

**Untersuchungen zur Expression und Funktion der
HERV-K(HML-2) kodierten Proteine Rec und Np9**

Diplomarbeit

im Studiengang Biotechnologie
der Technischen Fachhochschule Berlin
zur Erlangung eines Diplom-Ingenieurs (FH)
durchgeführt am Robert Koch Institut, Berlin

vorgelegt von

Johannes Neuhaus

BERLIN, MAI 2008

1	EINLEITUNG	1
1.1	RETROVIREN	1
1.2	MORPHOLOGIE DER VIRUSPARTIKEL	2
1.3	GENOMISCHE STRUKTURIERUNG	2
1.4	RETROELEMENTE	4
1.5	HUMANE ENDOGENE RETROVIREN (HERVs)	4
1.6	EINTEILUNG HUMANER ENDOGENER RETROVIREN	7
1.7	HERV-K (HML-2)	9
1.8	GENPRODUKTE VON HERV-K(HML-2)	9
1.8.1	<i>REC</i>	10
1.8.2	<i>Np9</i>	11
1.9	VIRUSINDUZIERT ZELLTRANSFORMATION UND TUMORGENESE BZW. KLINISCHE BEDEUTUNG UND BIOLOGISCHE FUNKTION	12
1.10	ZIELSETZUNG	15
2	MATERIAL	16
2.1	BAKTERIENSTÄMME	16
2.2	ENZYME	16
2.3	OLIGONUKLEOTIDE	17
2.4	PLASMIDKONSTRUKTE	19
2.5	ANTIKÖRPER	20
2.6	DNA- UND PROTEIN-LÄNGENSTANDARDS	20
2.7	EUKARYONTISCHE ZELLEN	20
2.8	HERSTELLER UND FIRMENSITZE	20
2.9	MEDIEN	21
3	METHODEN	23
3.1	METHODEN DER ZELLKULTUR	23
3.1.1	<i>Kulturbedingungen für immortalisierte Zelllinien</i>	23
3.1.2	<i>Passagieren von Zellen</i>	23
3.1.3	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	23
3.1.4	<i>Transfektion von Zellen</i>	24
3.1.5	<i>Herstellung der fluoreszenzmikroskopischen Präparate</i>	24
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	24
3.2.1	<i>Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	24
3.2.2	<i>RNA-Aufreinigung</i>	24
3.2.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	25
3.2.4	<i>Kolonie-PCR</i>	26
3.2.5	<i>cDNA-Synthese durch die one-step Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)</i> ...	26
3.2.6	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	26
3.2.7	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	27
3.2.8	<i>Aufreinigung von PCR-Produkten</i>	27
3.2.9	<i>Plasmid-DNA-Präparation</i>	27
3.2.10	<i>Klonierung von DNA-Fragmenten</i>	27
3.2.11	<i>Glycerinkulturen</i>	29
3.2.12	<i>Sequenzierungen</i>	29
3.2.13	<i>Herstellung kompetenter Bakterien</i>	30
3.3	GENSYNTHESE	30
3.4	REAL TIME PCR	31
3.5	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	33
3.5.1	<i>Protein-Aufreinigung mittels RIPA-Lyse</i>	33

3.5.2	<i>BCA-Protein Assay</i>	33
3.5.3	<i>SDS-Page</i>	33
3.5.4	<i>Coomassie-Färbung</i>	35
3.5.5	<i>Western Blot</i>	35
3.6	DIFFERENTIAL-DISPLAY-PCR	36
3.6.1	<i>dd-PCR-Bedingungen</i>	37
3.6.2	<i>dd-PCR Polyacrylamidgel</i>	38
3.6.3	<i>dd-PCR Darstellung von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen mittels verschiedener Färbemethoden</i>	39
3.6.4	<i>dd-PCR Reamplifikations-PCR</i>	39
3.6.5	<i>dd-PCR DNA-Klonierung</i>	40
4	ERGEBNISSE	41
4.1	ETABLIERUNG DER DIFFERENTIAL DISPLAY METHODIK	41
4.2	ETABLIERUNG DER DIFFERENTIAL DISPLAY-PCR	41
4.2.1	<i>Optimierung der Zusammensetzung des Reaktionsansatzes</i>	41
4.2.2	<i>Optimierung des Cyclerprogramms</i>	42
4.2.3	<i>Vergleich der Methoden zur Detektion der Amplifikate</i>	43
4.2.4	<i>Optimierung der Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	43
4.2.5	<i>Differential Display PCR unter optimierten Bedingungen</i>	44
4.3	CODONOPTIMIERUNG UND KLONIERUNG VON NP9	46
4.3.1	<i>Codonoptimierung</i>	47
4.4	GENCHIP-ANALYSE DER VERÄNDERTEN GENEXPRESSION IN REC-TRANSFIZIERTEN ZELLEN	54
4.4.1	<i>Nachweis der Rec-Expression</i>	55
4.4.2	<i>Kontrolle der Proteinexpression</i>	56
4.4.3	<i>Isolierung und Analyse der gesamt-RNA Proben für die Chipanalyse</i>	57
4.4.4	<i>Auswertung der Chipergebnisse</i>	58
4.4.5	<i>Überprüfung der Expression der identifizierten Gene mittels der Eva Green real time PCR</i>	60
5	DISKUSSION	64
5.1	ETABLIERUNG DER DIFFERENTIAL DISPLAY METHODIK	64
5.1.1	<i>dd-PCR Optimierung der PCR-Reaktion</i>	64
5.1.2	<i>Auswahl der geeigneten DNA-Färbemethoden</i>	65
5.1.3	<i>Erforderliche Mehrfachbestimmungen</i>	65
5.1.4	<i>dd-PCR Ausblick</i>	66
5.2	CODONOPTIMIERUNG UND KLONIERUNG VON NP9	66
5.3	AFFYMETRIX GENCHIP-ANALYSE BEI REC-TRANSFIZIERTEN ZELLEN	68
5.3.1	<i>Auswirkungen der Transfektionseffizienz</i>	68
5.3.2	<i>Verifizierung der Expression der identifizierten Gene mittels real time PCR</i>	69
5.3.3	<i>Histon deacetylase 3 (HDAC3)</i>	69
5.3.4	<i>Sry-Box 30</i>	69
5.3.5	<i>Homo sapiens zinc finger protein 256 (ZNF256)</i>	69
5.3.6	<i>Interleukin enhancer binding factor 3 (NFAR)</i>	69
5.3.7	<i>Splicing factor proline- and glutamine-rich (SFPQ)</i>	69
5.3.8	<i>RNA binding Protein 9 (RNA:BP-9)</i>	69
6	ZUSAMMENFASSUNG	69
7	LITERATURVERZEICHNIS	69

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Accnr.	Accession number
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
°C	Grad Celcius
C	Cytosin
CBP	Calmodulinbindeprotein
CKII	Casein Kinase II
Cys	Cystein
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERV	endogenes Retrovirus
FBS	fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigungskonstante 9,8 m/s ²
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GUS-β	Glucoronidase beta
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HML	human endogenous MMTV-like
HTDV	human teratocarcinoma-derived virus
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
LTR	long terminal repeat
µL	Mikroliter
min.	Minute
mL	Milliliter
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NES	Kernexportsequenz
NLS	Kernlokalisationssequenz
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PBS	phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PLZF	promyelozytisches Leukämie Zinkfinger
POD	Peroxidase
PUM 1	Pumilio 1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transport RNA
U	units

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Viren sind nichtzelluläre Parasiten von Lebewesen. Sie sind obligat intrazellulär, da sie weder Ribosomen zur Proteinbiosynthese noch einen energieliefernden Metabolismus besitzen. Außerhalb der Zelle sind sie somit nicht in der Lage, sich zu vermehren. Ihr Ursprung und ihre Entwicklung sind eng mit der Evolution von Einzellern, Pflanzen und Tieren verbunden.

Zu der Familie der Retroviren zählen die Erreger, die eine reverse Transkriptase (RT) besitzen. Die RT wird von den Retroviren dazu benötigt, nach der Penetration in die permissive Zelle ihr RNA-Genom durch reverse Transkription mithilfe der RT in DNA umzuschreiben. Diese DNA kann dann in das zelluläre Genom der Wirtszelle als Provirus integrieren. Dieses integrierte Provirus verhält sich nunmehr wie ein zelluläres Gen und wird bei der Teilung der Wirtszelle mit dem zellulären Genom vermehrt und an die Tochterzellen weitergegeben. Die Entdeckung durch Howard m. Temin 1970 widerlegte das zentrale Dogma der Molekularbiologie des Informationsflusses von DNA über RNA zu Protein (Temin, 1964).

Retroviren umfassen eine große Gruppe von humanen und tierischen Pathogenen, die eine Vielfalt an Krankheiten einschließlich Krebs und verschiedene immunologische und neurologische Krankheiten verursachen können (Coffin et al., 1997, Weiss, 1984, Sene-Diouf et al., 2000). Retrovirus-assoziierte Krankheiten sind schon über ein Jahrhundert bekannt wie zum Beispiel das pulmonale Adenocarcinom beim Schaf, erstmals beschrieben 1825 (Tustin R.C. 1969), oder die Leukämie bei Hühnern (Ellermann v. 1908). Es dauerte einige Jahrzehnte, bis Retroviren als Ursache für diese Krankheiten identifiziert werden konnten. Diesem Zusammenhang verdanken die Retroviren ihre Bezeichnung als „RNA Tumor Viren“ (Keydar et al., 1984).

Die bedeutsame Rolle von Retroviren im Zusammenhang mit tierischen Krankheiten ließ Wissenschaftler mit Nachdruck daran arbeiten, ähnlich assoziierte humane Retroviren zu finden.

Bis heute konnten vier unterschiedliche humane Retroviren beschrieben werden. Zuerst wurde 1980 das humane T-Zell-lymphotrope Virus Typ 1 (HTLV-I) isoliert (Poiesz et al., 1980). HTLV konnte mit der Auslösung von Krebs (adulte T-Zell Leukämie (ATL) oder neurologischen Krankheiten (HTLV-I-assoziierte Myelopathie bzw. Tropische Spastische Paraparese (HAM/TSP) in Verbindung gebracht werden (Barmak et al., 2003). Kurze Zeit später wurde bei einem Patienten, der an Haarzelleukämie erkrankt war, HTLV-II entdeckt (Kalyanaraman et al., 1982). Dieses HTLV-I verwandte Virus konnte allerdings noch nicht mit Sicherheit als

Krankheitsauslöser identifiziert werden (Barmak et al., 2003, Roucoux and Murphy, 2004). Anschließend wurden das Humane Immundefizienz-Virus (HIV-I) 1983 und HIV-II 1986, die beide das AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) auslösen, entdeckt (Barre-Sinoussi et al., 1983, Clavel et al., 1986).

1.2 Morphologie der Viruspartikel

Retroviren sind umhüllte Viren mit einem einzelsträngigen, positiv strangorientierten RNA-Genom. Das Genom wird von einem Viruskapsid umgeben, welches je nach Virustyp eine ikosaedrische oder konische Form aufweist.

Der Viruspartikel ist von einer Lipoproteinhülle, die sich von der Zellmembran der Wirtszelle ableitet, umgeben und hat einen ungefähren Durchmesser von 100-120nm.

In dieser Hüllmembran sind die virusspezifischen Oberflächen- und Transmembranglycoproteine eingelagert. Das transmembrane Hüllprotein (TM) ist mittels einer ca. 20 Aminosäuren umfassenden Region in der Plasmamembran verankert. Das externe Glycoprotein (SU) hingegen ist nicht-kovalent mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des transmembranären Hüllproteins verbunden. Durch diese Glycoproteine erfolgen der Kontakt zu den Rezeptoren der Wirtszelle und die anschließende Fusion. Die Matrixproteine sind an die Innenseite der Hüllmembran angelagert und meist durch aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit ihr verankert.

Die Kapsidproteine, die Matrixproteine und die Nukleokapsidproteine, die mit der viralen RNA komplexieren, sind alle Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine). Das Viruspartikel beinhaltet des Weiteren die essentiellen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR).

1.3 Genomische Strukturierung

Das Genom des Virions ist wie eukaryontische messenger-RNA (mRNA) aufgebaut und besteht aus einem Dimer einer linearen einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität. Diese RNA weist am 5'-Terminus eine methylierte Kopfgruppe (Cap-Struktur) auf und ist am 3'-Terminus polyadenyliert (Poly(A)-Schwanz). Diese Strukturen bieten der RNA einen Schutz vor enzymatischem Abbau. Außerdem erhöht die Polyadenylierung die Translatierbarkeit und reguliert die Halbwertszeit des mRNA-Moleküls durch eine Verkürzung mit fortschreitendem Alter. Alle infektiösen Retroviren codieren mit offenem Leserahmen für Gag, Pol und Env. Das

Provirus ist von regulatorischen Kontrollsequenzen flankiert, die essentiell für eine reverse Transkription der viralen RNA und die Integration der viralen Erbinformationen in das Wirtszellgenom sind. Hier befinden sich neben der Promotorsequenz die 18 Nukleotide umfassende Primer Binding Site (PBS). Dort bindet ein t-RNA-Molekül über komplementäre Basenpaarung (fungiert als Primer) und initiiert die Reverse Transkription.

