ansätze wurden auf SDS- Gelen aufgetrennt und in Western Blots analysiert. Im oberen Teil der Abbildung (IP) wurde der Western Blot mit Anti- AR- Antikörper angefärbt. Im unteren Teil (Co- IP) erfolgte die Analyse mit Anti- HA- Antikörper, welcher das mit HA- getaggten TZFP erkennt. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Proteinexpression der verwendeten Proteine.

IP: 10%-SDS-Gel; 1. AK: anti-AR 1:200; 2. AK: anti- Kaninchen- Pox (1:1000)

Co- IP: 10%-SDS-Gel; 1. AK: anti-HA 1:100 ; 2. AK: anti- Ratte- Pox (1:1000)

Der Androgenrezeptor kann in der IP durch einen spezifischen anti- AR- Antikörpers im Bereich von etwa 100 kDa nachgewiesen werden (IP in Abb. 4.12 oben, Spur 2 und 3). TZFP lässt sich in der Co- IP als spezifische Proteine der Größen 55 kDa und 37 kDa nachweisen (Co- IP in Abb. 4.12 unten, Spur 3). Entsprechende Kontrollen mit den Vektoren bestätigen, dass keines der beiden Proteine in der Lage ist, unspezifisch an zelluläre Proteine zu binden (Spur 1 und 2). Die Bindung der beiden Proteine *in vitro* konnte somit *in vivo* verifiziert werden. TZFP bindet den Androgenrezeptor *in vivo*. In einem weiteren, nicht dargestellten Versuch wurde das HA- getaggte TZFP durch einen HA- Antikörper immunpräzipitiert und der coimmunpräzipitierte Androgenrezeptor nachgewiesen (Daten nicht gezeigt; siehe Diplomarbeit Martina Schmitt). Auch diese Versuchsanordnung bestätigte die Wechselwirkung zwischen TZFP und AR.

4.2.4 Studien zur Bindung zwischen dem humanen Testis Zinkfinger Protein TZFP, dem humanen Androgenrezeptor und HERV-K(HML2)- Rec *in vivo*

Nachdem die einzelnen Proteine in den Experimenten zuvor auf eine Interaktion miteinander *in vitro* und *in vivo* untersucht worden waren, sollten im nächsten Schritt potentielle Auswirkungen der Coexpression der drei Proteine gleichzeitig analysiert werden. Dazu wurden Coimmunopräzipitationen durchgeführt. TZFP, AR und HERV-K- Rec wurden in 293T-Zellen rekombinant coexprimiert (Abb. A, Ansatz 7). AR wurde mit einem spezifischen anti- AR- Antikörper präzipitiert. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden alle Konstrukte und die entsprechenden Leervektoren in separaten Ansätzen als Kontrolle cotransfiziert (A, Ansätze 1-6). Bei allen Ansätzen wurden die Zellen 48h nach der Transfektion geerntet. Abb. 4.13 A zeigt das Ergebnis der IP (oberer Teil der Abbildung A) und die Ergebnisse der beiden entsprechenden Co- IPs (unterer Teil der Abbildung A).

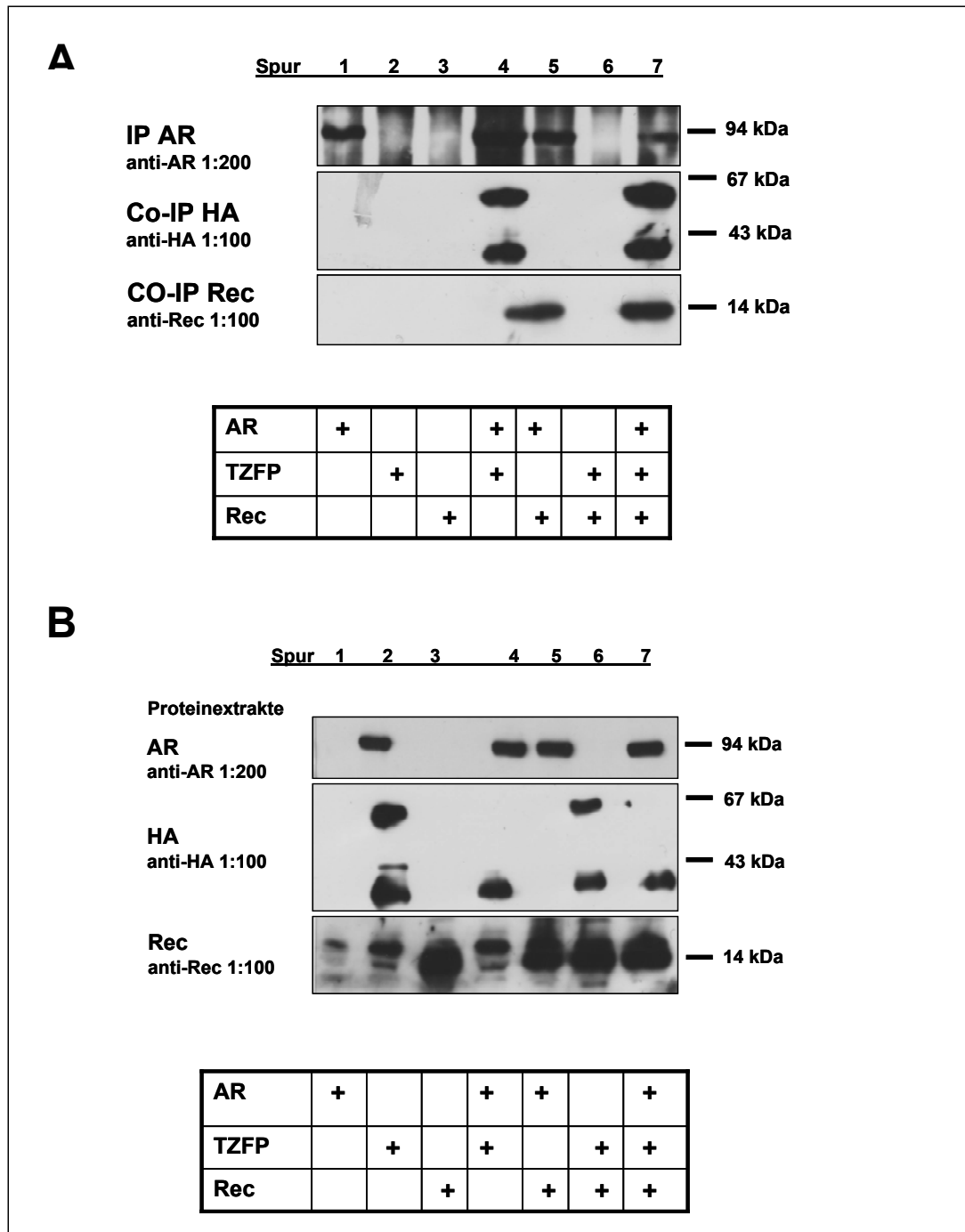


Abb. 4.13 Immunopräzipitation und Coimmunopräzipitation von AR, TZFP und Rec

Gesamt- TZFP und AR wurden mit Rec in 293T-Zellen rekombinant coexprimiert (Spur 7 A/B). Als Negativkontrollen wurden die Konstrukte mit den entsprechenden Leervektoren (pSG5-HA bzw. pSG5) cotransfiziert (Spur 1-6 A/B). Nach 48h wurden die Zellen lysiert und eine Immunopräzipitation mit Anti- AR- Antikörper durchgeführt (Abb. A). Die Ansätze wurden auf SDS- Gelen aufgetrennt und in Western Blots analysiert. Im oberen Teil der Abbildung A (IP) wurde der Western Blot mit anti- AR-

Antikörper angefärbt. In den beiden unteren Teilen der Abbildung A (Co-IP) erfolgte die Analyse der Western Blots zum einen mit anti- HA- Antikörper und zum anderen mit anti- Rec- Antikörper. Abbildung B zeigt die jeweils entsprechenden Proteinextrakte zum Nachweis einer korrekten Expression der Proteine.

IP: 10% SDS-Gel, 1. AK: anti- AR (1:100); 2. AK: anti- Kaninchen- Pox (1:1000)

Co-IP: 10%-SDS-Gel, 1. AK: anti- HA (1:100); 2. AK: anti- Ratte- Pox (1:1000)

Co-IP: 12,5%-SDS-Gel, 1.AK: anti- Rec (1:100); 2.AK: anti- Kaninchen- Pox (1:1000)

Wie in Abbildung 4.13 A ersichtlich, konnten TZFP und Rec durch AR kopräzipitiert werden (Spur 7). AR ist in der IP (oberer Teil der Abb. A) bei einer Höhe von ca. 100 kDa zu sehen (Spur 1, 4, 5, 7; IP), TZFP- Gesamt erscheint als zwei diskrete Banden einer Größe von etwa 55 kDa und 37 kDa (Spur 4 und Spur 7, Co- IP, Abb. A) und das 14 kDa große Rec ist in der zweiten Co- IP in Spur 5 und 7 sichtbar (Abb. A). Somit konnte die Bindung der Proteine *in vivo* ein weiteres Mal verifiziert werden und zudem neue Erkenntnisse bezüglich der Wechselwirkung miteinander gewonnen werden. Werden AR, TZFP und HERV-K(HML-2) Rec koexprimiert bilden die Proteine einen trimeren Komplex.

4.3 Funktionelle Analyse der Interaktionen von HERV- K(HML-2)- Rec, dem Testis Zink Finger Protein TZFP und dem humanen Androgenrezeptor

4.3.1 Der *c-myc* Promotor

4.3.1.1 TZFP reprimiert *c-myc*

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 sowohl die DNA- Bindung über die Zinkfingerdomäne als auch eine Assoziation der POZ- Domäne mit Korepressorproteinen wie N-CoR, SMRT, Sin3A and HDAC1 (David et al., 1998; Grignani et al., 1998; He et al., 1998; Hong et al., 1997; Lin et al., 1998). Galli et al. konnten 2005 zeigen, dass Rec- transgene Mäuse Neoplasien ausbilden. Daher ist es von Bedeutung, dass PLZF als Interaktionspartner von Rec mit dem *c-myc*- Promotor interagiert. Die Expression des Onkogens *c-myc* wird über eine direkte Bindung an den *c-myc*- Promotor reguliert und reprimiert (McConnell et al., 2003). Da c-Myc in fast allen menschlichen Tumoren aktiv ist, vermutet man, dass es eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Entwicklung von Tumoren spielt. Die Aktivität des Proto- Onkogens *c-myc* beeinflusst Zellzyklus, Zellwachstum und Apoptose in Vertebratenzellen (Patel et al., 2004). 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. Ist die PLZF- Bindungsstelle des *c- myc*- Promotors intakt, bindet PLZF also direkt an den Promotor und inhibiert die Expression des c-Myc Proteins (McConnell et al., 2003). Denne et al. konnten dieses Ergebnis belegen und darüber hinaus zeigen, dass in Anwesenheit von Rec oder Np9 jene durch PLZF vermittelte Repression aufgehoben wird (Denne et al., 2007). Dieses Ergebnis wurde in Luciferase- Assays als auch auf Proteinebene im Western Blot verifiziert. Weiterhin war es im Western Blot möglich, eine veränderte Expression der durch c-Myc regulierten Gene p53, PCNA und IKB- α in Ab- und Anwesenheit von Rec und PLZF nachzuweisen.