Nachdem die Reverse Transkription erfolgte, liegt eine doppelsträngige DNA vor, die nach der Integration in das Wirtsgenom als Provirus bezeichnet wird. Das Provirus ist am Integrationsort am 3'- und am 5'-Ende von Long Terminal Repeats (LTR) eingefasst. Diese regulatorischen Elemente sind im retroviralen Genom nicht vorhanden und entstehen während des Umschreibens der einzelsträngigen RNA in die DNA und lassen sich in die Regionen U3, R und U5 unterteilen. Die R-Regionen (R-redundant) liegen direkt im Anschluss an die 5'-Cap- bzw. vor der 3'-Poly-a-Struktur des integrierten Provirus. Am 5'-Ende folgt der R-Region die U5-Region (U-unique) und anschließend die PBS. Zwischen der PBS und dem gag-Gen befindet sich die Leader-Region, welche aus Spleißdonor und Ψ -Stelle zusammengesetzt ist. Der Spleißdonor wird für jede gespleißte mRNA verwendet. Die Ψ -Stelle fungiert als Verpackungssignal für das RNA-Genom. Stromabwärts, im Anschluss an die kodierenden Gene, liegt der Polypurintrakt (PP), der aus einer Folge von mindestens neun Adenosin- oder Guaninresten besteht. Die Bildung und das Entfernen des PP-Primers durch RNase H sind auf die korrekte Sequenz angewiesen. Nach der Synthese des ersten DNA-Stranges baut die RNase H auf die RNase H-resistenten Basen des PP den RNA-Teil des Hybridstranges ab. Es entsteht der PP-Primer, von dem aus die Synthese des Zweitstranges beginnt. Gefolgt wird der Polypurinbereich von der U3-Region, die Enhancer und Promotor Sequenzen enthält. Hier schließt sich der zweite R-Bereich an, in dem sich auch das Polyadenylierungssignal (AAUAAA) befindet.

1.4 Retroelemente

Ungefähr 8% des humanen Genoms bestehen aus retroviralen Elementen (Abbildung 1.4-1).

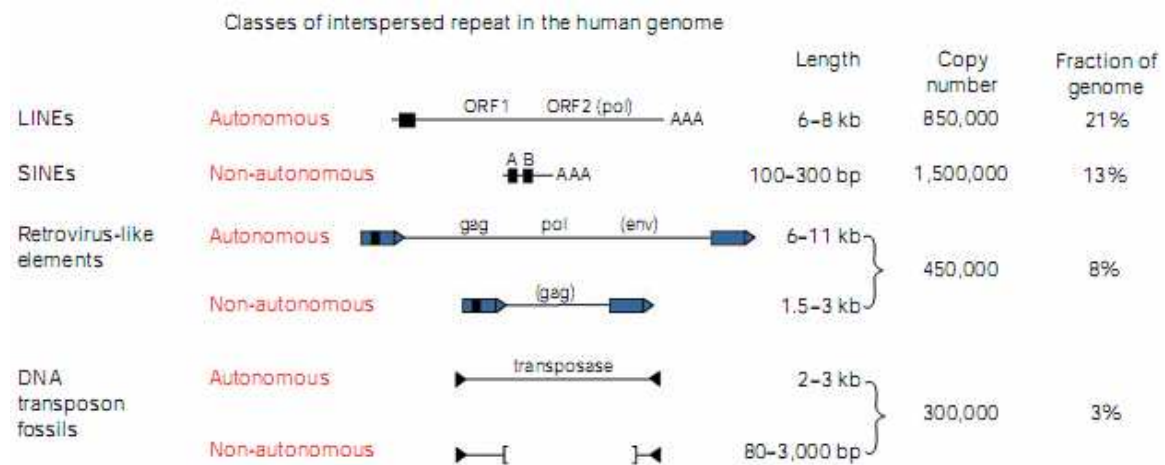


Abbildung 1.4-1 Hier sind die vier Gruppen der transposablen Elemente des Humangenoms dargestellt. Insgesamt repräsentieren sie 45 % des Genoms. (Lander et al., 2001)

45% des Genoms bestehen aus den transposablen Elementen, die in vier Gruppen unterteilt werden. Hierbei handelt es sich um long interspersed elements (LINEs), short interspersed elements (SINEs), LTR retrotransposons und DNA transposons.

LTR retrotransposons sind von long terminal direct repeats, die sämtliche erforderlichen transkriptionsregulierenden Elemente enthalten, umgeben. Sie enthalten gag und pol Gene, die codierende Bereiche für die Proteine reverse Transkriptase, Protease, RNase H und Integrase enthalten. Sie werden in drei Klassen unterteilt.

1.5 Humane endogene Retroviren (HERVs)

Erste Vermutungen über das Vorhandensein von endogenen Retroviren kamen in den 50er bis 70er Jahren auf. Zellen, welche nicht zuvor mit einem exogenen Retrovirus infiziert wurden, entwickelten unter bestimmter Behandlung (Strahlung, Karzinogene) infektiöse Partikel (Gross and Feldman, 1970).

Die erste Identifizierung und Klonierung humaner endogener retroviraler Sequenzen wurde 1981 beschrieben (Martin et al., 1981). Seither konnten über 20 HERV-Familien identifiziert werden (Flockerzi et al., 2005, Kim et al., 2004, Mayer and Meese, 2002).

Durch Hybridisierungsexperimente konnten zuerst provirale Sequenzen nachgewiesen werden. Später erleichterte die PCR-Methodik die Detektion proviraler Sequenzen.

Die Sequenzierung des gesamten Humangenoms zeigte, dass mehr als acht Prozent der menschlichen Erbinformationen aus retroviralen Sequenzen bestehen (Int. Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Die Lokalisation dieser retroviralen Elemente im menschlichen Genom zeigt eine hohe Verteilungsdichte auf den Chromosomen 4, 20 und den Geschlechtschromosomen X und Y (Kim et al., 2004).

Wenn exogene Retroviren als Provirus in das Genom einer Keimzelle des Wirts integrieren, findet eine Weitervererbung an die nachfolgenden Generationen statt. Nach der Etablierung können sie sich durch Retrotransposition innerhalb der Zelle weitervermehren und in ihrem Wirt akkumulieren. Die Retrotransposition umfasst die Mechanismen der Transkription, reversen Transkription und erneuter Integration (Belshaw et al., 2004).

Die Infektion von Keimbahnzellen von Primatenvorläufern mit exogenen Retroviren resultierte in einer stabilen Integration, da sie in das Genom aller Zellen der Primaten und somit auch in das des Menschen gelangten. Dies ist wahrscheinlich der Ursprung von Humanen endogenen Retroviren (HERVs) (Ono, 1986, Steinhuber et al., 1995).

Zum Zeitpunkt der Integration des Provirus in das Wirtsgenom weisen beide LTRs keine Sequenzunterschiede auf. Anhand eines Vergleichs dieser beiden LTR-Sequenzen kann mit Hilfe der Mutationsrate von 5×10^9 /nt/Jahr für genomische, nicht kodierende Sequenzen (Hayashida and Miyata, 1983) das Alter von ca. 10-40 Million Jahren für die heute im humanen Genom befindlichen Elemente bestimmt werden. Zur Zeit der Abspaltung der Altweltprimaten von den Neuweltprimaten vor zirka 40 Millionen Jahren, haben viele exogene Retroviren die Keimzellen der Altweltprimaten infiziert und wurden seitdem stabil auf alle Nachkommen weitervererbt (Arnaud et al., 2007, Dangel et al., 1995, Doolittle et al., 1989).

Nachdem ein Retrovirus in allen Vertretern einer Population vorhanden ist, besteht die Möglichkeit, dass es auf Grund von Rezeptorinterferenz nicht mehr in der Lage ist, Individuen dieser Population zu infizieren. Somit unterliegt das Retrovirus einem starken Selektionsdruck (Lower, 1999).

Statistisch betrachtet ist die Wahrscheinlichkeit der Replikationskompetenz retroviraler Sequenzen umso geringer, je früher in der Evolution einer Spezies das Provirus integrierte. Häufig treten homologe Rekombinationen zwischen einem 5'- und einem 3'-LTR auf, die ein Herausschneiden der dazwischen liegenden codierenden Sequenzen veranlassen und im Genom solitäre (solitary) LTRs zurücklassen (Hishinuma et al., 1981, Hughes and Coffin, 2004, Liao et al., 1998). Da solitäre LTRs regulatorische Elemente (Promotor, Enhancer, Polyadenylierungssignal) tragen und in großer Kopienzahl im Genom vertreten sind, kann es je nach Integrationsort dieser viralen Sequenzen zur Aktivierung zellulärer Gene durch virale Promotor- oder Enhancer-Elemente kommen oder aber die Integration der proviralen DNA

innerhalb eines Gens zu seinem Funktionsverlust führen (Kobayashi et al., 1998, Ostertag et al., 2003).

De novo Insertionen bergen ein doppeltes Risiko. Die Integration viraler Sequenzen kann nicht nur die Aktivierung von Proto-Onkogenen verursachen, sondern auch die Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen zur Folge haben. Die Aktivität der Reversen Transkriptase und der Integrase lassen die Möglichkeit der de novo Insertion retroviraler Elemente durch Retrotransposition offen, auch wenn in jüngerer Zeit beim Menschen keine Ereignisse dieser Art auftraten und nur wenige endogene Retroviren ein vollständiges Genom vergleichbar mit dem exogener Retroviren besitzen (Bannert and Kurth, 2004). Es wird geschätzt, dass eine de novo Insertion von Retroelementen bei einer von hundert Geburten stattfindet (Deininger and Batzer, 2002).

Die meisten HERVs sind auf Grund einer Vielzahl von Mutationen defekt. Dennoch besitzt eine begrenzte Anzahl von humanen endogenen Retroviren das Potential virale Proteine und virusähnliche Partikel zu produzieren. Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass diese Partikel jedoch nicht mehr infektiös sind (Tonjes et al., 1997). Einige HERVs werden mit der Entstehung von Krebs und der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht (Boller et al., 1993, Nelson et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass in Melanompatienten HERV-K im Tumor exprimiert wird. Hier wurde in 45% der metastatischen Melanombiopsien und in 44% der aus Melanomen stammenden Zelllinien Rec- und Env-Expression nachgewiesen. Außerdem konnten Antikörper gegen HERV-K Proteine in den Seren von Melanom-Patienten nachgewiesen werden (Buscher et al., 2005).

Die Integration von retroviralen Elementen hatte nicht immer evolutionäre Nachteile oder Krankheiten zur Folge. So verursachte die Integration von HERV-E Elementen in die Promotor-Region des Amylasegens, dass nicht nur im Pankreas, sondern auch in der Speicheldrüse Amylase exprimiert wird (Samuelson et al., 1990).

Die Expression der meisten HERVs erfolgt gewebspezifisch. Von besonderer Bedeutung ist das in plazentalem Gewebe exprimierte HERV-W Env Protein (Env-W). Es konnte neben einer starken Expression in humanen Trophoblasten die direkte Beteiligung von Env-W an der Trophoblasten-Zellfusion und Differenzierung zum Syncytiotrophoblasten gezeigt werden (Frendo et al., 2003).

Diese Daten zeigen, dass Retrotranspositionereignisse und de novo Integrationen retroviraler Elemente in die Keimbahnzellen des Menschen Einfluss auf die Evolution des humanen Genoms hatten und noch bis heute ausüben (Hughes and Coffin, 2004, Leib-Mosch and Seifarth, 1995).

1.6 Einteilung humaner endogener Retroviren

Die Klassifikation der HERVs richtet sich nach der tRNA-assoziierten Aminosäure, die bei der Initiation der reversen Transkription als Primer für die reverse Transkriptase dient. Der Einbuchstabencode der entsprechenden Aminosäure wird an den Terminus „HERV“ angehängt. Wie zum Beispiel bei der Nutzung von Lysin (K)-assoziiierter tRNA bei HERV-K. Die weitere Einteilung erfolgt je nach Sequenzhomologie in die Klassen I, II und III. Klasse I weist Homologien zu Gammaretroviren, Klasse II zu Betaretroviren und Klasse III eine schwache Homologie zu Spumaviren auf. HERV-K-Retroviren sind der Klasse II zugehörig und werden auf Grund hoher Ähnlichkeit zu MMTV in der *pol*-Region um die Bezeichnung HML (human MMTV-like) erweitert und des Weiteren je nach Sequenzhomologie im RT-Bereich in die Gruppen HML-1 bis HML-6 eingeteilt (siehe Abbildung 1.6-2). Diese Methode stößt schnell an ihre Grenzen, da auch entfernt verwandte Viren dieselbe tRNA verwenden. Unvollständige Informationen über diese Region, die durch Mutationen oder Deletionen verursacht werden, machen die Klassifikation sehr schwer oder zumindest sehr verwirrend (Bannert and Kurth, 2004).

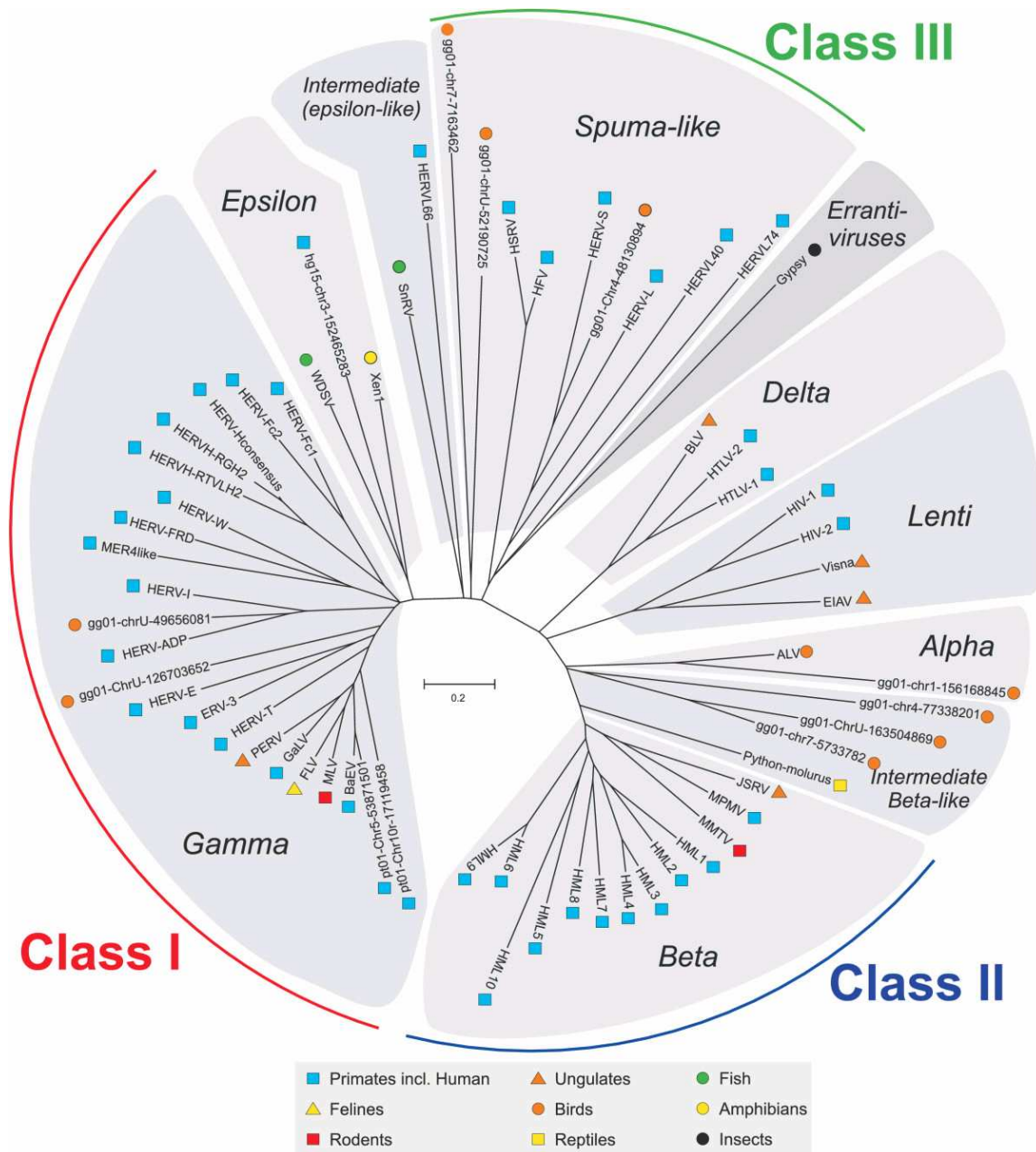


Abbildung 1.6-2 Dieses Dendrogramm zeigt einen aktuellen Überblick der sieben retroviralen Genera: alpha-, beta-, gamma-, delta-, epsilon-, lenti-, und spuma-ähnlichen Retroviren (Jern et al., 2005).

Das in Abbildung 1.6-2 dargestellte Dendrogramm zeigt die aktuelle Einteilung der bekannten endogenen Retroviren. Die nicht sehr stringente Einteilung der drei Klassen endogener Retroviren ist in der Peripherie dargestellt. Die unterschiedlichen Spezies, von denen das jeweilige endogene Retrovirus abstammt, sind durch farbige Symbole neben der taxonomischen Bezeichnung verdeutlicht.

1.7 HERV-K (HML-2)

Die Mitglieder von HERV-K gehören zu den aktivsten humanen endogenen Retroviren.

1986 gelang Ono et al. die Entdeckung des 9469bp langen endogenen Retrovirus HERV-K10(+). Die Sequenzierung ergab, dass je ein Stopkodon zu einer vorzeitigen Unterbrechung der funktionellen Leserahmen für Gag, Pol und Env führt (Ono, 1986). Später wurden bei Sequenzanalysen zwei unterschiedliche Varianten nachgewiesen, die sich durch eine 292bp große Deletion am *pol-env*-Übergang unterscheiden. Des Weiteren erfolgte 1993 der Nachweis verschiedener von HERV-K10 abgeleiteter RNA-Produkte oder DNA-Sequenzen, die vollständig für *gag*, *prt*, *pol* und *env* kodieren. Ein Vergleich mit HERV-K10(+) deckte neben einigen Basensubstitutionen zwei Basenpaare im *pol*-Bereich auf, die zu einem vollständig offenen Leserahmen für *env* und eine weitere Insertion im *gag*-Bereich zu einem vollständig offenen Leserahmen für *gag* führten (Lower et al., 1993).

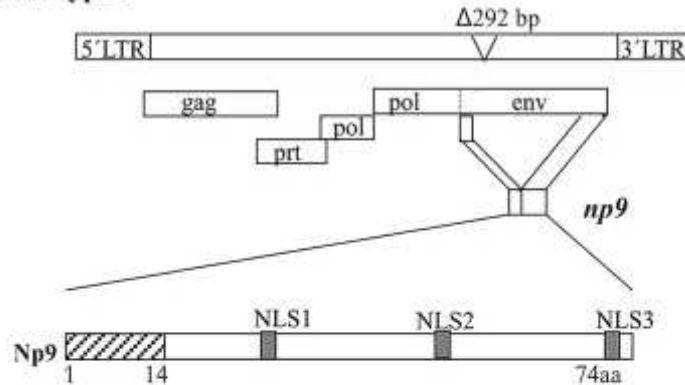
Das von Mayer et al. 1999 beschriebene HERV-K(HML-2.HOM) auf Chromosom 7 beinhaltet nicht die 292 bp Deletion und besitzt somit die vollständigen Leserahmen für alle viralen Gene (HERV-K Prototyp) und nur eine Mutation in einer für die Aktivität der reversen Transkriptase essentiellen Aminosäuresequenz. Auch hier sind, wie es bei vielen Retroviren der Fall ist, allele Polymorphismen beschrieben, allerdings weisen diese immer Deletionen, vorzeitige Stopcodons oder eine defekte RT auf (Bannert and Kurth, 2004, Mayer et al., 1999). Dieses Provirus ist als „tandem repeat“ organisiert. Locuspezifische Untersuchungen der DNA verschiedener humaner Individuen zeigten, dass HERV-K(HML-2)-„tandem-repeat“-Strukturen relativ weit verbreitet sind. Ebenso wurden in dieser Studie HERV-K(HML-2)-Allele gefunden, die ein intaktes YXDD-Motiv innerhalb der Domäne der reversen Transkriptase aufweisen und somit potentiell für eine aktive reverse Transkriptase kodieren.

1.8 Genprodukte von HERV-K(HML-2)

Es existieren zwei Typen des HERV-K(HML-2) Provirus, die sich in entweder einer vorhandenen Deletion (Typ 1, Δ HERV-K Provirus) oder nicht vorhandenen Deletion (Typ 2, HERV-K Provirus) von 292-bp am *pol-env*-Übergang unterscheiden (siehe Abbildung 1.8-3). Da im deletierten Bereich ein starker Spleißdonor vorhanden ist, ergeben sich für die beiden HERV-K(HML-2) Typen Unterschiede in den doppelt gespleißten *env*-Transkripten. Typ 1 greift dabei auf einen weiter stromaufwärts gelegenen Spleißdonor zurück, welcher sich nicht im gleichen Leseraster wie der des HERV-K(HML-2)-Typ 2 Spleißdonors befindet. Dies hat zur Folge, dass sich trotz der Benutzung des gleichen Spleißakzeptors der Leserahmen im dritten Exon

verschiebt und somit zwei unterschiedliche Genprodukte - Rec und Np9 - gebildet werden. Diese beiden Genprodukte teilen sich den gleichen N-Terminus, unterscheiden sich jedoch in ihren C-terminalen Bereichen. Die schematische Darstellung der proviralen Sequenzen ist in Abbildung 1.8-3 dargestellt.

HERV-K101 type 1



HERV-K(HML-2.Hom) type 2

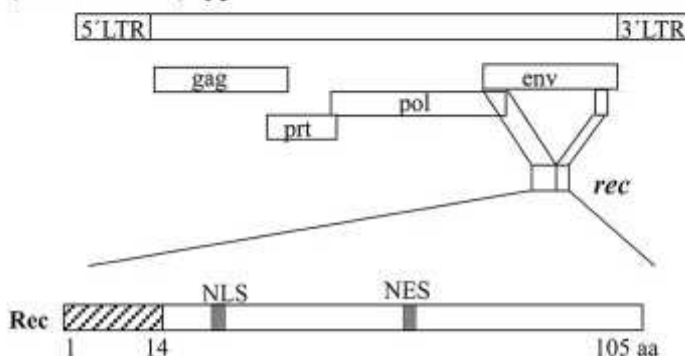


Abbildung 1.8-3 Schematische Darstellung der HERV-K Typ 1 und Typ 2 proviralen Sequenzen. Die ORFs codieren für die Proteine Gag, Prt, Pol und Env. Die 292bp Deletion im *env*-Leserahmenvon HERV-K Typ 1 veranlasst das alternative Speißen des *np9*-Transkrips. Das *rec* Transcript wird von dem Vollängen-*env*-Leserahmen der Typ2 Sequenz transkribiert (nach (Denne et al., 2007)

1.8.1 REC

Das Typ-2-Provirus weist auf einer zweifach gespleißten mRNA einen offenen Leserahmen auf, von dem das 14,7kDa große, regulatorische Protein Rec (regulator of expression encoded bei cORF) exprimiert wird. Zuerst wurde die Sequenz als cORF (central open reading frame) bezeichnet. Da dem Protein viele homologe Funktion, wie Lokalisation in den Nukleoli, Identifikation von Domänen für potentielle Kernimport (NLS) bzw. Kernexport (NES) und RNA-Bindung sowie Spleißcharakteristika zu HIV-Rev bzw. HTLV-Rex entdeckt wurden, erfolgte die Umbenennung in Rec (Magin et al., 1999, Yang and Wu, 1999). Das 105 AS große

Protein teilt sich die Aminoterminalen 87 AS mit Env, das 2. Exon codiert für weitere 18 AS und wird in einem von Env unterschiedlichen Raster gelesen.

Das durch zwei leucinreiche Domänen (50-59 AS und 77-83 AS) gebildete nukleäre Exportsignal (NES) wird von dem zellulären Exportrezeptor Crm1 erkannt. Rec ist somit in der Lage, einfach- oder ungespleißte Transkripte über den Crm1-Weg ins Zytoplasma zu transportieren (Yang and Wu, 1999). Die Zugabe von Leptomycin B, einem spezifischen Crm1 Inhibitor, verhindert den viralen Export (Fasken et al., 2000). Die biologische Funktion von Rec ist homolog zu Rev. Beide Proteine besitzen die Fähigkeit, Multimere zu bilden (Boese et al., 2001).