Aufgrund des hohen Grades an struktureller Homologie der Proteine TZFP und PLZF besteht der Verdacht, dass sie möglicherweise die gleichen Interaktionspartner und vielleicht sogar ähnliche biologische Wirkungsmechanismen besitzen.

Um diese Vermutung zu bestätigen und die zelluläre Funktion von TZFP weiter zu erforschen, wurden im folgenden Luciferase- Assays durchgeführt. In einem Luciferase- System wurden die *c-myc* Promotoren *cmyc2.5* und *cmyc2.5ΔPLZF* (freundlicherweise von Jonathan D. Licht zur Verfügung gestellt) und das Volllängen- TZFP eingesetzt. 293T Zellen wurden in 24 Loch Platten ausgesät und mit den Promotoren *cmyc2.5* (Abb. 4.14) und *cmyc2.5ΔPLZF* (Abb. 4.15) transfiziert. Der Promotor *cmyc2.5* enthält eine direkte *in vitro* Bindungsstelle für das PLZF- Protein, wohingegen diese Stelle in dem Promotor *cmyc2.5ΔPLZF* mutiert vorliegt. Die Zellen wurden mit pSG5 als Vektorkontrolle und pSG5- TZFP cotransfiziert. 42-45 Stunden nach Transfektion wurden die lysierten Zellen am Lumat LB9501- Luminometer (Berthold) gemessen und die Werte anhand der entsprechenden, am FACS gemessenen Transfektionseffizienzen relativiert. Luciferase dient dabei als Reporterprotein zum Nachweis der Transkriptionsaktivität solcher Zellen, welche erfolgreich mit dem Reporter- Luciferase- Konstrukt transfiziert wurden. Die am FACS erhaltenen Werte der Transfektionseffizienz basieren auf der Fluoreszenzintensität der Zellen aufgrund des cotransfizierten pEGFP- Vektors

Zur FACS- Messung wurden zusätzlich in jedem Ansatz 100 ng EGFP Vektor cotransfiziert. 100 µl der Kulturen wurden mit 100µl FACS- Fixierlösung versetzt und bis zur Messung lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Diese Versuchsanordnung wurde auch in folgenden Reporter- Experimenten gewählt und wird darum nachfolgend nicht mehr explizit beschrieben. In Abbildung 4.14 ist zu sehen, dass TZFP den *c-myc*- Promotor mit intakter PLZF- Bindungsstelle bis zu 70 % zu reprimieren vermag. Dabei steigt das Maß der Repression mit der Menge des eingesetzten Effektor- Plasmids pSG5- TZFP.

Bei 1 µg pSG5- TZFP ist die maximale Repression erreicht. Größere Effektor- Plasmid- Mengen führten nicht zu einer weiteren Steigerung der Repression (Daten nicht gezeigt).

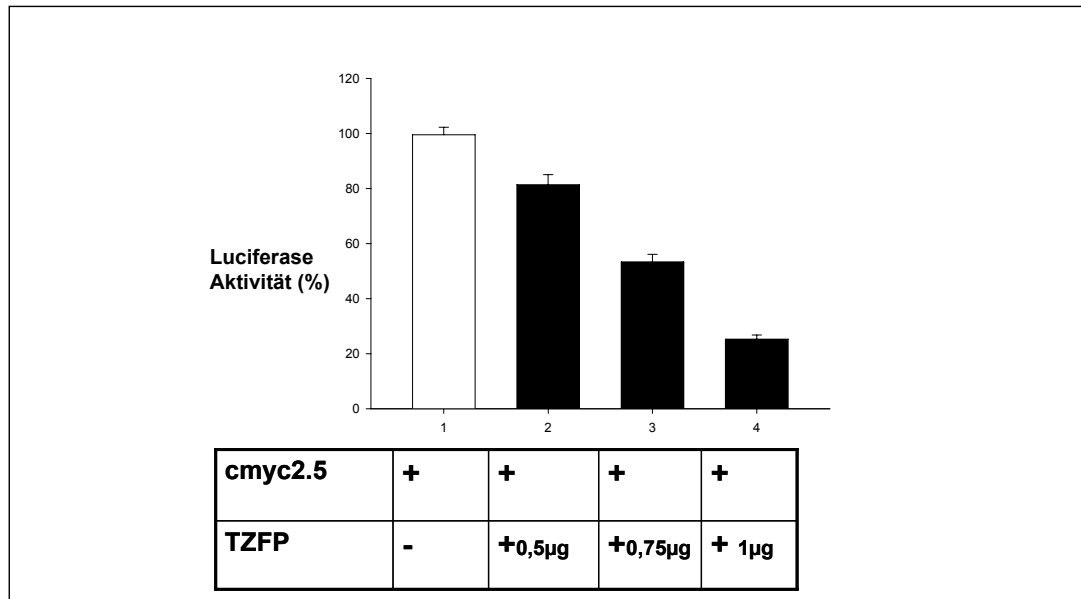


Abb. 4.14: TZFP reprimiert den *c-myc*- Promotor

293T Zellen wurden mit dem Reporter- Plasmid *cmyc2.5* und entweder mit dem leeren Vektor pSG5 als Negativkontrolle (weißer Balken Ansatz 1) oder mit dem Effektor- Plasmid pSG5- TZFP (schwarze Balken, Ansatz 2-4) transient kotransfiziert. Die Ansätze 2-4 unterscheiden sich lediglich in der eingesetzten Menge an Effektor- Plasmid. Die unter dem Balkendiagramm befindliche Tabelle gibt die jeweils transfizierten Konstrukte an (+). 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 drei unabhängigen Experimenten errechnet (Sigma Blot 4.01 TM).

Wird der bindungsdefekte *c-myc*- Promotor eingesetzt, findet keine messbare Repression statt (Abb. 4.15). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die durch EMSA- Analysen entdeckte PLZF- Bindungsstelle nicht nur für die PLZF vermittelte Repression (McConnell et al., 2003), sondern auch für die TZFP vermittelte Repression des *c-myc*- Promotors essentiell ist. Beide Transkriptionsfaktoren scheinen sich derselben Bindungsstelle zu bedienen und vermitteln, bezogen auf *c-myc*, einen tendenziell identischen Effekt.

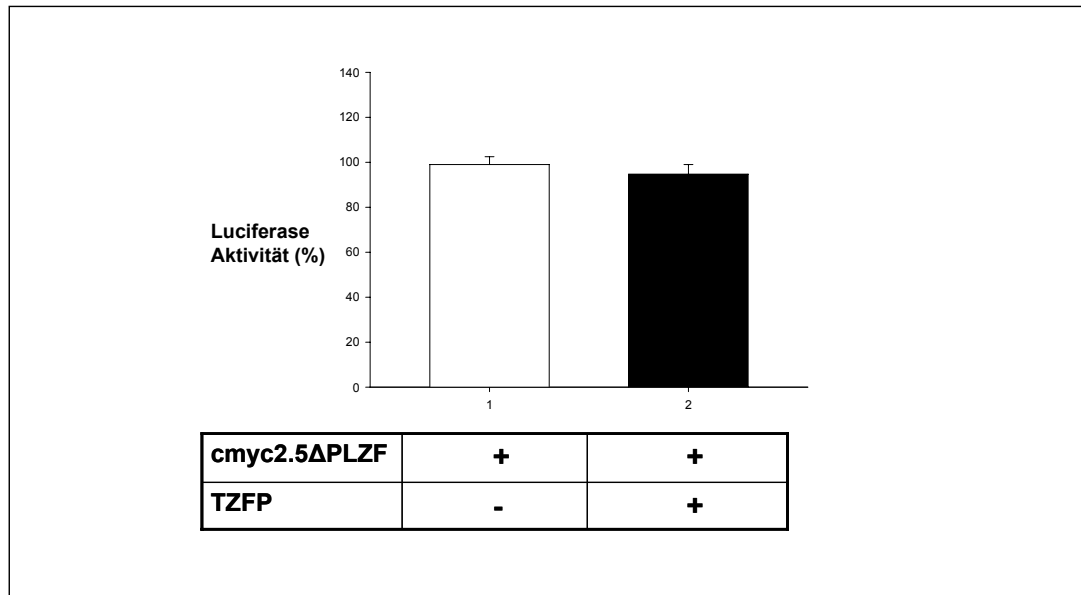


Abb. 4.15: Bei Verwendung des cmyc2.5ΔPLZF- Promotors mit defekter PLZF- Bindungsstelle erfolgt keine durch TZFP vermittelte Repression

293T Zellen wurden mit dem bindungsdefekten Reporter- Plasmid cmyc2.5ΔPLZF (Ansatz 1,2), und entweder mit dem leeren Vektor als Negativkontrolle (weißer Balken, Ansatz 1) oder mit dem Effektor- Plasmid pSG5- TZFP (schwarzer Balken, Ansatz 2) transient cotransfiziert . Die unter dem Balkendiagramm befindliche Tabelle gibt die jeweils transfizierten Konstrukte an (+). Die Luciferase- Aktivität wurde 42-45 Stunden nach Transfektion gemessen. Die relative Luciferase- Aktivität wurde in Prozent angegeben. Die Fehlerbalken der Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet (Sigma Blot 4.01 TM).

4.3.1.2 HERV-K(HML-2)- Rec inhibiert die durch TZFP vermittelte Repression des *c-myc*- Promotors

Um nun zu untersuchen, ob Rec einen Effekt auf die funktionelle Wechselwirkung zwischen TZFP und *c-myc* hat, wurden Cotransfektionen und anschließend Luciferase- Assays durchgeführt.

Als Promotorkonstrukt diente dabei das Reporter- Plasmid *cmcy2.5* mit der direkten *in vitro* Bindungsstelle für das PLZF- Protein. 293 T- Zellen wurden jeweils mit pSG5 als Vektorkontrolle und pSG5- TZFP, sowie in den jeweiligen Ansätzen (s. Abb. 4.16) mit pSG5- Rec transfiziert. In Abbildung 4.16 ist neben der TZFP vermittelten Repression des *c-myc*- Promotors (Ansatz 2) auch der Einfluss von Rec auf die Interaktion sichtbar. Während die Expression von Rec alleine keine Auswirkung auf die Luciferase- Produktion hatte (Ansatz 3), wird bei einer Coexpression des Reporter- Plasmids *c-myc* und der beiden Effektor- Plasmide der reprimierende Effekt von TZFP durch HERV-K Rec deutlich verringert (Ansatz 4).