Interaktionen von Rec sind auch mit dem Promyeloischen Leukämie Zinkfingerprotein (PLZF) beschrieben (Boese et al., 2000). PLZF wird mit der Entstehung von Leukämien in Zusammenhang gebracht (Chen et al., 1993). Bei der Regulation von Prozessen während der Embryogenese, die der Ausbildung von Extremitäten, Zentralem Nervensystem und Testis dienen, wird PLZF eine bedeutende regulatorische Funktion zugeschrieben (Barna et al., 2000, Buaas et al., 2004). Durch eine funktionelle Beeinträchtigung von PLZF durch Rec könnten weiterführende Schädigungen ein erhöhtes Risiko testikulärer Tumore darstellen. Keimbahnzellen bleiben durch PLZF- Expression undifferenziert. Bei ausbleibender Expression gehen die Keimbahnzellen in die Differenzierung über und verlieren die Fähigkeit der Selbsterneuerung (Buaas et al., 2004, Costoya et al., 2008).

1.8.2 *Np9*

Nachdem Seminombiopsien und transformierte Zelllinien auf weitere Transkripte hin untersucht wurden, zeigte sich ein Transkript, welches in sämtlichen Biopsien zugegen war. Das erste Exon ist mit den ersten 44 Basen von *env* und *rec* identisch. Jedoch wird zur Translation des zweiten Exons ein unterschiedliches Leseraster verwendet, das neben einer putativen Casein-Kinase-II-Phosphorylierungsdomäne drei mögliche Kernlokalisations-signale (NLS) aufweist (Armbrüster et al., 2002). Dieses 8,7 kDa große Protein trägt die Bezeichnung Np9. Es wird ausschließlich von dem Typ 1 (Δ -HERV-K) Provirus codiert, das auf Grund seiner 292bp Deletion die spezifische Speiß-Donor-Seite aufweist.

Der Name Np9 (nukleäres Protein von 9kDa) leitet sich von seiner Lokalisation in distinkten subnukleären Strukturen ab. Um den Einfluss von Np9 in der Tumorgenese aufzudecken, wurden als Interaktionspartner u. a. die E3-Ubiquitinligase LNX (Ligand of Numb protein X) als zelluläres Partnerprotein von Np9 identifiziert und mindestens zwei Interaktionsdomänen der beiden Proteine beschrieben. Numb spielt bei der asymmetrischen Zellteilung in der Embryonalentwicklung eine wesentliche Rolle und wird von der Ubiquitinligase ubiquitiniert

und somit für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert. Des Weiteren konnte nach erfolgter Np9-Expression eine Veränderung der subnukleären Lokalisation von LNX nachgewiesen werden. Das LNX-Protein wird durch Np9 in die Nukleoli transloziert. Es wird vermutet, dass LNX auch das Np9-Protein für den Abbau markiert und somit für die geringe Stabilität von Np9 verantwortlich ist. Der erste endogene Nachweis des sehr instabilen und kurzlebigen Np9 gelang erst durch die Hemmung des 26S Proteasoms mit MG132 in der Teratokarzinom-Zelllinie Tera-1 und die daraus resultierende Stabilisierung des Proteins. Es ist zu vermuten, dass Np9 in den Notch/Numb-Pathway eingreift und damit auch in die von diesen Proteinen beeinflusste Tumorgenese (Armbruster et al., 2004). So konnte auch eine Verbindung von einer Notch-Disfunktion zur Entwicklung von Keimzelltumoren gezeigt werden (Adamah et al., 2006).

1.9 Virusinduzierte Zelltransformation und Tumorgenese bzw. Klinische Bedeutung und biologische Funktion

Die Funktionen der konservierten endogenen Sequenzen sind noch in den meisten Fällen ungeklärt. Das Aufrechterhalten einer funktionellen viralen Sequenz legt die Vermutung nahe, dass die Insertion von Vorteil für den Wirtsorganismus ist. Die Plazenta ist das ERV-expressionsreichste Gewebe und ermöglicht die Darstellung der Regulationsmechanismen endogener Retroviren im Bezug auf ihre benachbarten Gene. (Prudhomme et al., 2005). Somit entstand nach Insertion eines HERV-E Elementes oberhalb vom ersten Exon des Pleiotropin(PITN) -Gens ein neuer, retroviraler Promotor, HERV-E LTR (Schulte et al., 1996).

Der Wachstumsfaktor PITN wird ursprünglich im zentralen Nervensystem während der perinatalen Periode exprimiert. Der zusätzliche Promotor ist dabei für die Expression des HERV-E.PITN-Transkriptes in normalen Trophoblastenzellen und in Chorioncarcinoma-Zelllinien verantwortlich, was einen Tropismus des Nervensystems zur Plazenta zur Folge hat. Die Expression des plazentalen Endothelin-B-Rezeptor-Gens (EDNRB) ist ebenso HERV-E LTR bedingt. Das HERV-E Element wirkt als gewebsspezifischer Promotor und Enhancer (Landry et al., 2002).

Mittlerweile sind auch promotor- und enhancerunabhängige regulatorische Effekte wie z.B. die Bereitstellung von Polyadenylierungssignalen zur Expression zellulärer Gene bzw. Spleißvarianten bekannt (Baust et al., 2000, Hughes and Coffin, 2001, Mager et al., 1999).

Des Weiteren ist HERV-E in der zellulären Genregulation verschiedener Gewebe involviert. So konnte in transgenen Mäusen gezeigt werden, dass die Expression des Amylasegens in der Speicheldrüse gewebsspezifisch von einem HERV-E LTR aktiviert wird (Ting et al., 1992). Der

enorme Selektionsvorteil liegt in der darauf begründeten Erkennung kohlenhydratreicher Nahrung. Dies ist für einen Organismus, der ein leistungsfähiges Gehirn besitzt, lebenswichtig.

In der Nähe des insulin-like growth-factor-Gens (INSL4) inserierte ein HERV-K-Gen und verlieh dessen Promotor neue funktionelle Charakteristika. Die Plazenta-spezifische Expression des INSL4-Gens während der Syncytiotrophoblastenbildung wird durch den 3'-LTR dieses HERV-Elementes hervorgerufen (Bieche et al., 2003).

Diese Beispiele zeigen, dass die nicht kodierenden Bereiche wie die LTRs einen großen Einfluss auf die Regulationsmechanismen der Zelle haben können. Aber auch funktionelle HERV-Proteine sind beschrieben. So kodiert der Locus ERVW1, der zur Familie HERV-W gehört, für ein Volllängen-*env* (Blond et al., 1999). Es handelt sich um das Membranfusionsprotein Syncytin, das *in vitro* die Bildung mehrkerniger Riesenzellen induziert (Blond et al., 2000, Mi et al., 2000). Da das ERVWE1 Env-Protein in der Syncytiotrophoblastenzellschicht der menschlichen Plazenta entdeckt wurde, wird ihm eine Schlüsselfunktion in der Differenzierung der Cytotrophoblasten zugeordnet (Blond et al., 2000, Frenzo et al., 2003). Neben HERV-W werden in der menschlichen Plazenta noch weitere Env-Proteine exprimiert: ERV-3 (Boyd et al., 1993) und HERV-E (4-1) (Kitamura et al., 1994). Es wird eine immunsuppressive Wirkung der transmembranen Hüllproteine endogener Retroviren u. a. von HERV-K vermutet, welche eine immunologische Abstoßung der Plazenta vom maternalen Organismus verhindert (Kämmerer et al., in Vorbereitung). Die immunsuppressive Region der Proteine kann Zytokine der Typen 1 und 2 modulieren und die Klasse I-MHC Expression unterdrücken (Haraguchi et al., 1995a, Haraguchi et al., 1995b). Diese Eigenschaft konnte für HERV-H-Env im Mausmodell dargestellt werden (Mangeny et al., 2001).

ERV-3 ist allerdings bei einem Prozent der kaukasischen Bevölkerung und HERV-E (4-1) generell um die immunsuppressive Domäne gekürzt, was die immunmodulatorische Kapazität dieser beiden Proteine anzweifeln lässt (Prudhomme et al., 2005). Bei Syncytin 1 und 2 sind die immunsuppressiven Eigenschaften jedoch eindeutig nachgewiesen (Mangeny et al., 2007).

Bei Multiple-Sklerose-Patienten konnte eine eindeutige Manifestation der Krankheit mit dem von HERV-W kodiertem Glycoprotein Syncytin nachgewiesen werden. Es wurde eine erhöhte Expression von Syncytin in Gliazellen der akut demyelinisierten Gebiete entdeckt. Astrozyten exprimieren Syncytin, welches die Freisetzung von Redox-Reaktionspartnern induziert, die sich toxisch auf die Myelinscheiden bildenden Oligodendrozyten auswirkt (Antony et al., 2004).

Der Zusammenhang humaner endogener Retroviren mit Krebserkrankungen des männlichen Reproduktionstraktes konnte in mehreren Studien hergestellt werden. Die synchrone Expression von ERV-3 und HERV-E(4-1) *env* mRNA erfolgte in Epithelzellen von Prostatatumoren, nicht

jedoch in Geweben von Patienten anderer Prostataerkrankungen oder in gesundem Prostatagewebe (Wang-Johanning et al., 2003).

In gesunden Geweben von Nieren, PBMCs, Plazenta und Testis können HERV-K Transkripte nur durch sehr sensitive Nachweismethoden wie RT-PCR detektiert werden (Denner, 1995).

Des Weiteren ist die Expression von HERV-K Transkripten in testikulärem Tumorgewebe stark hochreguliert und es kommt zur Ausbildung von HTDV-Partikeln (Larsson et al., 1994, Lower et al., 1993). Sowohl HERV-K-Transkripte als auch Partikelbildung wurde in Keimzelltumoren beobachtet (Herbst et al., 1999).

Nach stabiler Transfektion des Rec-Gens wurden Rec-exprimierende Rattenfibroblasten subkutan in immunsupprimierte Nacktmäuse injiziert. Diese bildeten im Gegensatz zu den Kontrollgruppen Tumore aus (Boese et al., 2000). Der Nachweis auf eine Korrelation der Rec Expression mit der Entstehung von Keimzelltumoren in Mäusen erfolgte durch Erzeugung transgener Mäuse, die das *rec*-Gen endogen in allen Zellen trugen. Nach 12 Monaten wiesen die Tiere erste histopathologische Veränderungen des Hodengewebes auf und entwickelten nach 18 Monaten Hodentumore (Galli et al., 2005).

Versuche in der Maus mit Np9 Expression sind nicht beschrieben. Es ist fraglich, ob eine ähnliche Reaktion bei diesem Tiermodell auftreten würde.

1.10 Zielsetzung

Die Genprodukte der doppelt gespleißten mRNA-Transkripte *rec* und *np9* der HERV-K(HML-2)-Proviren im humanen Genom besitzen Domänen für die Interaktion und Inaktivierung des promyeloisch leukämischen Zinkfingers (PLZF). Die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors bedingt eine Veränderung der Genregulation seiner Zielgene, beispielsweise eine Erhöhung von *c-myc*.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Gene zu identifizieren, die nach Überexpression des HERV-K(HML-2) codierten Proteins Rec eine differentielle Expression zeigen. Zur Klärung dieser Fragestellung sollten humane HEK-293 mit einem HERV-K-*rec* tragenden Expressionsvektor transient transfiziert, RNA isoliert und diese mittels einer Affymetrix Genchipanalyse auf differentielle Genexpression untersucht werden. Die Expression der differentiel exprimierten Gene sollte anschließend mit Hilfe der real time PCR überprüft werden.

Des Weiteren galt es, die Methode der Differential Display-PCR zu etablieren. Diese Methode erlaubt es, im Gegensatz zu Genchipanalysen, auch differentiel exprimierte, unbekannte mRNA-Transkripte zu entdecken.

Da neben *rec* auch das Genprodukt der HERV-K env-Spleißvariante *np9* eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor PLZF zeigt und diesen inhibiert, sollte das *np9*-Gen codonoptimiert und mittels Gensynthese synthetisiert werden. Anschließend sollten die Syntheseprodukte in den Expressionsvektor pcDNA4A kloniert und die Funktionalität des Systems verifiziert werden. Die Untersuchung der biologischen Aktivität des Np9 Proteins sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot Analysen erfolgen.

2 MATERIAL

Die verwendeten Chemikalien und kommerziellen Kits sowie die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen sind im Methodenteil im Zusammenhang mit den entsprechenden Methoden aufgeführt.

2.1 Bakterienstämme

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurden Bakterienstämme der Firma Stratagene verwendet.