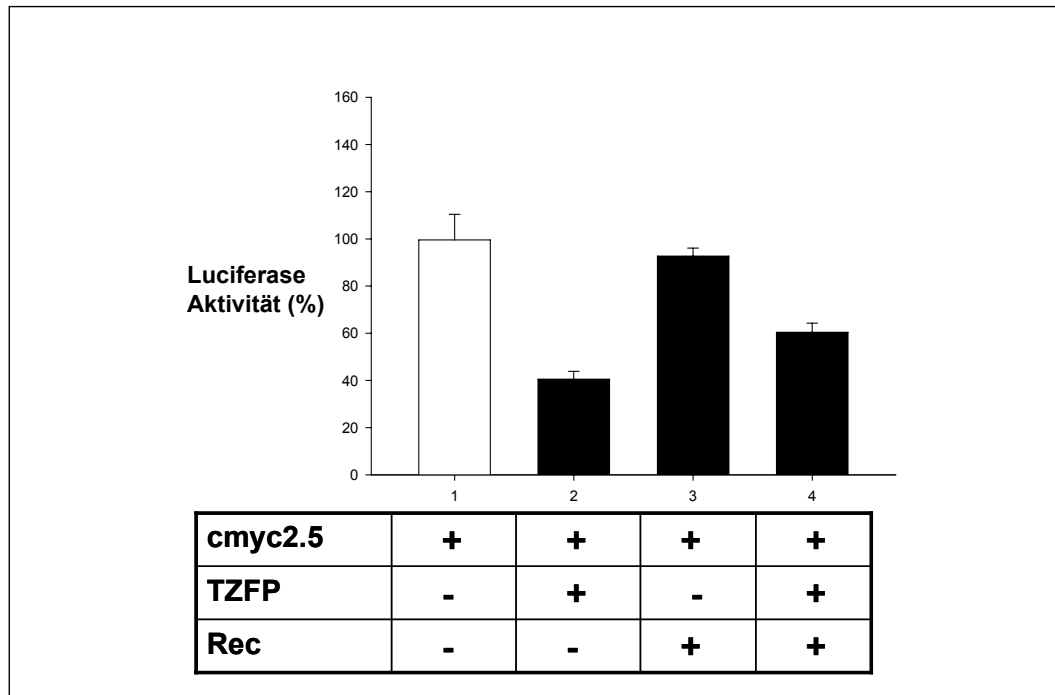


Abb. 4.16: HERV-K(HML-2)- Rec vermindert den reprimierenden Effekt von TZFP auf *c-myc*

293T Zellen wurden mit dem Reporter- Plasmid *cmyc2.5* (Ansatz1-4), mit dem leeren pSG5-Vektor als Negativkontrolle (Ansatz 1) und/oder mit den Effektor- Plasmiden pSG5- TZFP (Ansatz 2,4) und pSG5- Rec (Ansatz 3,4) transient cotransfiziert. Die unter dem Balkendiagramm befindliche Tabelle gibt die jeweils transfizierten Konstrukte an (+). Die Luciferase- Aktivität wurde 42-45 Stunden nach Transfektion gemessen. Die relative Luciferase- Aktivität wurde in Prozent angegeben und die Fehlerbalken der Standardabweichungen wurden mit Hilfe des Programms Sigma Blot 4.01 TM aus drei unabhängigen Experimenten errechnet.

4.3.2 Der MMTV- Luc- Promotor

Androgene und der Androgenrezeptor sind sehr wichtig für die Differenzierung, Entwicklung und Aufrechterhaltung der männlichen Fortpflanzungsfunktionen, aber auch der nicht-reproduktiven Organe (Trapman und Brinkmann, 1996; Jenster 1999). Ikeda et al. konnten bereits im Mausmodell zeigen, dass die Expression des Androgenrezeptor durch den Transkriptionsrepressor TZFP reprimiert wird (Ikeda et al, 2005). Des Weiteren bestätigen die vorliegenden Bindungsstudien (Abb. 4.9, 4.11) eine Interaktion von humanem TZFP und humanem AR *in vitro* und *in vivo*. Um die Wechselwirkung des Androgenrezeptors mit TZFP funktionell näher charakterisieren zu können, wurden Luciferase- Reporter- Assays durchgeführt. Als Reporter- Plasmid diente dabei MMTV- Luc, welches freundlicherweise von Robert Schüle (Tumorbiologie Freiburg) zur Verfügung gestellt worden ist. Dieses Konstrukt enthält zusätzlich zu dem Luciferasegen eine hoch affine AR- Bindungsstelle. Die Luciferase dient dabei als Reporterprotein zum Nachweis der Transkriptionsaktivität solcher Zellen, welche erfolgreich mit dem MMTV- Luciferase- Konstrukt transfiziert wurden.

4.3.2.1 Der Androgenrezeptor aktiviert das MMTV- Luc- Reportergen Repression der AR- vermittelten Transaktivierung durch TZFP

293T-Zellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und mit dem MMTV- Luc- Konstrukt, dem Androgenrezeptor, sowie pEGFP zur späteren FACS-Messung transfiziert. Als Kontrolle wurde pSG5 als Leervektor eingesetzt. 24 h nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium mit 10^{-5} M Androgen ((5-alpha, 17-beta))-17-Hydroxy-androstan-3-on, Sigma) versetzt. Wegen seiner Androgen- Abhängigkeit kann der AR nur in Anwesenheit von Androgen aktiviert werden, in den Nukleus der Zelle translozieren und seine Wirkung auf Zielgene ausüben (Cato und Peterzierl, 98). Weitere 24 h später wurden die Zellen geerntet und nach Lysieren an Lumat und FACS vermessen.

Abb. 4.17 zeigt, dass der Androgenrezeptor nach Aktivierung durch Androgen den Promotor des MMTV- Luc- Konstrukts um das Dreifache aktiviert.

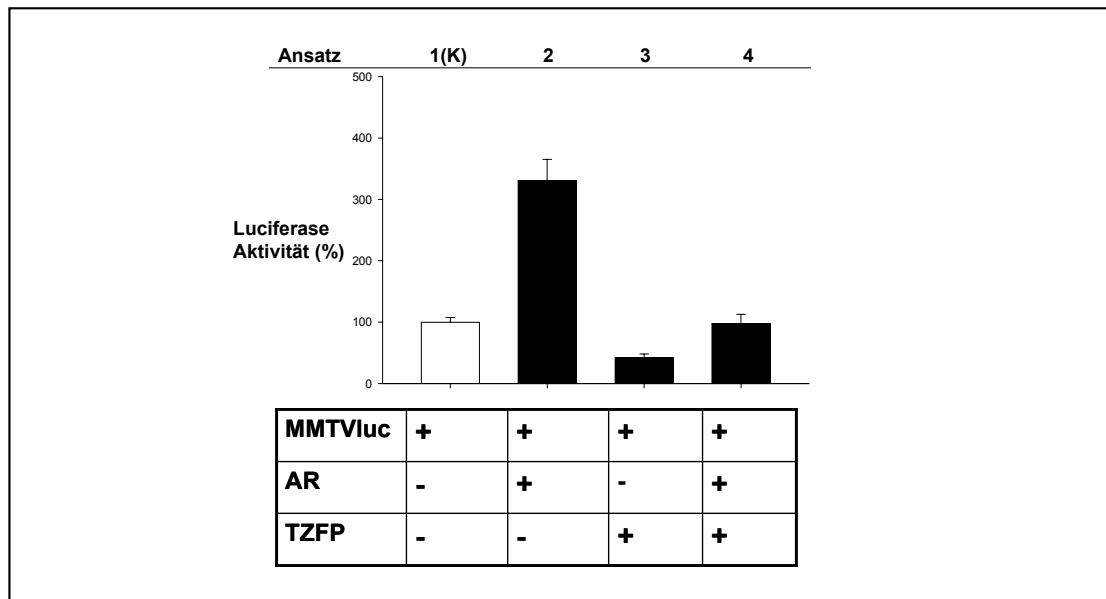


Abb. 4.17: TZFP beeinflusst die Aktivierung des MMTV- Luc- Promotors durch den Androgenrezeptor

293T Zellen wurden mit pEGFP, dem MMTV- Luc- Konstrukt und den Konstrukten (pSG5-HA)-TZFP und (pSG5)-AR transfiziert. Mit pSG5 transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die unter dem Balkendiagramm

befindliche Tabelle gibt die jeweils transfizierten Konstrukte an (+)24 h nach der Transfektion wurde das Medium mit 10^{-5} M Androgen angereichert und weitere 24 h später nach Zelllyse die Luciferase- Aktivität vermessen. Die Fehlerbalken der Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet (Sigma Blot 4.01 TM).

Bei einfacher Transfektion mit TZFP ist bereits eine Repression der MMTV-Luc- Aktivität messbar (Ansatz 3). Werden AR und TZFP cotransfiziert (Ansatz 4), ergibt sich eine starke Repression der Aktivierung des MMTV-Luc- Reportergens um etwa das Dreifache. Die in Ansatz 2 beschriebene Aktivierung durch AR wird durch TZFP also nahezu vollständig aufgehoben (Ansatz 4). TZFP vermittelt seine Repression folglich nicht nur in schwacher Form direkt über den Promotor, sondern ganz wesentlich über eine Interaktion mit dem Androgenrezeptor.

4.3.2.2 Einfluss von HERV-K(HML-2)- Rec auf die Wechselwirkung zwischen AR und TZFP

Die oben beschriebenen Bindungsstudien deuten bereits auf eine funktionelle Interaktion der Proteine TZFP, AR und Rec (Abb. 4.13) hin. Da der reprimierende Effekt von TZFP auf AR bereits bewiesen werden konnte (Abb. 4.17), soll nun der Einfluss von Rec auf die bestehende Wechselwirkung geklärt werden. Dazu wurden Reporter- Assays mit dem Reporter- Plasmid MMTV- Luc und den Effektor- Plasmiden Rec, TZFP und AR in 293 T Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.18 dargestellt.