Bakterienstämme	Bezeichnung Stamm / Genotyp
Top10 F'	<i>E. coli</i> / F'(lacIq, Tn10(TetR)) <i>mcrA</i> Δ (<i>mrrhsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ m15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR)

2.2 Enzyme

Verwendete Enzyme:

Bezeichnung	Art des Enzyms	Hersteller
AMPLITAQ GOLD DNA Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase	Applied Biosystems
PFU DNA Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase	Fermentas
Reverse Transkriptase	RNA-abhängige DNA-Polymerase	Fermentas
DNase	Desoxyribonuklease (Hydrolase)	Qiagen
T4 DNA Ligase	DNA-Ligase	Roche
AgeI	Restriktionsendonuklease	NEB
SacI	Restriktionsendonuklease	NEB
PmeI	Restriktionsendonuklease	NEB
Trypsin Serin	Endopeptidase (Hydrolase)	Sigma

2.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma bezogen. Die Oligonukleotide für die Gensynthese und die Differential Display-PCR wurden mit dem Reinheitsgrad „HPLC“, alle anderen Oligonukleotide im Reinheitsgrad „entsalzt“ bestellt.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Gensynthese	
NP9_22Q11 FOR: (1-50 NT)	AGCGCAGCTAGCGCCGCCACCATGAACCCTAGCGAGATGCAGCGCAAGGG
NP9_22Q11 REV: (24-74 NT)	TGCAGGCACCAGCGGCGAGGAGGGCCCTTGCCTGCATCTCGCTAGGGTTC
NP9_22Q11 FOR: (51-102 NT)	CCCTCCTCGCCGCTGGTGCCTGCAGGTGTACCCTACCGCCCTAAGCGCCAG
NP9_22Q11 REV: (75-125 NT)	TCGTGGCCGGTGC GGCTAGGGCGCTGGCGCTTAGGGGCGGTAGGGTACACC
NP9_22Q11 FOR: (103-153 NT)	CGCCCTAGCCGCACCGGCCACGACGACGACGCGCGGCTTCGTGGAGAAGAAG
NP9_22Q11 REV: (126-176 NT)	TGCTTCTCGCCCACTTGCCGCGCTTCTTCCACGAAGCCGCCGTCTCG
NP9_22Q11 FOR: (154-204 NT)	CGCGCAAGTGC GGCGAGAAGCAGGAGCGCAGCGACTGCTACTGCGTGTGC
NP9_22Q11 REV: (177-227 NT)	CGGCGGTGGCGGCTGCGCTCCACGCACACGCAGTAGCAGTCGCTGCGCTCC
NP9_22Q11 FOR: (205-258 NT)	GTGGAGCGCAGCCGCCACCGCCGCTGCACTTCGTGATGTGCACCGGTAGCGCG
NP9_22Q11 REV: (228-258 NT)	CGCGTACCGGTGCACATCACGAAGTGCAGG
NP9_1Q22 FOR: (1-50 NT)	GCGCAGCTAGCGCCGCCACCATGAACCCTCTGGAGATGCAGCGCAAGGG
NP9_1Q22 REV: (24-74 NT)	GCAGGCACCAGCGGCGAGGAGGGCCCTTGCCTGCATCTCCAGAGGGTTC
NP9_1Q22 REV: (177-227 NT)	GGCCGTGGCGGCTGCGCTCCACGCACACGCAGTAGCAGTCGCTGCGCTCC
NP9_1Q22 FOR: (205-258 NT)	TGGAGCGCAGCCGCCACGGCCGCTGCACTTCGTGATGTGCACCGGTAGCGCG
NP9_5Q33 FOR: (154-204 NT)	GCGGCAAGTGC GGCGAGAAGCAGGAGCGCAGCAACTGCTACTGCGTGTGC
NP9_5Q33 REV: (177-227 NT)	GGCGGTGGCGGCTGCGCTCCACGCACACGCAGTAGCAGTTGCTGCGCTCC
NP9_3Q12 REV: (24-74 NT)	GCAGGCACCAGCGCTGAGGAGGGCCCTTGCCTGCATCTCGCTAGGGTTC
NP9_3Q12 FOR: (51-102 NT)	CCTCCTCAGCGCTGGTGCCTGCAGGTGTACCCTACCGCCCTAAGCGCCAG
NP9_3Q12 FOR: (205-258 NT)	TGGAGCGCAGCCGCCACCGCCGCTGCACTTCGTGCTGTACACCGGTAGCGCG
NP9_3Q12 REV: (228-258 NT)	GCGTACCGGTGTACAGCACGAAGTGCAGG
Differential display:	
P1 delta Diff. Display	TAACCCTCACTAAATGCTGGGGA
P2 delta Diff. Display	ACCCTCACTAAATCGGTCATAG
P3 delta Diff. Display	ACCCTCACTAAATGCTGGTGG
P4 delta Diff. Display	ACCCTCACTAAATGCTGGTAG
P5 delta Diff. Display	ACCCTCACTAAAGATCTGACTG
P6 delta Diff. Display	ACCCTCACTAAATGCTGGGTG
P7 delta Diff. Display	ACCCTCACTAAATGCTGTATG
P8 delta Diff. Display	ACCCTCACTAAATGGAGCTGG
P9 delta Diff. Display	ACCCTCACTAAATGTGGCAGG
P10 delta Diff. Display	ACCCTCACTAAAGCACCGTCC
T1 delta Diff. Display	ATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAA
T2 delta Diff. Display	ATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAC
T3 delta Diff. Display	ATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAG

T4 delta Diff. Display	ATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCA
T5 delta Diff. Display	ATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCC
T6 delta Diff. Display	ATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCG
T7 delta Diff. Display	ATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGA
T8 delta Diff. Display	ATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGC
T9 delta Diff. Display	ATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGG
Real time PCR:	
HDAC3 – FW	GGATGAACGGGTAGACA
HDAC3 – REV	TCCCCACACTTGAAAAC
SOX-30 – FW	AGGGGAAAGGGGAAATA
SOX-30 – REV	ACCCAGGTGCCATTA
EED – FW	GGGATAGCAGCATTCTT
EED – REV	CTCAGCCTGATTGAATG
Cyclin L beta – FW	CTGCATCAGTTCTTGGT
Cyclin L beta – REV	CATTTTAATGTGCAAAAA
BMZF-3 – FW	GAATGTGGGGAGTGTGG
BMZF-3 – REV	CCGGTGTGACTTCTCCT
NFAR – FW	TAGGCCCTGGTCGTCAC
NFAR – REV	GAAGCTCCCAACTATGC
RRN3 TIF-1A – FW	TCCAGGGCTTTGTATGC
RRN3 TIF-1A – REV	GGGAATTTCGTTACTCG
ZNF91 – FW	CCTTACTCAAGGGTGTAGG
ZNF91 – REV	TAATGGAGACCGCATTT
PSF – FW	AATGCATCTGGAGGCTA
PSF – REV	CCACTTTCACCCCTAC
MDA-5 – FW	AGTGTGCTAGCCTGTTC
MDA-5 – REV	GCCTTTGTGCACCATCA
SF-9G8 – FW	GCATTTCTTAGCCTTGG
SF-9G8 – REV	AGCCAGTCAAAATTC
RNA-BP-9 – FW	GTCAAGGAGGAAGGAGA
RNA-BP-9 – REV	CTGTCAAAGACCAGAAA
KOX17 LE – FW	GGTGGGCAAGTATCAGG
KOX17 LE – REV	CTCAGACAAGGGGAAGA
KOX17 SE – FW	TCAGCCGAAGTTCATT
KOX17 SE – REV	ATTTCCCACTGAACG
ATF-3 – FW	GCTGGAAGAGCCAAAGA
ATF-3 – REV	TCACAGCTGCAAACACC
hsDRoT-1 LE – FW	ATTGTGGCTCCAGGAT
hsDRoT-1 LE – REV	TTCACTTCATGGGGGAAG
hsDRoT-1 SE – FW	GCAGCGAGTCTTCGTTT
hsDRoT-1 SE – REV	TCACCAACCCAATCCAAT

ZN195 LV – FW	ATGTGACGAATGTGGAAA
ZN195 LV – REV	GGGATGCGAGCAGATAC
GUSB_for	AAACGATTGCAGGGTTTCACC
GUSB_rev	GCGTTTTTGATCCAGACCCA
ActinB_for	AAACGATTGCAGGGTTTCACC
ActinB_rev	GCGTTTTTGATCCAGACCCA
PSMC4_for	GGCTGGACCGTAAAATTGAA
PSMC4_rev	CCAGGACAATGTAGCGGTTT
MRPL19_for	GAGGCTTCCAATCTCCTTCC
MRPL19_rev	TTTTGAGAGGTTCTTTTGAGAGG
PUM1_for	CAGTCAAAAGGACGTGCAAA
PUM1_rev	ACACAAGGCTCTGGAAATGT
SF3A1_for	AAACAGGTGGTGTGGGACTT
SF3A1_rev	TTCTGATCATTACTGGCCTCCT
Klonierungsprimer:	
np9_fw_WT_nheI_kozak	AGCGCAGCTAGCGCCGCCACCATGAACCCATCGGAGATG
np9_rev_WT_ageI	CGCGCTACCGGTGTACAGAACAAAATGGAGTCTCCT
gfp_pLVTHM_for_ageI	GTCGTGACCGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
gfp_pLVLTHM_rev_ageI	CGCGCTACCGGTCTTGTACAGCTCGTCCATGC

2.4 Plasmidkonstrukte

Die unten stehende Auflistung enthält die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Art des Plasmids	Hersteller / Quelle
pCDNA3	eukaryontischer Expressionsvektor	Dr.Bannert
pCDNA3[coop- <i>rev</i> -K113]	eukaryontischer Expressionsvektor	Dr.Bannert
pCDNA4A	eukaryontischer Expressionsvektor	Dr.Bannert
pmaxGFP	GFP-Kontrollvektor	Amara
pLVTHM	eukaryontischer Expressionsvektor	Addgene
pSSTA	Klonierungsvektor	Sven Stengel

2.5 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
anti- β -Aktin, monoklonal Klon AC-74	1:5000	Sigma-Aldrich
Anit-V5 Antibody	1:5000	Invitrogen
Penta-His Antibody	1:1000	Qiagen
GFP(B-2) HRP	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse HRP	1:5000	Dako

2.6 DNA- und Protein-Längenstandards

Standard	Hersteller
O'GENERULER™ DNA LADDER MIX	Fermentas
O'GENERULER™ 100bp DNA Ladder Plus	Invitrogen
PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER	Fermentas

2.7 Eukaryontische Zellen

Bezeichnung	Spezies	Zelltyp	Herkunft	Medium
HEK-293	Mensch	Embryonale Nierenzelllinie	ATCC CRL-1573	DMEM
HeLa	Mensch	cervicales Adenokarzinom	ATCC CCL-2	DMEM

2.8 Hersteller und Firmensitze

Firma	Firmensitz
Applied Biosystems	Forster City, CA, USA
Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Biorad	München, Deutschland
Biozym	Hess. Oldendorf, Deutschland
Dako	Cytomation Glostrup, Dänemark
DNA Star	Madison, WI, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fermentas	St.Leon-Roth, Deutschland
Fujifilm	Düsseldorf, Deutschland

GE Healthcare	München, Deutschland
Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Hoefler	San Francisco, CA, USA
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Millipore	Schwalbach, Deutschland
Novagen	Darmstadt, Deutschland
New Brunswick Scientific	Nürtingen, Deutschland
New England Biolabs	Frankfurt, Deutschland
Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Pierce	Bonn, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Roche	Mannheim, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Stratagene	Amsterdam, Niederlande
USB	Corporation Cleveland, OH, USA
Tecan	Crailsheim, Deutschland
TPP	Trasadingen, Schweiz
Wheaton	Millville, NJ, USA
Zeiss	Göttingen, Deutschland

2.9 Medien

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) NaCl

Antibiotika: Ampicillin (100 µg/mL Endkonzentration)

Die Medien DMEM 4,5 g/L Glucose (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) und RPMI (Invitrogen, Karlsruhe Deutschland) wurden jeweils mit 10 % (v/v) FBS (Biochrom) 2 mM L-Glutamin (200 mM; Biochrom), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (Penicillin 10000 U/mL, Streptomycin 10 mg/mL; Biochrom) und 15 mM HEPES (1 M; Biochrom)

versetzt. Des Weiteren wurden PBS ohne Kalzium und Magnesium (Biochrom), Trypsin (0,25 %) und Hygromycin (50 mg/mL; beides Invitrogen) verwendet.

3 Methoden

3.1 Methoden der Zellkultur

3.1.1 Kulturbedingungen für immortalisierte Zelllinien

Die Zelllinien HeLa und HEK-293 wurden bei 5 % CO₂, 96 % relativer Luftfeuchte und 37 °C im Brutschrank in Vollmedium (siehe Kapitel 2.9) in Kulturschalen kultiviert.