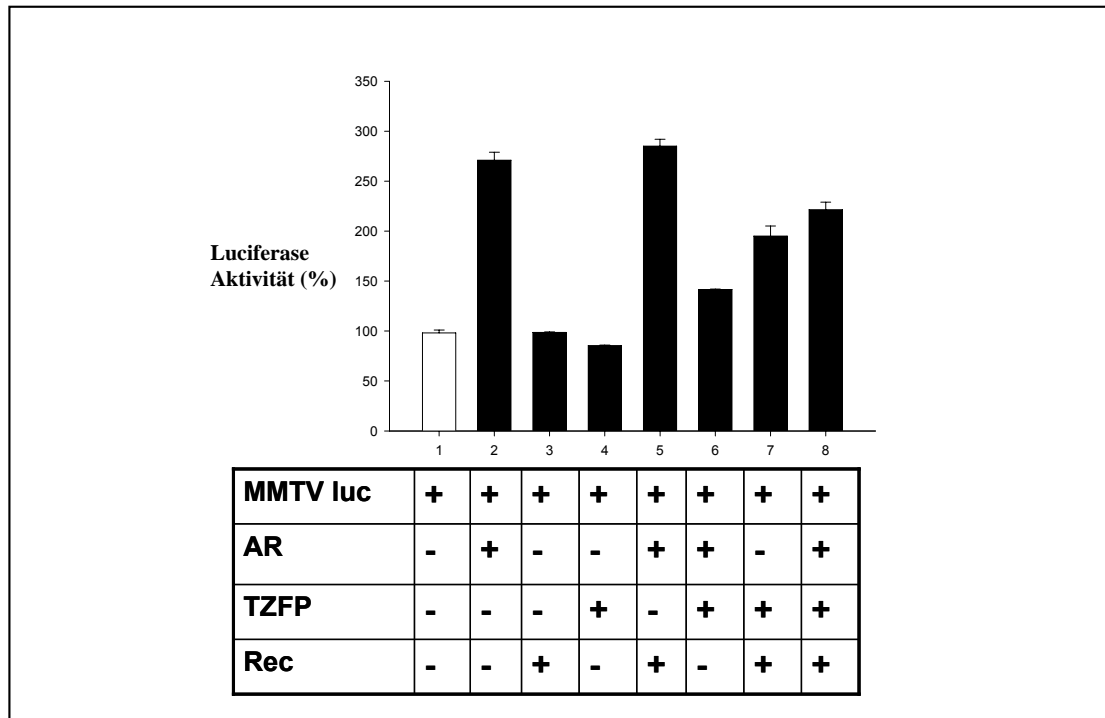


Abb. 4.18: Rec hebt die reprimierende Wirkung von TZFP auf den Androgenrezeptor auf

293T-Zellen wurden mit pEGFP, dem MMTV- Luc- Konstrukt und den Effektor-Plasmiden AR, TZFP bzw. Rec cotransfiziert. Das MMTV- Luc- Konstrukt (400 ng) wurde in alle Ansätzen transfiziert. Mit pSG5 transfizierte Zellen dienten als Kontrolle (Ansatz1). Die unter dem Balkendiagramm befindliche Tabelle gibt die jeweils transfizierten Konstrukte an (+). 24 h nach der Transfektion wurde das Medium mit 10^{-5} M Androgen versetzt und weitere 24 h später nach Zellyse die Luciferase- Aktivität vermessen. Die Höhe des Balkens gibt die Luciferase- Aktivität in Prozent an. Die Fehlerbalken der Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet (Sigma Blot 4.01 TM).

Abb. 4.18 zeigt erneut die durch AR erreichte Aktivierung (Ansatz 2) des MMTV- Luc- Gens und ebenso die durch TZFP vermittelte Repression (Ansatz 6). Rec (Ansatz 3) und TZFP (Ansatz 4) alleine haben, wie auch der pSG5- Leervektor (Ansatz 1), keinen Einfluss auf die Aktivität des Luciferasegens. Werden AR und Rec cotransfiziert (Ansatz 5) zeigt sich eine ähnlich hohe Aktivierung des MMTV- Luc- Gens wie bei einfacher Transfektion mit AR (Ansatz 2). Der Ansatz mit TZFP und Rec als Kontrolle zeigt eine erstaunlich hohe Luciferase- Aktivität (Ansatz 7). In Ansatz 8 sind

sowohl TZFP und AR als auch Rec enthalten. Im Vergleich zu Ansatz 2 ist eine Verminderung der Luciferase- Aktivität sichtbar. Gleichzeitig ist jedoch eine Erhöhung der durch TZFP vermittelten Repression des Androgenrezeptors (Ansatz 6) bemerkbar. Schlussfolgerung daraus ist, dass Rec die durch TZFP vermittelte Aktivitätsminderung des Androgenrezeptors partiell aufhebt. Rec inhibiert somit den Repressor- Effekt von TZFP und wirkt damit als De- Repressor.

4.3.3 Der PSA- Luc- Promotor

Die Expression des Prostata spezifischen Antigens (PSA) wird durch Androgene über den Androgenrezeptor reguliert (Young et al., 1991). Nach Bindung des Androgens, transloziert der AR in den Nukleus und bindet dort die AREs (*Androgen Responsible Elements*), welche in dem PSA- Promotor enthalten sind (Yeung et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits die rein physikalische Interaktion (Abb. 4.10, 4.12), aber auch eine funktionelle Wechselwirkung (Abb. 4.17, 4.18) zwischen TZFP, AR und Rec bewiesen werden. Um den molekularen Mechanismus dieser bestehenden Interaktionen näher definieren zu können und um die Bedeutung dieser Interaktion zu verstehen, wurde neben dem MMTV- Luc- Reporter- Konstrukt zusätzlich das PSA- Luc- Reporter- Konstrukt eingesetzt. Es wurden erneut, wie oben beschrieben, Luciferase- Reporter- Assays durchgeführt. PSA- Luc wurde freundlicherweise von Robert Schüle (Tumorbiologie Freiburg) zur Verfügung gestellt. Dieses Konstrukt enthält neben dem Luciferasegen eine hoch affine AR- Bindungsstelle. Die Luciferase dient dabei als Reporterprotein zum Nachweis der Transkriptionsaktivität solcher Zellen, welche erfolgreich mit dem PSA- Luciferase- Konstrukt transfiziert wurden.

4.3.3.1 Der Androgenrezeptor aktiviert das PSA- Luc- Reportergen Repression des Androgenrezeptors durch TZFP

293T Zellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und mit dem PSA- Luc- Konstrukt, dem Androgenrezeptor, sowie pEGFP zur späteren FACS-Messung transfiziert. Als Kontrolle wurde an Stelle des Androgenrezeptors pSG5 als Leervektor eingesetzt. 24 h nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium zur Aktivierung des AR mit 10^{-5} M Androgen ((5-alpha, 17-beta))-17-Hydroxy-androstan-3-on, Sigma) angereichert. Weitere 24 h später wurden die Zellen geerntet und nach Lysieren vermessen. Abb. 4.18 zeigt, dass der Androgenrezeptor nach Aktivierung durch Androgen den Promotor des PSA- Luc- Konstrukts um etwa das Dreifache aktiviert.

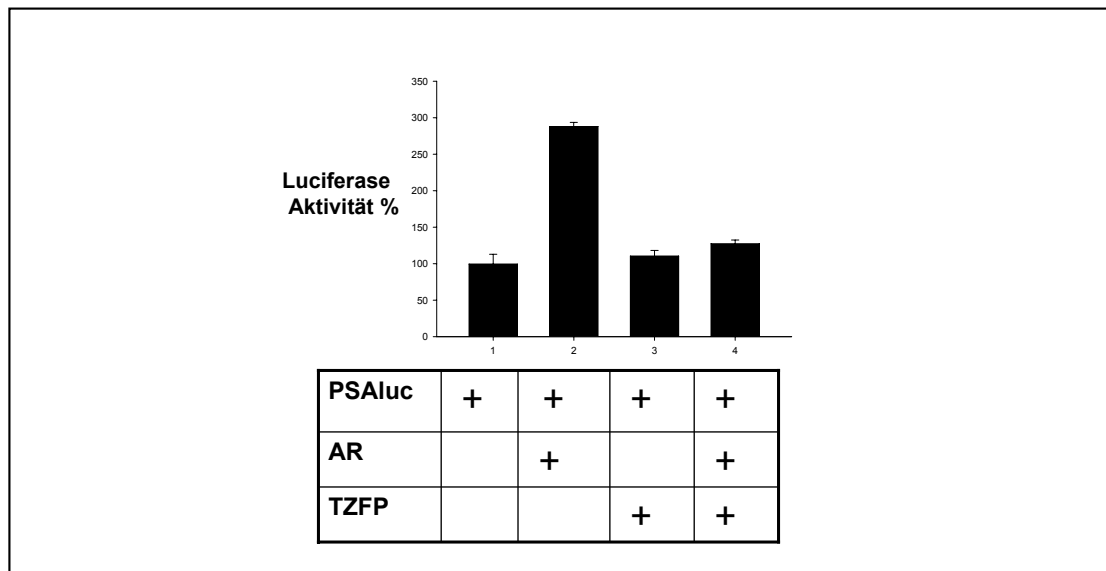


Abb. 4.19: TZFP beeinflusst die Aktivierung des PSA- Luc- Promotors durch den Androgenrezeptor

293T Zellen wurden mit pEGFP, dem PSA- Luc- Konstrukt und den Konstrukten (pSG5-HA)-TZFP und (pSG5)-AR transfiziert. Mit pSG5 transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die unter dem Balkendiagramm befindliche Tabelle gibt die jeweils transfizierten Konstrukte an (+). 24 h nach der Transfektion wurde das Medium mit 10^{-5} M Androgen angereichert und weitere 24 h später nach Zelllyse die Luciferase- Aktivität vermessen. Die

Fehlerbalken der Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet (Sigma Blot 4.01 TM).

Es konnte somit die bereits bekannte, durch AR vermittelte Aktivierung des PSA- Promotors bestätigt werden. Ebenso wie unter Verwendung des MMTV- Luc- Promotors erzielte TZFP eine signifikant repressorische Wirkung auf den PSA- Promotor in Anwesenheit des Androgenrezeptors. Die Verminderung der Aktivität betrug dabei mehr als die Hälfte. In beiden Versuchsanordnungen erzielten die Effektoren AR und TZFP folglich einen tendenziell übereinstimmenden Effekt.

4.3.3.2 Einfluss von HERV-K(HML-2)- Rec auf die Wechselwirkung zwischen AR und TZFP

Der reprimierende Effekt von TZFP auf AR unter Verwendung der beiden Promotor- Konstrukte MMTV- Luc und PSA- Luc konnte schon bewiesen werden (Abb. 4.17, Abb. 4.19). Auch der Einfluss von Rec auf diese Interaktion wurde zuvor näher charakterisiert. Nun soll geklärt werden, ob Rec bei Verwendung des PSA- Promotor- Konstrukts, denselben Effekt vermittelt. Dazu wurden Reporter- Assays mit dem Reporter- Plasmid PSA- Luc und den Effektor- Plasmiden Rec, TZFP und AR in 293 T Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.20 dargestellt.