3.1.2 Passagieren von Zellen

Die bis zu 70 % bewachsenen Kulturschalen wurden vom Medium befreit und anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von einem Milliliter Trypsin/EDTA-Lösung und einer 5-10 minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die von der Oberfläche abgelösten Zellen in 7 mL frischem Medium aufgenommen. Alternativ wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS-Puffer mit 5 mL Nährmedium bedeckt und mit einem Zellschaber vom Grund der Zellkulturflasche abgelöst und resuspendiert. Je nach Bedarf wurden Teilmengen dieser Zellsuspension auf eine neue Kulturschale gegeben und mit dem entsprechendem Volumen an Medium versorgt. Beispielsweise wurden für das Passagieren einer 10 cm Kulturschale für zwei Generationen die abgelösten Zellen in ein Endvolumen von 8 mL aufgenommen, davon 2 mL auf eine neue Kulturschale gegeben und mit 9 mL Medium aufgefüllt.

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die langfristige Lagerung von Zellen über mehrere Jahre wurden diese in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren. Dafür wurden sie in Suspension gebracht und bei 500 g für 5 min pelletiert. Bis zu 2x10⁶ Zellen wurden in 1 mL vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen und in ein 2 mL Kryogefäß überführt. Die Röhrchen wurden in einer verschlossenen Styroporbox bei -80 °C über Nacht eingefroren und danach in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryogefäße im Wasserbad bei 37 °C für 2 min inkubiert und anschließend in 5 mL Medium aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 500 g für 5 min wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Einfriermedium:

FKS + 10 % DMSO

3.1.4 Transfektion von Zellen

Für die Transfektion der humanen Zelllinie HEK-293 wurde auf das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 der Firma Invitrogen zurückgegriffen. Am Vortag wurden Zellen mit einer Konfluenz von 80 % ausgesät. Danach kam das Transfektionsprotokoll des Herstellers zur Anwendung. 6 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Ernte der Zellen erfolgte je nach experimentellem Aufbau 6-72 h nach Transfektion.

3.1.5 Herstellung der fluoreszenzmikroskopischen Präparate

Die Zellen wurden auf Poli-L-Lysin beschichteten Deckgläschen angezchtet. Nach Transfektion und weiteren 48h Inkubation wurden die Zellen in PFA fixiert. Das Einbetten der Präparate auf Objektträgern erfolgte mit DAPI/DABCO versetztem Moviol, um eine Zellkernfärbung zur Lokalisation zu erhalten. Nach erfolgter Trocknung wurden die Objekte unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte am Nanodrop-Spektrophotometer nach Herstellerprotokoll.

3.2.2 RNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung der RNA wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Der im Protokoll optional angegebene Verdau der DNA mit DNaseQ (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde bei allen Proben durchgeführt.

Die aufgereinigte RNA wurde anschließend am Spektrophotometer quantifiziert (siehe Kapitel 3.2.1) und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) liegt eine spezifische Bindung und Verlängerung zweier der zu amplifizierenden DNA oder cDNA komplementärer Oligonukleotide zugrunde. Diese Oligonukleotide (Primer) flankieren den 5'- und 3'-Enden den zu amplifizierenden DNA-Bereich und dienen als Start der DNA-Amplifikation. Mit Hilfe der PCR lassen sich spezifische DNA-Fragmente, ausgehend von sehr kleinen DNA-Mengen, durch diese zyklisch ablaufende Reaktion exponentiell vermehren (Mullis et al., 1986). Zunächst wird die Doppelhelix der Ausgangs-DNA (Template) durch Erhitzen auf 95 °C in ihre Einzelstränge aufgespalten. Im Anschluss hybridisieren die Primer durch Absenken der Reaktionstemperatur (auf ca. 45-65 °C, abhängig von der Schmelztemperatur der Primer) komplementär mit je einem der beiden DNA-Stränge. Bei einer Reaktionstemperatur von 72 °C werden die Primer am 3'-OH-Ende in der anschließenden DNA-Synthese durch die thermostabile Taq-Polymerase gemäß des Matrizenstranges verlängert, wobei die Syntheserichtungen der beiden Primer gegeneinander gerichtet sind. Diese drei Schritte - Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer und DNA-Synthese - stellen einen PCR-Zyklus dar. Durch Wiederholung der Zyklen wird theoretisch eine exponentielle Amplifikation des durch die Primer flankierten DNA-Abschnitts erzielt. So kann eine spezifische Sequenz amplifiziert werden.

Ein typischer PCR-Ansatz ist in Tabelle 1 aufgeführt:

Da eine einfache Taq-Polymerase schon bei der Vorbereitung der PCR zu unspezifischen Amplifikaten führen kann, wurde ein hot-start Enzym (Hot-Start-Taq-Polymerase) benutzt.

Tabelle 1 PCR-Mastermix Zusammensetzung für AmpliTaq Gold oder selbst hergestellte Polymerase (links) und Cyclyer-Temperaturprogramm (rechts)

	Vol. in µL	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklenzahl
10x Puffer	2,5	95	10 min	1
Primer	1	95	30 s	39
dNTP's	1	63	30 s	
Taq	0,25	72	30 s	
Template	50-100 ng	72	2 min	1
Wasser	ad 25	4	unendlich	1

3.2.4 Kolonie-PCR

Die Identifikation plasmidtragender Bakterien erfolgte mit Hilfe der Kolonie-PCR. Dafür wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine Bakterienkolonie gepickt, in den fertigen PCR-Ansatz überführt und durch leichtes Rühren verteilt. Auf Grund des ersten Denaturierungsschrittes werden die Bakterien lysiert und die Plasmid-DNA dient als Matrize für die PCR.

Der Ansatz ist äquivalent zur oben genannten Standard-PCR (siehe Kapitel 3.2.3). Für eine spezifischere Reaktion wurde dem Ansatz zusätzlich 5 % DMSO hinzugefügt.

3.2.5 cDNA-Synthese durch die one-step Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Für das Umschreiben von gesamt RNA aus eukaryotischen Zellen in einzelsträngige cDNA kam das RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase Kit der Firma Fermentas zur Anwendung. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Pro Ansatz wurden 5 µg gesamt RNA eingesetzt. Als Primer dienten Oligo(dT)-Nukleotide.

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmentgemischen entsprechend ihrer Größe. Die von Meyers et al. beschriebene Methodik wurde zur Nativen-Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt (Meyers et al., 1976). Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde die Agarose-Konzentration zwischen 1 und 2 % variiert. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Horizontal-Gele verwendet. Dazu wurde eine 1-2 % Agarose-Lösung mit TAE-Puffer gekocht und nach Abkühlen auf ca. 50 °C in die vorbereiteten Kammern gegossen. Neben den mit Ladepuffer (50 % (w/v) Glycerin, 10 mM Tris, 10 mg/mL Orange G, pH 7,5) versehenen Proben wurden zusätzlich käufliche Längenstandards (100 bp DNA Ladder Plus und DNA Ladder Mix, Fermentas) aufgetragen. Die negativ geladene DNA läuft hierbei im elektrischen Feld Richtung Anode durch ein grobmaschiges Netz aus Zuckerpolymeren. Größere Fragmente benötigen mehr Zeit, um durch die Matrix zu gelangen als kleinere. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 5-8 V/cm² durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 20 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/mL Ethidiumbromid) inkubiert. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA. Durch Anregung des interkalierten Farbstoffes mit UV-Licht (302 nm) emittiert Ethidiumbromid Licht mit einer Wellenlänge von 590 nm. Die so sichtbare DNA wurde digital mit dem BioRad GelDoc

dokumentiert und, falls nötig, für die weitere Verwendung aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

3.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen kam das Qiaquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen zur Anwendung. Hierfür wurde die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit 20 µL ddH₂O.

Nach erfolgreicher Isolation konnte die Konzentration und Reinheit der gewonnen DNA mit Hilfe eines Spektrophotometers (siehe Kapitel 3.2.1) ermittelt werden.

3.2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten aus einem PCR-Ansatz kam das PCR-Purification-Kit der Firma Qiagen zur Anwendung. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Elution der DNA erfolgte in 30 µL ddH₂O.

Nach erfolgreicher Aufreinigung konnte die Konzentration und Reinheit der gewonnen DNA mit Hilfe eines Spektrophotometers (siehe Kapitel 3.2.1) ermittelt werden.

3.2.9 Plasmid-DNA-Präparation

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde das Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Elution der plasmidären DNA wurden 50 µL ddH₂O verwendet.

Nach erfolgreicher Aufreinigung konnte die Konzentration und Reinheit der gewonnen DNA mit Hilfe eines Spektrophotometers (siehe Kapitel 3.2.1) ermittelt werden.

3.2.10 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.2.10.1 Synthese von DNA-Fragmenten

Die Herstellung der zu klonierenden PCR-Fragmente erfolgte mit Hilfe einer Standard-PCR (siehe Kapitel 3.2.3) und genspezifischen Primern. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte je nach Spezifität der Reaktion durch Gelextraktion aus Agarosegelen (siehe Kapitel 3.2.7) oder

mittels PCR-Purification (siehe Kapitel 3.2.8). Danach erfolgte der Verdau der PCR-Fragmente mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (siehe Kapitel 3.2.10.2).

3.2.10.2 Verdau von DNA-Fragmenten mit Endonukleasen

Für den Verdau von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA kamen ausschließlich Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs und die entsprechenden Puffer und Zusätze wie beispielsweise BSA zum Einsatz. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Ein typischer Reaktionsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

- 100 ng-2 µg Plasmid-DNA oder PCR-Amplifikat
 - 2 µL 10x Reaktionspuffer (New England Biolabs)
 - 0,2 µL 100x BSA (New England Biolabs)
 - 2-5 units Enzym (New England Biolabs)
- add 20 µL ddH₂O

Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für zwei Stunden

3.2.10.3 Ligation

Die enzymbasierte kovalente Verknüpfung zweier DNA-Moleküle erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase der Firma New England Biolabs.

Ein typischer Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 20 µL und enthielt:

- 20 ng Vektor-DNA
 - Inset-DNA-Molekülzahl = Vektormolekülzahl x 5
 - 2 µL 10x T4-Ligase-Puffer (New England Biolabs)
 - 1 U T4 Ligase (New England Biolabs)
- add 20 µL ddH₂O

3.2.10.4 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Für die Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien fanden chemokompetente *E.coli* Top10 F' Verwendung (Herstellung siehe Kapitel 3.2.13). 10 µL des Ligationsansatzes (siehe Kapitel 3.2.10.3) oder 1 ng gereinigter Plasmid-DNA wurde zu einem auf Eis aufgetauten 100 µl Bakterien-Aliquot gegeben. Der Ansatz wurde anschließend vorsichtig durchmischt und 30 min

auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock durch Erhitzen des Ansatzes auf 42 °C für 45 s. Im Anschluss wurde der Ansatz für 3 min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µL LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurde der Ansatz 30 min bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden danach bei 2.000 g 2 min. pelletiert und in 100 µL Medium aufgenommen. 50-100 µL Bakteriensuspension wurden auf einer LB-Agar-Platte mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und 16 h bei 37 °C inkubiert.

3.2.11 Glycerinkulturen

Zum längerfristigen Aufbewahren von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. 0,5 mL einer Übernachtskultur wurden mit 0,5 mL sterilem Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.2.12 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen erfolgten nach dem „Cycle-Sequencing-Verfahren“ nach Sanger et al. auf einem ABI-Prism Sequenzierautomaten (Sanger et al., 1977). Dafür wurde eine Sequenzierungs-PCR mit dem ABI BigDye Terminator v3.1-Kit durchgeführt (siehe Tabelle 2).

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Lasergene von DNA* und Bioedit.

Tabelle 2 PCR-Sequenzierungsprogramm nach dem ABI BigDye v3.1-System. Dargestellt ist die Zusammensetzung des PCR Mastermixes und das Temperatur- und Zeitprogramm des Thermocyclers.

	Vol. [µL]	Temp [°C]	Dauer	Zykluszahl
5xPuffer	2	96	1-2 min	1
Primer	0,5	96	10 s	24
BigDye 3.1	2	53	5 s	
Template(200 ng)	1-4	60	4 min	
Wasser	add 10	4	unendlich	1

3.2.13 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung von kompetenten Bakterien erfolgte nach dem Rubidiumchloridprotokoll (Qiagen, Hilden, Deutschland). Als Ausgangsmaterial wurden *E.coli oneShot*[®] TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

In 100 mL LB-Medium wurden 1:1000 Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C mit 220 rpm schüttelnd bis zu einer OD600 von 0,5 inkubiert. Nach fünfminütigem Kühlen auf Eis werden die Bakterien in einer Beckman-Zentifuge (10 min, 4000 g, 4 °C) pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 30 mL TFB I-Puffer (siehe Tabelle 3) resuspendiert. Dieser Ansatz wurde 90 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut pelletiert (10 min, 4000 g, 4 °C). Das Pellet wurde nun in 4 mL eiskaltem TFB II-Puffer (siehe Tabelle 3) resuspendiert und zu je 100 µL aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Pufferlösungen müssen sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 3 Zusammensetzung der Puffer TFB I und TFB II

TFB I (pH 5,8)	
100 mM	RbCl
50 mM	MnVL
30 mM	Kaliumacetat
10 mM	CaCl ₂
15 % (v/v)	Glycerol

TFB II (pH 6,8)	
10 mM	RbCl
10 mM	MOPS
75 mM	CaCl ₂
15 % (V/V)	Glycerol

3.3 Gensynthese

Zur Herstellung der codonoptimierten *np9*-Konstrukte wurden die zu klonierenden DNA-Sequenzen mit Hilfe der *in vitro* Gensynthese erzeugt. Dabei kam die Methode überlappender Primer zur Anwendung. Für jedes Konstrukt wurden je fünf Vorwärts- und fünf

Rückwärtsprimer a 50 Nukleotide mit je 25 bp Überlappung verwendet (Sequenzen siehe Kapitel 2.3). Je 100 pmol der Oligonukleotide wurden in 50 μ L Annealing-Puffer aufgenommen und für 4 min bei 95 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 70 °C für 10 Minuten. Im Anschluss wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt. Für die Amplifikation der neu synthetisierten DNA-Moleküle wurde eine Standard-PCR (siehe Kapitel 3.2.3) durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass das Template (1 μ L des Reaktionsgemisches) erst nach den ersten zwei Denaturierungsschritten der PCR hinzugegeben wird (Ansatz bei 60 °C). Die so gewonnenen DNA-Amplifikate wurden daraufhin mittels Agarosegelelektrophorese auf ihre Integrität untersucht (siehe Kapitel 3.2.6), Banden richtiger Größe aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (Kapitel 3.2.7) und standen anschließend für die Klonierung (siehe Kapitel 3.2.10) zur Verfügung.

Annealing-Puffer:

100 mM Kaliumacetat

30 mM HEPES pH7,4

2 mM Magnesiumacetat

3.4 Real time PCR

Die real time PCR ist eine Methode zur gleichzeitigen spezifischen Amplifikation und quantitativen Detektion von DNA (Higuchi et al., 1992) und ermöglicht es, die PCR-Reaktion in allen Zyklen zu verfolgen. Die eigentliche Reaktion verläuft wie bei der konventionellen PCR, dem Reaktionsansatz wird aber zusätzlich eine fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonde (TaqMan PCR) oder ein DNA-interkalierender Farbstoff zugesetzt.

Auswertung der real time PCR Auswertung

Die Analyse der real time PCR erfolgt digital über die während der PCR aufgenommenen Daten und nicht über eine Gelanalyse, wie es bei der normalen PCR üblich ist. Die Auswertung erfolgte über den Threshold Cycle (C_T). Dieser gibt den Zyklus der PCR an, in dem die Fluoreszenz einer Probe das erste Mal deutlich über der Hintergrundfluoreszenz (Schwellenwert) liegt. Hierbei gilt, je mehr Zielgen in der Probe vorhanden ist, desto kleiner ist der C_T -Wert. Zur Bestimmung des C-Wertes, der zur Quantifizierung der eingesetzten cDNA-Menge herangezogen wird, trägt man die EVA Green Fluoreszenz (R_n) gegen die Zyklenzahl auf. Die Basislinie ist definiert als der Bereich, in welchem die Fluoreszenz von in DNA-Doppelstränge eingelagertem EVA Green unter der Detektionsgrenze liegt, und sollte mindestens 3 Zyklen umfassen. Der C-Wert gibt die

Anzahl an Zyklen an, die benötigt werden, bis R_n einen in den Bereich der exponentiellen Fluoreszenzzunahme gelegten Schwellenwert erreicht.

Für die Standardgeraden werden C-Werte gegen den Logarithmus der Anzahl an eingesetzten Template-DNA-Molekülen aufgetragen. Die negative Steigung der Geraden ist ein Maß für die Effizienz der Amplifikation. Im Idealfall, wenn in jedem PCR-Zyklus die DNA-Menge verdoppelt wird, gilt für die Differenz der C-Werte von zwei Proben, deren Konzentration sich um Faktor 10 unterscheidet:

$$2^{\Delta C_t} = 10$$

und folglich: $\Delta C_t = 3,32$

Dies ist im Idealfall die negative Steigung der Standardgeraden bei einer Abszisse im Zehnerlogarithmus.

Die Ermittlung der C_t -Werte wird automatisch von dem Computerprogramm der real time-PCR-Maschine (MX4000 Stratagene) durchgeführt.

$\Delta\Delta C_t$ -Methode

Die Auswertung erfolgte nach der von K. Livak beschriebenen $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001). Für den Fall, dass die zwei Primerpaare ihr Zielgen mit ähnlicher Effizienz amplifizieren, was an der Steigung der Standardgeraden ablesbar ist, kann mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode eine relative Quantifizierung durchgeführt werden. Dabei wird die Transkriptmenge als Vielfaches einer Vergleichsprobe angegeben. In einem ersten Schritt werden unterschiedliche cDNA Konzentrationen der Proben auf ein endogenes, konstant exprimiertes Kontrollgen (Housekeepinggen, hier: β -Actin, GUS- β und PUM 1) normalisiert. Aus dem C_t -Wert des Gens A erhält man also den $\Delta C_{t,A}$ -Wert, der für jede Probe auf die endogene Kontrolle normalisiert ist, durch:

$$\Delta C_{t,A} = C_{t,A} - C_{t,K}$$

Die mRNA-Konzentration [A] des Gens A aus verschiedenen Proben vergleicht man mit dem $\Delta\Delta C_t$ -Wert, wobei die mRNA-Menge aus der Probe X als Vielfaches der mRNA-Menge von Probe 0 angegeben wird:

$$\Delta\Delta C_{t,Ax} = \Delta C_{t,Ax} - \Delta C_{t,A0}$$

$$\text{bzw. } \frac{[A_x]}{[A_0]} = 2^{-\Delta\Delta C_{t,Ax}} = E_{rel}$$

Das Verhältnis [Ax] zu [A0] wird auch als *relative Expression* (E_{rel}) bezeichnet.

Die Bestimmung der relativen Expression von den potentiellen Zielgenen wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel durchgeführt.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Protein-Aufreinigung mittels RIPA-Lyse

Gesamtzellprotein aus humanen Zellen wurde mit Hilfe der RIPA-Lyse gewonnen. Hierzu wurden nach der Ernte der eukaryotischen Zellen diese mit PBS gewaschen, pelletiert und in eiskaltem RIPA-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubation für 15 min auf Eis wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation mit 10.000 g bei 4 °C pelletiert. Der Überstand enthielt das Gesamtprotein der Zellen und wurde in eine neues Gefäß überführt und bei -20 °C bis zu weiteren Verwendung gelagert.

RIPA-Puffer (pH 7,5)

25 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

0,5 % Natriumdeoxycholat

0,1 % SDS

2 % Tween

3.5.2 BCA-Protein Assay

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben mit 1 % SDS erfolgte nach dem BCA Protein Assay von Pierce (Bonn, Deutschland). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Das Auslesen der Daten erfolgte im Elisa Reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 570 nm gegen eine Referenz von 492 nm.

Die Proteinkonzentration wurden immer im Vergleich zur Eichgeraden eines BSA-Standards (von 200, 400, 600, 800,1000 und 1200 µg/mL) in Dreifachansätzen bestimmt.

3.5.3 SDS-Page

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurde verwendet, um Proteine nach ihrer molekularen Größe zu trennen. Dabei wandern SDS-beladene, weitgehend

denaturierte Proteine mit Hilfe einer angelegten Spannung durch ein Polyacrylamidgel. Das anionische Detergenz SDS sorgt dabei für die annähernd gleichmäßige negative Ladung der Proteine.

Die Proteinproben wurden hierfür in 4-fachem Probenpuffer aufgenommen und für 5-10 min bei 95 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 g für 5 min, und der Überstand wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Die SDS-PAGE bestand aus einem 4 % Sammelgel und einem 12 % Trenngel (Zusammensetzung der Puffer siehe unten). Ein kommerzieller vorgefärbter Größenstandard (Proteinladder, Fermentas) wurde mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte im BioRad Mini Protean II – System bei 100 V für 1 h.

Danach standen die Gele für einen direkten Proteinnachweis mittels Coomassie Färbung oder für einen Blot auf PVDF-Membranen zur Verfügung.

Sammelgelpuffer (pH 6,7):

0,5 M Tris

0,4 % SDS

H₂O

Trenngelpuffer

1,5 M Tris

0,4 % SDS

H₂O

Laufpuffer

0,025 M Tris

0,2 M Glycin

0,1 % SDS

H₂O

0,02 % (w/v) Coomassie Blue G250

Probenpuffer (4x):

100 mM Tris

25 % (v/v) Glycerin

10 % (w/v) SDS

10 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Entfärber-Lösung

10 % (v/v) Essigsäure

25 % (v/v) Methanol

in ddH₂O

3.5.4 Coomassie-Färbung

Für die Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Hierfür erfolgte die Inkubation der Gele für 10 min bei Raumtemperatur in einer Coomassie-Färbelösung (siehe unten). Danach wurden die Gele kurz mit H₂O gewaschen und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Entfärbelösung entfärbt.

Färbelösung	Entfärbelösung
0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250	25 % Methanol
45 % Methanol	10 % Essigsäure
10 % Essigsäure	65 % H ₂ O
45 % H ₂ O	

3.5.5 Western Blot

Die Western Blot Analyse ist eine immunoanalytische Methode zur Detektion von Proteinen auf einer Trägermembran mit spezifischen Antikörpern (Towbin et al., 1989). Hierbei wurde das *Semidry-Elektroblotting*-Verfahren (Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell, Biorad) verwendet. Die Gele wurden nach der SDS-Page für 10 min in Transferpuffer inkubiert und anschließend mit Transferpuffer getränkten Blotpapieren und einer PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, 0,2 µm Poren von Millipore, Billerica, MA, USA) in einem elektrischen Feld (25 V für 30 min.) auf eben diese Membran übertragen.

Danach erfolgte eine Blockierung der nichtproteinbesetzten Membranbereiche mit Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur. Zum Nachweis spezifischer Proteine auf der Membran erfolgte im Anschluss an die Blockierung eine Inkubation der Membran mit einem Erstantikörper-Blockierungspuffergemisch für 1h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Nach fünf Waschsritten für jeweils 5 min mit 30 mL Waschpuffer bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation der Membran mit einem Zweitantikörper-Blockierungspuffergemisch für 1 h bei Raumtemperatur. Dieser Zweitantikörper ist gekoppelt mit dem Enzym Meerrettichperoxidase und ist in der Lage, den Erstantikörper zu binden. Im Anschluss daran wurde die Membran erneut fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und danach wurde eine ECL (Enhanced Chemiluminiszenz)-Detektion mit Hilfe des Amersham ECL Western Blotting Detection Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Transferpuffer :	Waschpuffer (pH 7,4):
60 % Laufpuffer	10 mM Tris
40 % (v/v) Methanol	0,9 % NaCl
40 % (v/v) Methanol	0,05 % (v/v) Tween-20
0,0375 % (w/v) SDS	

Blockierungspuffer (pH 7,4):

Waschpuffer

5 % (w/v) Magermilchpulver

3.6 Differential-Display-PCR

Die Differential-Display-Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR) ist eine von Liang und Pardee entwickelte Methode, um Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen verschiedenen Zelltypen zu untersuchen (Liang and Pardee, 1992).

Hierfür werden aus den zu untersuchenden Zelltypen gesamt-RNA-Pools isoliert und diese mit Hilfe von Oligo(dT)Primern in einem Reverse- Transkriptionsansatz in cDNA umgeschrieben. Die so erhaltenen cDNA-Pools repräsentieren das zum Zeitpunkt der RNA-Isolation vorhandene Genexpressionsprofil der Zelle und können direkt für die ddPCR eingesetzt werden. Das Prinzip der ddPCR beruht dabei auf einer PCR unter der Verwendung zweier unterschiedlicher Primerklassen, den P-Primern und den T-Primern, die eine gleichzeitige Amplifikation verschiedener cDNA-Spezies in einer PCR-Reaktion ermöglichen. Dabei werden die Sequenzen der P-Oligonukleotide so gewählt, dass sie sich an möglichst viele der im cDNA-Pool vorhandenen DNA-Moleküle anlagern und als Vorwärtsprimer für die Taq-Polymerase fungieren können. Die P-Primer dienen in den ersten PCR-Runden der Zweitstrangsynthese der cDNA und in den weiteren PCR-Zyklen der Vervielfältigung der DNA-Sequenzen.