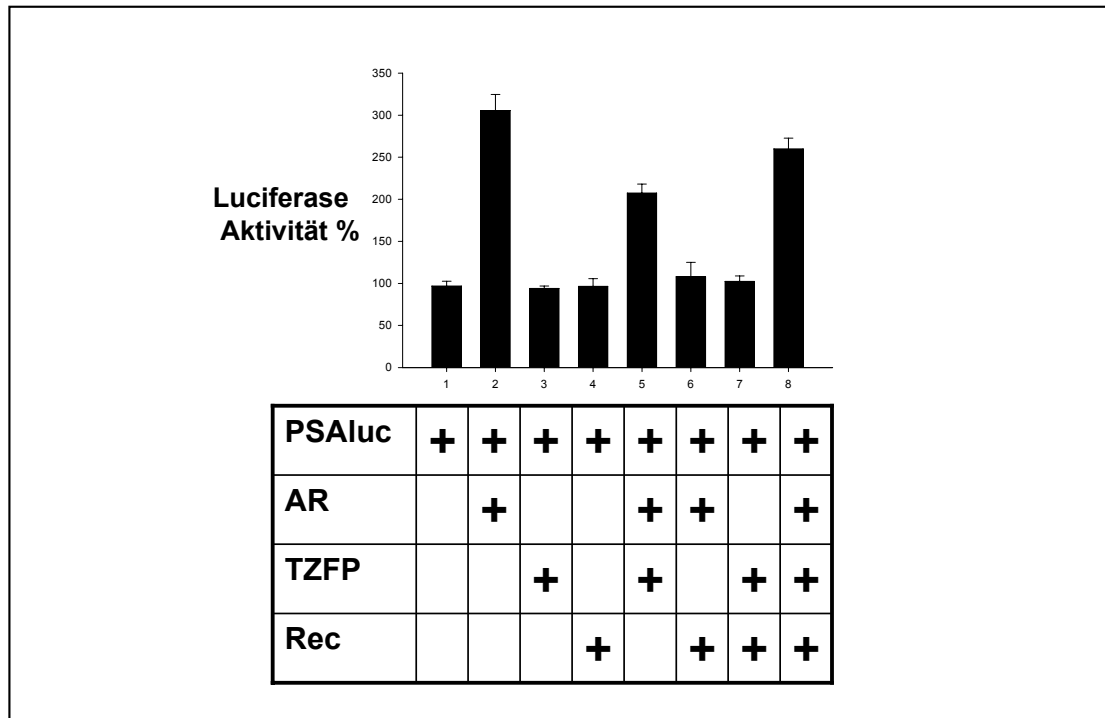


Abb. 4.20: HERV-K(HML-2)- Rec hebt die reprimierende Wirkung von TZFP auf den Androgenrezeptor auf

293T Zellen wurden mit pEGFP, dem PSA- Luc- Konstrukt und den Effektor-Plasmiden AR, TZFP bzw. Rec cotransfiziert. Das PSA- Luc- Konstrukt (400 ng) wurde in alle Ansätzen transfiziert. Mit pSG5 transfizierte Zellen dienten als Kontrolle (Ansatz1). Die unter dem Balkendiagramm befindliche Tabelle gibt die jeweils transfizierten Konstrukte an (+). 24 h nach der Transfektion wurde das Medium durch 10^{-5} M Androgen angereichert und weitere 24 h später nach Zellyse die Luciferase- Aktivität vermessen. Die Höhe des Balkens gibt die Luciferase- Aktivität in Prozent an. Die relative Luciferase- Aktivität wurde auf der Ordinate in Prozent angegeben und die Fehlerbalken der Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet (Sigma Blot 4.01 TM).

Abb. 4.20 zeigt erneut die durch AR erreichte Aktivierung (Ansatz 2) des PSA- Luc- Gens und die durch TZFP vermittelte Repression (Ansatz 5). Rec (Ansatz 4) und TZFP (Ansatz 3) alleine haben ebenso wie der pSG5- Leervektor (Ansatz 1) keinen Einfluss auf die Aktivität des Luciferase- Gens. Werden AR und Rec cotransfiziert (Ansatz 6) zeigt sich eine ähnlich hohe Aktivierung des PSA- Luc- Gens wie bei einfacher Transfektion mit AR

(Ansatz 2). Zusätzlich dazu zeigt der Kontrollansatz mit TZFP und Rec, dass die Konstrukte alleine keinen Einfluss auf den Promotor ausüben (Ansatz 7). In Ansatz 8 sind sowohl TZFP und AR als auch Rec enthalten. Während eine Verminderung der Luciferase- Aktivität im Vergleich zu Ansatz 2 stattfindet, ist gleichzeitig jedoch eine Erhöhung der durch TZFP vermittelten Repression des Androgenrezeptors (Ansatz 5) zu sehen. Folglich konnte auch unter Verwendung dieses Promotor- Konstrukts bewiesen werden, dass Rec die durch TZFP vermittelte Aktivitätsminderung des Androgenrezeptors partiell auf zu heben vermag.

5 DISKUSSION

Die systematische Suche nach Interaktionspartnern von HERV-K- Rec mittels Hefescreen führte neben der Identifikation von PLZF auch zur Identifikation des PLZF- Homologs Testis Zink Finger Protein TZFP. Dieses 487 Aminosäuren lange Protein enthält neben einer N- terminalen BTB/POZ- (pox virus, zinc finger) Domäne drei „Krüppel-like“- C₂H₂- Zinkfinger an seinem C- Terminus, welche das DNA- Motiv TGACAGTGT zu binden vermögen. Dabei sind die Positionen C(5) und G(7) besonders kritisch (Lin et al., 1999; Tang et al., 2001). Das Promyelozytische Leukämie Zink Finger Protein (PLZF) ist mit 674 Aminosäuren etwas länger als TZFP und besitzt am C- terminalen Ende neun Zinkfinger. TZFP und PLZF ist die charakteristische BTB / POZ- Domäne am N-Terminus gemein. Die Literatur beschreibt eine Homologie der POZ- Region beider Proteine von 58 %, die Homologie des mittleren Teils beträgt etwa 27 % (Hoatlin et al., 1999). Einen besonders hohen Grad an Homologie weisen dabei die letzten drei der neun Zinkfinger motive von PLZF auf, welche zu 91 % mit den Zinkfingern von TZFP übereinstimmen (Mc Connell und Licht, 2007). Die Bedeutung der Zinkfinger des PLZF wurde bereits von Denne et al., 2007 untersucht. Um die Wechselwirkung von Rec mit PLZF zu inhibieren, ist die Deletion aller Zinkfinger nötig; um eine Wechselwirkung mit Np9 zu inhibieren genügt jedoch die Deletion der letzten fünf Zinkfinger. Eine schematische strukturelle Übersicht, unter Angabe der Homologie und Ähnlichkeit beider Proteine ist in Abb. 1.6 dargestellt.

Zusätzlich zu den konservierten Sequenzmotiven, welche in die DNA- Bindung involviert sind, enthalten viele Transkriptionsfaktoren Motive, welche für Protein- Protein- Interaktionen verantwortlich sind (Bardwell und Treisman, 1994). Schon die Möglichkeit zur Dimerisierung erweitert das Spektrum DNA- bindender Proteine deutlich und vermehrt das Potential für funktionelle Variationen (McKnight und Yamamoto, 1992). So ist die POZ- Domäne durch Oligomerisierung oder andere Protein- Protein- Wechselwirkungen in der Lage eine DNA- Interaktion mit der DNA bindenden

Domäne zu verhindern. Während die Zinkfinger des Proteins also im Allgemeinen für die DNA- Erkennung und -Bindung zuständig sind, scheint der POZ- Domäne eher die Rolle der transkriptionellen Regulation und Protein-Protein-Interaktion zuzukommen (Wolfe et al., 2000). Auch PLZF und TZFP können über die POZ -Domäne miteinander heteromer interagieren und binden *in vitro* die gleichen DNA- Sequenzen (Hoatlin et al., 1999). Von TZFP ist weiterhin bekannt, dass es überwiegend in der Testis exprimiert wird, wo es während spezifischer Stadien der Spermatogenese aktiv ist (Inoue et al., 2000). Das Protein ist fähig die Histondeacetylase 2 (HDAC2) zu Promotoren zu rekrutieren und scheint, wie auch PLZF, in erster Linie als transkriptioneller Repressor von Genen zu agieren (Tao et al., 2006).

Doch bleiben Zielgene und biologische Funktionen des TZFP weithin schwer zu erfassen. Die bis dato am besten charakterisierte Funktion des TZFP ist die des direkten Interaktionspartners und Co- Repressors des Androgen Rezeptors (AR) (Ishizuka et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Tao et al. beschreibt die Assoziation des zentralen Teils des TZFP mit dem an einen Agonisten gebundenen Androgen Rezeptor und die Repression der AR-vermittelten Transaktivierung durch die Rekrutierung von HDAC 2 (Tao et al., 2006).

Der Androgen Rezeptor gehört zu der Superfamilie der Steroidhormon-Rezeptoren und setzt sich aus einer N- terminalen Transaktivierungsdomäne, einer DNA- Bindungsdomäne, einer Hinge-Region und einer C- terminalen Liganden bindenden Domäne zusammen (Mangelsdorf et al., 1995; Cheng et al., 2003). In Abwesenheit eines Liganden liegt der AR gebunden durch Hitzeschock- Proteine im Cytoplasma vor und transloziert nach der Bindung eines Liganden in den Nukleus. Dort assoziiert der Androgen Rezeptor in Abhängigkeit bestimmter Co-Repressoren oder – Aktivatoren mit der DNA und vermittelt die Repression oder Aktivierung seiner Zielgene. Neben zahlreichen Funktionen in normalen physiologischen Prozessen kann der Androgen Rezeptor ebenso als ein onkogenes Protein wirken, zum Beispiel durch die Unterstützung der Zellzyklus- Progression (Balk und Knudsen, 2008). Dieser Beobachtung zu Folge könnten AR- assoziierte Inhibitoren wie TZFP möglicherweise als

Tumorsuppressor agieren, während Antagonisten dieser Interaktion onkogen wirken würden.

5.1 TZFP- Deletionsmutanten und TZFP- Speißvarianten

Das Volllängen- TZFP, die Deletionsmutanten und die Spleißvarianten wurden kloniert und in 293T-Zellen exprimiert. Im Western Blot erscheint TZFP stets in Form von zwei diskreten Banden bei 55 kDa, der zu erwartenden Größe, und bei 37 kDa. Das kleinere Protein wird vermutlich von einem alternativen Startkodon im gleichen Leseraster abgelesen. Die allgemeine Konsensussequenz für die Initiation der Translation in Vertebraten wird mit GCC A/GCC ATG G angegeben (Kozak, 1987). Die entsprechende TZFP- Sequenz an Position 529 (bp) wäre CCC GAG ATG G, wobei die wichtigste Position im Kozak- Motiv das Purin an dritter Stelle abwärts des ATG's darstellt, in diesem Fall Guanin. Das ATG als potentiell, zweites Startkodon an Position 529 erfüllt somit die nötigen Kriterien und genügt der Kozak- Sequenz. Auch die Deletionsmutanten erscheinen als zwei Proteine unterschiedlicher Größe. Da die jeweils kleinere der beiden Banden nicht bei allen Klonen gleich groß ist, kann unspezifisches zelluläres Protein ausgeschlossen werden. Vermutlich wird das kleinere TZFP- Protein bei Gesamt- TZFP und den jeweiligen Deletionsmutanten von einem zweiten, internen Startkodon abgelesen wird. Der durch den Primär-Antikörper gefärbte Hämagglutinin- Rest kommt in der Zelle nicht vor und scheidet somit als Ursache der zusätzlichen Bande aus. Da auch durch *in vitro*- Translation zwei Proteine exprimiert werden, ist ein alternatives Spleißing als Grund ebenfalls zu verneinen. Der polyklonale anti-TZFP- Antikörper, welcher im Rahmen dieser Dissertation hergestellt wurde, erkennt im Western Blot allerdings nur eine Bande, was vermutlich auf die Konformation des Proteins zurückzuführen ist.

Die bisher in der Literatur beschriebenen, humanen TZFP- Spleißvarianten unterscheiden sich vom Gesamt- TZFP einmal durch das fehlende, dritte

Exon (Lin et al., 1999), einer anderen Form fehlen die C- terminalen Zinkfinger (Ikeda et al., 2007).

Die TZFP- Sequenzen beider von Ikeda beschriebenen Spleißvarianten brechen an Position 879 (bp) ab. In Variante 1 wird das zweite Exon, in Variante 2 werden die Exons 2 und 3 alternativ heraus gespleißt. Die Spleißvarianten aus der Maus sind nicht mit den humanen Spleißvarianten zu vergleichen. Die Sequenz des Gesamt- TZFP in der Maus misst 942 Aminosäuren, ist damit etwa doppelt so lang ist wie die humane Form und weist keine Homologie zum humanen TZFP auf (Ishizuka et al., 2003).

Die im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Martina Schmitt aus einer Testis cDNA- Bank amplifizierten und charakterisierten Spleißvarianten wurden bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Die als Spleißvariante α bezeichnete Variante (Abb.: 5.2) beinhaltet nur die POZ- Domäne und einen weiteren Teil von Exon 1 bis 588 (bp). Der Spleißvarianten β fehlt der Teil von Exon 1 zwischen den Positionen 567 und 880 (bp), jedoch wird der Leserahmen ab Beginn des zweiten Exons bis zum Ende hin im ursprünglichen Raster weiter gelesen. Auch die Spleißvariante β erscheint *in vitro* und *in vivo* als zwei Banden unterschiedlicher Größe, was wahrscheinlich ebenfalls auf ein alternatives Startkodon zurückzuführen ist. Spleißvariante α dagegen wird nur als eine Bande exprimiert.

5.2 Interaktion von HERV- K(HML-2)- Rec und Testis Zink Finger Protein TZFP

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. Daher war von Bedeutung, potentielle Interaktionsproteine von Rec zu identifizieren. Von den mit Hilfe des Hefe-II-Hybrid Systems identifizierten Bindungspartnern von Rec, wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion mit dem TZFP- Protein intensiv untersucht und bestätigt. In der vorliegenden Arbeit konnten die Bindungsstellen von Rec zunächst mittels GST- Pulldown auf die Zinkfingerdomänen am C- Terminus

eingegrenzt werden. Dieses Ergebnis entspricht dem von PLZF, welches Rec über alle neun Zinkfinger zu binden vermag. Für die Bindung von PLZF an Np9 sind hingegen die letzten fünf Zinkfinger essentiell.

Die genaue Definition der Bindungsstellen wurde mit Hilfe der Deletionsmutanten und der Splicevarianten von TZFP durchgeführt. Diese wurden dazu zusammen mit dem Vollängenprotein *in vitro* transkribiert und translatiert und mit Rec als GST- Fusionsprotein in GST- Pulldown-Analysen eingesetzt. In der GST- Pulldown- Analyse binden das Gesamt-TZFP und alle die Mutanten, welche vollständig intakte Zinkfingerdomänen enthalten.

Einen Überblick über diese Ergebnisse zeigt Abb. 5.1.

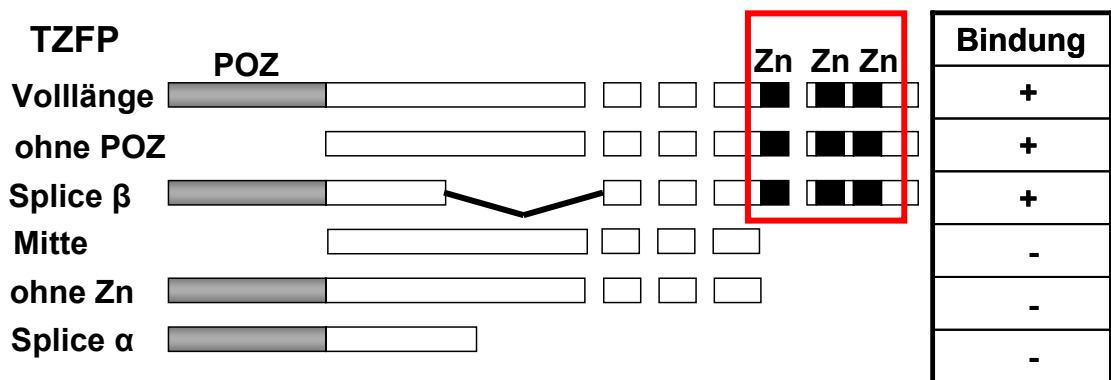


Abb. 5.1: Überblick über die GST- Pulldown- Ergebnisse von HERV-K(HML-2) Rec und den TZFP- Proteinen

Gesamt- TZFP sowie die Mutanten, welche die Zinkfingerdomänen enthalten, binden *in vitro* an Rec. Der rote Kasten zeigt den Teil des Proteins, welcher in allen Rec - bindenden TZFP- Konstrukten übereinstimmt.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die POZ- Domäne zur Interaktion mit anderen Proteinen nicht zwingend nötig zu sein scheint. Ebenfalls scheint der kurze Teil von Exon I, welcher in Spleißvariante β fehlt, nicht zur Bindung von TZFP an Rec beizutragen. Da in Spleißvariante α, welche nicht bindet, die Exons 2 bis 5 fehlen, könnten sie eine Bedeutung für die Bindung besitzen. Ebenso scheint auch der mittlere Teil des Proteins nicht für eine Bindung zu genügen. Als Schlussfolgerung der Bindungsanalysen im

Rahmen der Pulldown- Experimente müsste die Bindungsstelle auf den Proteinteil einzugrenzen sein, welcher die Exons 2 und 3, sowie die Zinkfinger umfasst. Da jedoch die Zinkfinger in der Literatur eher für die Bindung an DNA statt an Proteine bekannt sind, lässt sich die Bindestelle lediglich in dem von Exon 2 und 3 translatierten Bereich vermuten.

Allerdings sind die Ergebnisse der Pulldown- Analysen unter Vorbehalt zu betrachten, da der GST- Pulldown als *in vitro*- Methode keine posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung, Phosphorylierung etc. berücksichtigt. Ohne diese Veränderungen, welche nachhaltig zu Proteinstruktur und -funktion gehören, könnte das Protein in Struktur und Bindungsverhalten in Vergleich zur nativen Form abweichen. Die Interaktion mit anderen Proteinen könnte beispielsweise aufgrund sterischer Unterschiede zur normalen Struktur verfälscht sein. Des Weiteren fehlen im Pulldown- Assay die für die Struktur der Zinkfinger so wichtigen Zinkionen, was ihre eigentliche Funktion als DNA- bindendes Motiv deutlich einschränken sollte. Im Pulldown werden außerdem - neben den bereits erwähnten posttranslationalen Modifikationen - ebenso nicht die Wirkungen anderer Proteine auf die Wechselwirkung berücksichtigt, wie es in der zellulären Umgebung der Fall wäre. Es werden ausschließlich die gezielt eingesetzten Proteine exprimiert. Vom TZFP- homologen PLZF ist bekannt, dass im Bereich kurz vor dem ersten Zinkfinger mehrere Co- Faktoren, wie zum Beispiel Epsin 1, ETO und andere an PLZF binden und als Transkriptionsrepressoren fungieren (Hymen et al., 2000; Melnick et al., 2000).

So sollte nun im Rahmen von Coimmunopräzipitationen als *in vivo*- Methode eine genauere Analyse und eventuelle Bestätigung der vorliegenden Ergebnisse.

Die Ergebnisse der Coimmunopräzipitation wichen jedoch von den Ergebnissen der Pulldown- Analysen in Bezug auf die Bindungsstelle grundlegend ab.

Sowohl das Volllängenprotein TZFP als auch alle Deletionsmutanten und Spleißvarianten waren in der Lage an Rec zu binden. Sogar die TZFP- Konstrukte, welchen die Zinkfingerdomänen fehlten, konnten am Rec binden. Somit scheinen weder die Zinkfinger, noch die POZ- Domäne zwingend für

die Interaktion zwischen TZFP und Rec notwendig zu sein. Alleine die Aminosäuren 112- 190 teilen alle TZFP- Protein- Konstrukte. So könnte auch dieser Bereich, in Abbildung 5.3 rot markiert, maßgeblich an einer Interaktion beteiligt sein. Eine definitive Einschränkung einer interagierenden Domäne des TZFP war unter Verwendung der beschriebenen Methoden jedoch nicht möglich.

Zusammenfassend ist zu vermuten, dass TZFP seine Interaktionen mit Rec wahrscheinlich über mehrere Positionen zu vermitteln vermag. Ein weiterer Aspekt könnte auch die Existenz assoziierter, aber bisher unbekannter Proteine sein, welche TZFP in seiner Wechselwirkung mit anderen Proteinen unterstützen. Grundsätzlich stimmen also die *in vitro*- Ergebnisse der Rec-TZFP- Interaktion mit denen der Rec- PLZF- Interaktion überein. Auch dort waren die Zinkfinger in der Pulldown- Analyse ausschlaggebend für eine Bindung. Vergleichbare *in vivo*- Studien existieren in der untersuchten Rec- PLZF- Interaktion allerdings nicht (Denne et al., 2007). Abb. 5.2 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der Coimmunopräzipitation.

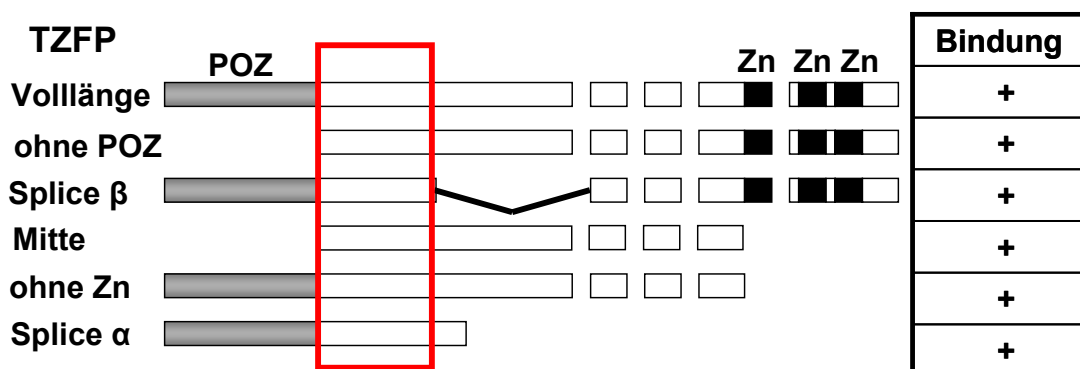


Abb. 5.2 : Überblick über die Ergebnisse der Coimmunopräzipitationen zwischen den TZFP- Proteinen und HERV-K(HML-2)- Rec

Gesamt- TZFP und alle Deletionsmutanten bzw. Spleißvarianten binden *in vivo* an Rec. Die rote Markierung kennzeichnet jenen Bereich der TZFP- Sequenz, welcher in allen (bindenden) Konstrukten vertreten ist.

5.3 HERV-K-Np9 interagiert mit dem Testis Zink Finger Protein

Da Rec und Np9 sich 44 identische Basenpaare am N- Terminus teilen, stellte sich die Frage, ob auch Np9 in der Lage ist an TZFP zu binden. In der GST- Pulldown- Analyse konnte die Bindung zwischen TZFP und Np9 auf das Volllängen- Protein und die Mutante „ohne POZ“ eingegrenzt werden. (Abb 4.4). Die Spleißvarianten α und β binden im Pulldown nicht an Np9. Wegen der kurzen Halbwertszeit des Np9- Proteins *in vivo* konnten damit keine Coimmunopräzipitationen durchgeführt werden. Die TZFP- Np9- Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen der PLZF-Np9- Bindung überein. Sind in PLZF die letzten vier der C- terminalen „Krüppel-like“ Zinkfinger deletiert, kann PLZF im Pulldown- Assay nicht mit Np9 assoziieren (Denne et al., 2007). Gerade diese Zinkfinger sind höchst homolog zu denen von TZFP (Ikeda et al., 2007). Damit übereinstimmend sind in der Pulldown- Analyse alle TZFP- Proteine, welchen die Zinkfingerdomänen fehlen, nicht in der Lage an Np9 zu binden. Eine Ausnahme bildet dabei die Spleißvariante β , welche zwar alle Zinkfinger besitzt, aber welcher der hintere Teil des ersten Exons fehlt. Da diese Variante ebenfalls nicht an Np9 bindet, könnte dieser Teil des ersten Exons (Position 567 bis 880 (bp)) eine wichtige Rolle in der TZFP- Np9- Bindung spielen.

5.4 Der Androgenrezeptor interagiert mit Rec, Np9 und TZFP

Der Androgenrezeptor besitzt die typische Struktur nukleärer Rezeptoren und besteht aus mehreren Domänen, welche die DNA- Bindung, seine Dimerisierung, die Ligandenbindung und seine transkriptionelle Aktivität vermitteln (Mangelsdorf et al., 1995). Wie andere Steroidrezeptoren auch besitzt er neben der C- terminalen, ligandenabhängigen Aktivierungsfunktion N- terminal noch eine weitere, welche ligandenunabhängig wirken kann. Die vereinfachte Proteinstruktur des Androgenrezeptors mit seinen wichtigsten Domänen ist in Abbildung 1.7 gezeigt. Der Androgenrezeptor bindet im Nukleus an responsible Elemente von Zielgenen, was zu deren transkriptioneller Aktivierung oder Repression führt. (Mangelsdorf et al.,

1995; Brinkmann et al., 1999). Dass der Androgenrezeptor mit TZFP aus der Maus interagiert, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Ikeda et al., 2005); nun galt es die Bindung mit humanem TZFP zu bestätigen. Da zuvor bereits die Interaktion von Rec mit dem humanen TZFP verifiziert werden konnte, war nun ebenfalls eine mögliche Interaktion zwischen Rec/Np9 und dem humanen Androgenrezeptor von Interesse.

Durch GST- Pulldown- Experimente konnte die Bindung des Androgenrezeptors an Rec, Np9 und TZFP gezeigt werden (Kap. 4.2.1/4.2.2). Außerdem konnte mittels Coimmunopräzipitation (Abb. 4.12) in verschiedenen Versuchsansätzen bestätigt werden, dass der humane Androgenrezeptor auch *in vivo* mit TZFP und Rec interagiert. Da bisher allen Proteinen eine gegenseitige Wechselwirkung *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden konnte, ist zu vermuten, dass es zur Formation eines trimeren Komplexes kommt, welcher Rec, TZFP und AR beinhaltet. Wie zu erwarten, konnte in Immunfluoreszenz- Studien die Lokalisation aller Proteine auf den Nukleus eingegrenzt werden. Aber nicht nur TZFP, sondern auch sein Homolog PLZF steht in Verbindung mit der Wirkung von Steroidhormonrezeptoren. Es ist bekannt, dass insbesondere im nicht hämatopoietischen System PLZF- Transkripte durch nukleäre Steroidhormonrezeptoren hoch reguliert werden können. Sowohl Glukokortikoide, Progesteron als auch Androgen vermögen die PLZF- Expression in mehreren Zelllinien zu steigern (Fahnenstich et al., 2003; Ikeda et al., 2005, Wan und Nordeen, 2002). Auch diese Tatsache unterstützt eine mögliche funktionelle Bedeutung der Interaktion.

Die bisher dargestellten Ergebnisse sowie das Wissen um die Interaktionen von PLZF, verleihen dem potentiellen Effekt von Rec in der Entwicklung von Keimzelltumoren einen höheren Grad an Komplexität und sollten daher in ihrer Funktionalität näher beleuchtet werden.

5.5 TZFP reprimiert das Proto- Onkogen *c-myc*

Nachdem der Nachweis einer spezifischen Bindung zwischen Rec und TZFP erbracht wurde, stellte sich nun die Frage nach der funktionellen Wertigkeit

dieser Wechselwirkung. Von dem TZFP- Homolog PLZF, welches als Tumorsuppressor und Transkriptionsrepressor fungiert, ist seit 2003 bekannt, dass der Promotor des Proto-Oncogens *c-myc* von PLZF reprimiert und daher direkt die Expression des c-Myc Proteins inhibiert werden kann (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. Die Repression findet allerdings nur statt, wenn der *c-myc*- Promotor über eine intakte PLZF- Bindungsstelle verfügt. *C-Myc* gehört zu der Gruppe der Proto- Onkogene, welche 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).

Aufgrund der strukturellen Homologie und der ähnlichen Interaktionseigenschaften von TZFP und PLZF sollte nun in Anlehnung an oben beschriebene Ergebnisse (Mc Connell et al., 2003), der Einfluss von TZFP auf den *c-myc*- Promotor erforscht werden.

Mit Hilfe von Luciferase- Assays konnte die eine reprimierende Wirkung des TZFP auf den *c-myc* Promotor gefunden und somit erneut die Ähnlichkeit von TZFP und PLZF unter Beweis gestellt werden. Zusätzlich zu der ähnlichen Wirkung auf den Promotor konnte auch der Nachweis erbracht werden, dass TZFP fähig ist, über die PLZF- Bindungsstelle mit dem Promotor zu interagieren. Ein Promotor ohne entsprechendes PLZF- Erkennungsmotiv konnte hingegen nicht reprimiert werden. Dem zu Folge ist es durchaus möglich, dass TZFP und PLZF über ähnliche oder gar die gleichen Erkennungsmotive die gleichen Zielgene binden und beeinflussen.

Aufgrund der umfassenden Interaktionsstudien zwischen TZFP und Rec war es zudem von Bedeutung, den Einfluss von Rec auf den intakten *c-myc*- Promotor in Anwesenheit von TZFP zu untersuchen. Denne et al., konnten bereits zeigen, dass Rec den durch PLZF- vermittelten reprimierenden Effekt auf den *c-myc*- Promotor nahezu aufzuheben vermag (Denne et al., 2007). Dies resultiert in einer Überproduktion des Proto- Onkogens *c-myc*.

Nach Kotransfektion von TZFP und Rec war Rec in der Lage die Repression des *c-myc*- Promotors in Anwesenheit von TZFP aufzuheben. Da TZFP während der testikulären Entwicklung exprimiert und funktionell zu sein

scheint und wie PLZF ein direkter Repressor des *c-myc* ist, könnte TZFP adäquate Effekte verursachen. So führt PLZF 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). 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). Daher könnte man spekulieren, dass Rec als Oncoprotein fungiert, indem es TZFP bzw. PLZF inhibiert.

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). C-Myc übt seine verschiedenen biologischen Aktivitäten 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 verschiedensten zellulären Stoffwechselprozessen und Signalwegen beteiligt sind, wie z.B. Aminosäure- und Proteinsynthese, Fettstoffwechsel, Nukleotid-/DNA-Synthese, Apoptose, Signaltransduktion und DNA-Reparatur.

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 direkt an die *c-myc*- Antagonisten und Regulatoren der Keimzellendifferenzierung TZFP und PLZF bindet, ist es denkbar, dass auch c-Myc eine Rolle in der Keimzelltumorgenese spielt. Abbildung 5.3 beschreibt einen möglichen Verlauf des *c-myc*- TZFP/PLZF- Rec- Pathways.

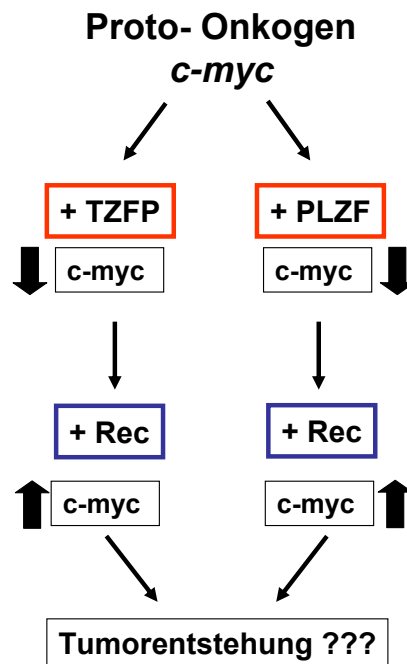


Abb. 5.3: Potenzielles Interaktionsmodell des *c-myc*- Pathways unter Einbeziehung von TZFP/PLZF und HERV-K(HML-2)- Rec

TZFP und PLZF reprimieren die Aktivität des Proto- Onkogens *c-myc*. In Anwesenheit von Rec wird dieser Effekt aufgehoben und es kommt zu einer Aktivierung von *c-myc* und somit zu einer vermeintlichen Stimulation der Tumorentstehung.

5.6 Der Androgenrezeptor aktiviert das MMTV- Luc- Reporter gen Repression der AR- vermittelten Transaktivierung durch TZFP

Zunächst konnte im Luciferase- Reporter gen assay die Aktivierung der hormonresponsiblen Elemente des MMTV- Luc- Konstrukts durch den Androgenrezeptor gezeigt werden (Abb. 4.16). Danach wurde der Einfluss von TZFP auf dieses System untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass TZFP deutlich die aktivierende Wirkung des Androgenrezeptors auf das MMTV- Luc- Konstrukt reprimiert. Dieses Ergebnis bestätigt die Arbeiten von Ishizuka *et al.*, welche das Gesamt- TZFP aus der Maus als einen Repressor des Androgenrezeptors identifizieren konnten (Ishizuka *et al.*, 2005). Auch wenn es in Abbildung 4.16 so aussieht, als habe TZFP direkt eine reprimierende Wirkung auf das MMTV- luc- Reporter- Konstrukt, ist davon

auszugehen, dass es sich dabei um die üblichen Schwankungen der Luciferase- Aktivität im Rahmen des Messbereiches handelt.

5.7 HERV-K(HML-2)- Rec hebt die reprimierende Wirkung von TZFP auf den Androgenrezeptor teilweise auf

Im Reporterassay konnte nach Cotransfektion von 293T-Zellen mit dem Androgenrezeptor, TZFP, Rec und dem MMTV- Luc- Konstrukt gezeigt werden, dass Rec die reprimierende Wirkung von TZFP auf den Androgenrezeptor wieder aufzuheben vermag (Abb. 4.17). Dieses Ergebnis lässt nun, in Anlehnung an die entsprechenden Interaktionsstudien in Kapitel 4.2.4, Vermutungen über die Funktionalität des Interaktionsmodells zwischen den Proteinen TZFP- AR- Rec zu. Der Androgenrezeptor kann nach Aktivierung - meistens durch Androgene - Zielgene im Nukleus reprimieren oder aktivieren. TZFP hebt die aktivierende Funktion des Androgenrezeptors auf, verstärkt also eher die reprimierende Wirkung. Rec wiederum inhibiert die TZFP- Wirkung auf den Androgenrezeptor, verstärkt also indirekt seine aktivierende Funktion. Wenn Androgene im Übermaß vorhanden sind, ergibt sich als direkte Folge eine verstärkte Aktivierung des Androgenrezeptors, was nachweislich die Entstehung von Tumoren begünstigt. So könnte auch die indirekte Aktivierung des Androgenrezeptors bei physiologischem Androgenzustand in der Zelle durch die Inhibierung potentieller Repressoren zur Transformation von Zellen zu Krebszellen führen. Im Rahmen des untersuchten Interaktionsmodells würde TZFP die Rolle des Repressors zukommen, welcher die Aktivierung des Androgenrezeptors zügelt und somit möglicherweise einen gewissen Schutz vor der Entstehung von Krebs vermittelt. Die Tatsache, dass Rec die reprimierende Wirkung von TZFP in den Luciferase- Assays inhibiert, suggeriert, dass Rec durch Aufheben der „Schutzfunktion“ von TZFP die Entstehung von Krebs fördern könnte. Auch in diesem Versuchsmodell entsteht in Anlehnung an die Wirkung von TZFP und Rec auf *c-myc* der Verdacht, dass es sich bei HERV-K- Rec um ein Onkogen handelt. Auch die Arbeiten von Galli *et al.* untermauern diese Vermutung. Die Arbeitsgruppe konnte im Tiermodell zeigen, dass rec-

transgene Mäuse im Alter von einem Jahr Tumore in der Testis aufweisen (Galli et al., 2005). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die humane Form des Testis Zink Finger Protein vorwiegend in der Testis exprimiert wird (Lin et al., 1999). Auch der Androgenrezeptor als wichtiger, humaner Steroidrezeptor wird in Testiszellen gebildet. Die beschriebenen Interaktionsstudien, die funktionellen Analysen sowie das Vorkommen der Proteine im menschlichen Körper deuten auf eine Korrelation von HERV-K-Rec mit der Entstehung von Prostata- und Testiskarzinomen hin. Abb. 5.4 fasst abschließend in einem potentiellen Interaktionsmodell zwischen TZFP, Rec und AR deren Wechselwirkungen zusammen.

5.8 Der Androgenrezeptor aktiviert das PSA- Luc- Reporter gen Repression der AR- vermittelten Transaktivierung durch TZFP

Zunächst konnte im Luciferase- Reporter gen assay die Aktivierung der Androgen verantwortlichen Elemente des PSA- Luc- Konstrukts durch den Androgenrezeptor gezeigt werden (Abb. 4.18). Danach wurde erneut der Einfluss von TZFP auf dieses System untersucht. Wie auch unter Verwendung des MMTV- Luc- Konstrukts konnte deutlich eine durch TZFP vermittelte Repression auf die aktivierende Wirkung des Androgenrezeptors nachgewiesen werden (Abb. 4.18). Auch dieses Ergebnis bestätigt die Arbeiten von Ishizuka *et al.*, welche das Gesamt- TZFP aus der Maus als einen Repressor des Androgenrezeptors identifizieren konnten (Ishizuka et al., 2005).

5.9 HERV-K(HML-2)- Rec hebt die reprimierende Wirkung von TZFP auf den Androgenrezeptor teilweise auf

Der Reportergen- Assay mit dem PSA- Luc- Konstrukt und AR, TZFP und HERV-K- Rec bestätigten die bereits zuvor erhaltenen Ergebnisse. Rec vermag die reprimierende Wirkung von TZFP auf den Androgenrezeptor wieder aufzuheben (Abb. 4.19). Auch dieses Ergebnis unterstützt die These des in Kapitel 5.6 beschriebenen Interaktions- und Funktionsmodells. TZFP würde folglich die Rolle des Repressors zukommen, welcher die Aktivierung des Androgenrezeptors zügelt und somit möglicherweise einen gewissen Schutz vor der Entstehung von Krebs vermittelt. Rec würde durch Inhibierung dieser Repression den Schutz aufheben und so als vermeintliches Onkogen die Entstehung von Krebs stimulieren. Abbildung 5.4 fasst abschließend in einem potentiellen Interaktionsmodell zwischen TZFP, Rec und AR mögliche Folgen der Wechselwirkungen zusammen.

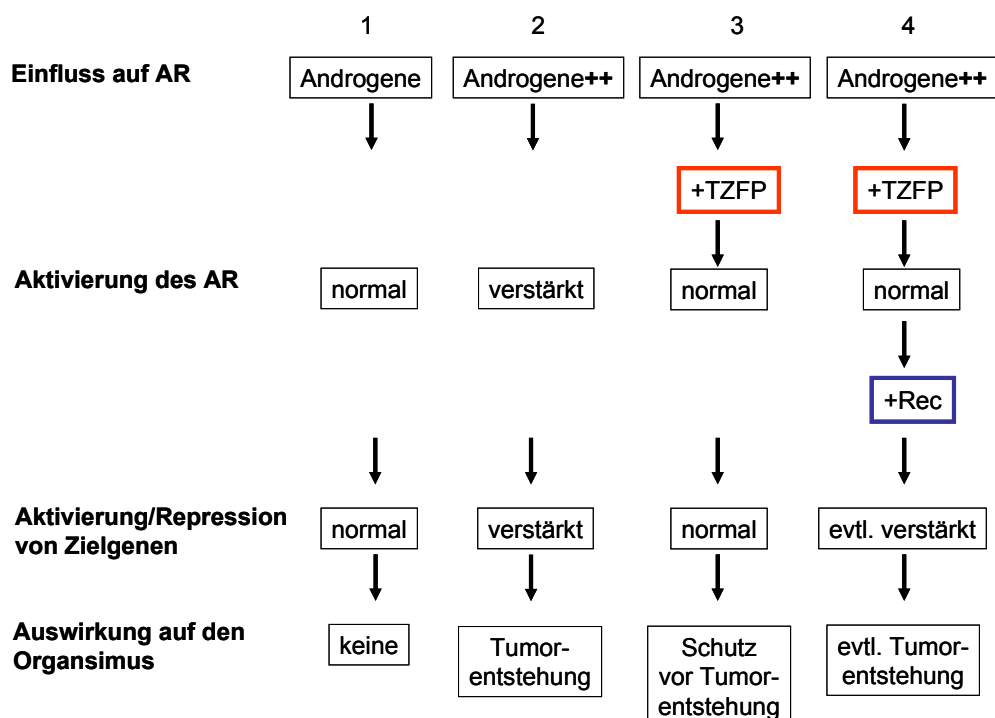


Abb. 5.4: Potentielles Interaktionsmodell AR- TZFP- HERV-K(HML-2)Rec

(1) Bei physiologischem Androgenzustand in der Zelle wird AR in normalem Maße aktiviert und wirkt ohne außergewöhnliche Folgen auf Zielgene.

(2) Bei Auftreten stark erhöhter Androgenmengen wird der Androgenrezeptor verstärkt aktiviert. Der daraus resultierende erhöhte Einfluss auf Zielgene kann zur Tumorentstehung beitragen. (Gregory et al., 1998).

(3) TZFP als Corepressor von AR normalisiert die erhöhte Aktivierung des AR's durch erhöhte Androgenmengen und könnte somit vor einer Tumorentstehung schützen.

(4) Da Rec die reprimierende und somit vermeintlich schützende Wirkung von TZFP aufhebt, könnte das HERV-K(HML-2)- Protein so zur Entstehung von Tumoren beitragen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die physische Interaktion zwischen den HERV-K(HML-2) Proteinen Rec und Np9 mit TZFP, die physische Interaktion zwischen TZFP und dem humanen Androgenrezeptor sowie zwischen HERV-K(HML-2) Rec und dem Androgenrezeptor gezeigt. Alle Interaktionen konnten sowohl durch GST- Pulldown- Analyse *in vitro* als auch durch Coimmunpräzipitation *in vivo* bestätigt werden. Die Bindung von HERV-K(HML-2) Rec, TZFP und AR zusammen konnte *in vivo* durch Coimmunpräzipitation nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit dieser Wechselwirkung konnte auch eine funktionelle Wechselwirkung der Proteine durch Luciferase- Reporter- Assays unter Verwendung verschiedener Promotoren verifiziert werden.

Eines der Zielgene des Transkriptionsrepressors und TZFP- Homologs 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). In Anlehnung daran konnte eine ähnlich starke reprimierende Wirkung von TZFP auf *c-myc* beobachtet werden. Des Weiteren erfolgt die Bindung von TZFP ebenfalls nur über eine intakte PLZF- Bindungsstelle direkt an den *c-myc*- Promotor. In Anwesenheit von Rec und TZFP konnte die TZFP vermittelte Repression aufgehoben werden.

Entsprechende Ergebnisse konnten unter Verwendung der MMTV- Luc- und PSA- Luc- Promotoren erzielt werden. Diese Promotoren, welche hormonresponsible Elemente tragen, werden in Abhängigkeit von Androgenen durch den Androgenrezeptor aktiviert. Diese Transaktivierung wird durch TZFP vermindert, was die Wirkung des Proteins als Transkriptionsrepressor bestätigt. In Anwesenheit von AR, TZFP und HERV-

K(HML-2) Rec wird die TZFP vermittelte Repression durch Rec teilweise wieder aufgehoben.

Stellt man anhand der Ergebnisse ein potenzielles Interaktionsmodell auf, so würde TZFP folglich die Rolle des Repressors zukommen, welcher die Aktivierung des Androgenrezeptors zügelt und somit möglicherweise einen gewissen Schutz vor der Entstehung von Krebs vermittelt. Rec würde durch Inhibierung dieser Repression den Schutz aufheben und so als vermeintliches Onkogen die Entstehung von Krebs stimulieren.