Hierfür ist der Einsatz der T-Primer (Rückwärtsprimer) notwendig, welche aus zwei verschiedenen Motiven bestehen. Am 3'-Ende dieser T-Primer befindet sich eine aus neun Thymin-Nukleotiden bestehende Oligo(dT)-Sequenz mit zwei zusätzlichen, für jeden T-Primer spezifischen Nukleotiden. Über diese Oligo(dT)-Sequenz erfolgt in den ersten Runden der ddPCR die Anlagerung und Vervielfältigung der cDNA. Am 5'-Ende des Oligonukleotides befindet sich eine spezifische Sequenz, die nicht mit Sequenzen des humanen Genoms hybridisieren kann und dem Primer für eine spezifische Amplifikation der cDNA-Sequenzen in den Vervielfältigungsschritten der ddPCR eine höhere Anlagerungstemperatur zur Verfügung

stellt. Somit können Hintergrundamplifikationen effizient verhindert werden. Mit einem Set, bestehend aus zehn verschiedenen P-Primern und neun verschiedenen T-Primern lässt sich durch Kombination dieser ein Großteil der im cDNA-Pool vorhandenen DNA-Moleküle nachweisen.

Die Primersequenzen für die ddPCR wurden aus dem Delta-Differential-Display-Kit von Clontech übernommen.

Die Analyse der in der ddPCR-gewonnenen DNA-Fragmente geschieht mit Hilfe einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte nach ihrer molekularen Größe. Dabei werden für eine verbesserte Auflösung 30cm lange und 5% starke Polyacrylamid-Gele verwendet. Für die Detektion der PCR-Produkte wurden hierbei anstelle von häufig verwendeten radioaktiv markierten Deoxynukleotiden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Differenziell exprimierte Gene spiegeln sich hierbei in einer unterschiedlichen Quantität der DNA-Banden im Polyacrylamid-Gel wider. Diese Banden stehen dann zur Extraktion, Reamplifikation, Klonierung und anschließender Sequenzierung zur Verfügung.

3.6.1 dd-PCR-Bedingungen

Die ddPCR ist im Gegensatz zu einer Standard-PCR in zwei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt erfolgt bei relativ geringer Anlagerungstemperatur (40 °C für 5 min) die Hybridisierung der P-Primer an die einzelsträngige cDNA und im Anschluß daran die Zweitstrangsynthese bei einer Temperatur von 68 °C für ebenfalls fünf Minuten. In dem darauf folgenden Abschnitt findet bei einer Anlagerungstemperatur von 60 °C und einer Synthesetemperatur von 72 °C die Amplifikation der PCR-Produkte statt.

Um eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde jedes Primerpaar im Triplikat und jede cDNA-Probe in zwei verschiedenen Verdünnungen (1:1 und 1:10) gemessen. Der Reaktionsansatz kann Tabelle 4 entnommen werden. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 4 zeigt den PCR-Ansatz für eine ddPCR mit 1 bzw. 0,1 µl cDNA

Reagenz	Volumen [µl]	Stammkonzentration	Endkonzentration
H ₂ O	12,4 bzw. 13,3		
dNTPs	0,4	10 mM	0,2 mM
MgCl ₂	2	25 mM	2,5 mM
P-Primer	1	10 µM	0,5 µM
T-Primer	1	10 µM	0,5 µM
Taq	0,2	5 U/µl	1 U/20µl
Puffer	2	10 fach	1 fach
cDNA	1 µl bzw. 0,1 µl		

Tabelle 5 zeigt das Temperaturprogramm für eine ddPCR. Die ersten vier Zyklen repräsentieren Abschnitt 1 der Reaktion, der für die Zweitstrangsynthese und erste unspezifische Amplifikation einer Vielzahl verschiedener cDNA-Sequenzen steht. Die nachfolgenden 36 Zyklen dienen ausschließlich der Amplifikation.

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	5 min	
40 °C	5 min	1
72 °C	5 min	
94 °C	1 min	
40 °C	3 min	3
72 °C	5 min	
94 °C	30 sec	
60 °C	45 sec	36
72 °C	2 min	
72 °C	7 min	1

3.6.2 dd-PCR Polyacrylamidgel

Die gewonnenen ddPCR-Proben wurden anschließend mit Hilfe des Hoefer SE660 Gelelektrophoresesystems elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurden 30 cm lange und 24 cm breite TAE-Polyacrylamidgele gegossen, die Proben in DNA-

Probenpuffer aufgenommen und bei 50 Watt für 1,5 h bei Raumtemperatur aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend mit verschiedenen Färbemethoden (siehe Kapitel 3.6.3) gefärbt und die Ergebnisse wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben dokumentiert.

3.6.3 dd-PCR Darstellung von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen mittels verschiedener Färbemethoden

Für die Darstellung von DNA-Banden in Polyacrylamidgelen stehen zahlreiche Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung. Diese binden oder interkalieren in DNA oder RNA Moleküle und können nach Anregung mit kurzwelliger Strahlung Licht einer höheren Wellenlänge emittieren. Dieses wird zur Detektion herangezogen. Die verschiedenen Farbstoffe haben unterschiedliche Bindeeigenschaften und Nachweisgrenzen.

3.6.3.1 Ethidiumbromidfärbung

Für die Ethidiumbromidfärbung wurde das Gel in einer Ethidiumbromidfärbelösung (0,5 µg EtBr/mL) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben dokumentiert.

3.6.3.2 SYBR Green, SYBR Gold und GelRed Färbung

Für die Färbung der PAA-Gele mit SYBR Green, SYBR Gold und GelRed wurden die Farbstoffe nach Herstellerangaben in TBE-Puffer verdünnt und die Gele für 20 min bei Raumtemperatur in dieser Färbelösung inkubiert. Danach konnten die PAA-Gele wie in Kapitel 3.2.6 dokumentiert werden.

3.6.3.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung der PAA-Gele erfolgte mit dem Silver-Staining-Kit der Firma BioRad und wurde nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

3.6.4 dd-PCR Reamplifikations-PCR

Die differentiellen Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem gefärbten PAA-Gel herausgeschnitten und in ein Reagenzgefäß gegeben. Danach wurden 100 µL H₂O hinzugefügt

und die DNA durch Erhitzen (10 min, 100 °C) und kurzes Abzentrifugieren eluiert. Das Eluat konnte dann mit 450 µL EtOH (100 %), 1/10 Vol Natriumacetat (3 M) und 5 µL Glykogen (10 mg/mL) bei -20 °C über Nacht gefällt werden. Das PCR-Produkt wurde bei 13000 g abzentrifugiert (10 min, 4 °C), das Pellet in 85 % EtOH gewaschen und anschließend in 10 µL H₂O resuspendiert. Die Reamplifikation des eluierten PCR-Produkts erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

Die Kontrolle der Reamplifikation wurde durch Auftrennung der Amplifikate in einem 1%igem Agarosegel durchgeführt (siehe 3.2.6).

3.6.5 dd-PCR DNA-Klonierung

Nach erfolgreicher Reamplifikation der DNA-Banden wurde das PCR-Produkt in den bereits vorgeschrittenen pSSTA-Vektor ligiert (siehe Kapitel 3.2.10.3). Es wurde dem Klonierungsprotokoll für PCR-Produkte wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben gefolgt. Anschließend wurden positive Klone sequenziert (siehe Kapitel 3.2.12).

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Differential Display Methodik

Das Differential Display ist eine auf PCR basierende Methode, die zwei oder mehrere RNA-Pools auf das Vorhandensein oder Fehlen unterschiedlicher RNA-Transkripte innerhalb der Pools untersucht. Diese Methode kann beispielsweise Anwendung bei der Suche nach unterschiedlich exprimierten Genen bei normalen und transformierten Zellen finden. Der Vorteil dieser Methodik gegenüber RNA-Chip-Analysen liegt zum einen in einer erhöhten Sensitivität, d.h. auch RNA-Transkripte niedriger Kopienzahlen können dank der verwendeten PCR-Amplifikation detektiert werden und zum anderen im offenen Aufbau des Systems. Dies bedeutet, dass beim Differential Display die Sequenzen der zu untersuchenden Gene im Vergleich zu RNA-Chip-Analysen nicht bekannt sein müssen. Somit können auch unbekannte oder veränderte Gene (z.B. Genprodukte von Translokationsereignissen oder differentielle Spleißvarianten) gefunden werden. Da für das HERV-K codierte Protein Rec eine mRNA-Transportfunktion von einfach oder ungespleißten RNA-Molekülen aus dem Zellkern in das Zytoplasma beschrieben ist (Yang and Wu, 1999), wäre eine transformierende Wirkung des Proteins (neben der durch die Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren) auch über einen Fehltransport von beispielsweise ungespleißten Tumorsuppressorgenen denkbar. Die Detektion solcher Genprodukte ist aber nur mit einem offenen System, wie dem des Differential Display möglich.

4.2 Etablierung der Differential Display-PCR

4.2.1 *Optimierung der Zusammensetzung des Reaktionsansatzes*

Der PCR-Reaktionsansatz besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Komponenten, die je nach Wahl und Konzentration einen großen Einfluss auf die Güte der Amplifikation der DNA-Matrize nehmen können. Die Haupt-Einflussreagenzien sind dabei die Art der verwendeten DNA-abhängigen DNA-Polymerase und die Konzentration zweiwertiger Ionen (hier Mg^{2+} in Form von $MgCl_2$). Die Optimierung der Reaktion erfolgte hier nach Anzahl (möglichst viele) und Güte (hohe Spezifität) der DNA-Amplifikate.

Für die Untersuchung der am besten geeigneten DNA-abhängigen DNA-Polymerase kamen folgende Enzyme zum Einsatz: Eine Taq-Polymerase, ein Pfu/Taq-Polymerasegemisch (Stratagene) und eine Hotstart-Taq-Polymerase (AmpliTaq GOLD). Das Pfu/Taq-Polymerasegemisch, wie auch die Taq-Polymerase ohne Hot-Start-Antikörper zeigten nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Reaktion keine oder zu wenige diffuse Banden im Gelbild. Im Gegensatz dazu konnte für PCR-Reaktionsansätze, die die AmpliTaq-GOLD-Hot-Start-Taq-Polymerase enthielten, eine deutlich gesteigerte Anzahl scharfer Banden im Gelbild (siehe Abbildung 4.2-7) detektiert werden. Für alle nachfolgenden Experimente kam daher die AmpliTaq GOLD-Polymerase zur Anwendung.

Die Konzentration zweiwertiger Ionen im PCR-Reaktionsansatz nimmt direkten Einfluss auf die Qualität der PCR-Reaktion, da Mg^{2+} ein essentieller Cofaktor der DNA-Polymerase ist. Der Konzentrationsbereich von $MgCl_2$ für die Funktionalität der Polymerase liegt zwischen 1,5mM und 4,5mM.

In den Optimierungsexperimenten zeigte sich, dass eine Magnesiumchlorid Konzentration von 2,5 mM im PCR-Ansatz die höchste Zahl an spezifischen, scharfen Banden im Gel zeigte. Geringere Konzentrationen resultierten in einer geringeren Zahl von Amplifikaten - höhere Konzentrationen resultierten in großen Konzentrationsunterschieden zwischen Banden gleicher Ansätze.

4.2.2 Optimierung des Cyclerprogramms

Ebenso wie es bei dem Reaktionsmix der PCR der Fall ist muss eine Anpassung des Temperatur- und Zeitprogramms vom eingesetzten Thermocycler erfolgen um eine optimale PCR zu gewährleisten.

Das Cyclerprogramm (siehe Kapitel 3.6.1) wurde insofern modifiziert, dass eine in der Literatur beschriebene Zyklenzahl von 20 Zyklen nicht ausreicht. Es wurden 36 Amplifikationszyklen als optimal festgestellt. Die Anzahl und Stärke der Banden konnte hierdurch verbessert werden, insbesondere auch die Schärfe der Banden konnte konstant und somit spezifisch gehalten werden. Die Temperatur der vier nicht stringenten Zyklen zu Beginn der PCR wurde variiert, was in einer unterschiedlichen Bandenanzahl resultierte. Eine Erhöhung der Temperatur resultierte in einer geringeren Bandenanzahl und wurde nicht für die weiteren Experimente in Betracht gezogen.

Die Dauer der ersten Zyklen ist ebenso entscheidend für die resultierende Bandenanzahl. Nach einer Verkürzung konnten keine Banden mehr detektiert werden. Eine längere Dauer beeinflusste das Ergebnis nicht und wurde nicht weiterverwendet.

4.2.3 Vergleich der Methoden zur Detektion der Amplifikate

Damit auch schwache vorhandene DNA-Banden im Gel detektiert werden können, war es nötig, eine adäquate und funktionelle Färbemethode für die DNA in den Polyacrylamidgelen zu ermitteln.

Dafür wurde ein DNA-Marker bekannter Konzentration in dualen Verdünnungen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Gele anschließend mit Hilfe der in Kapitel 3.6.3 beschriebenen Färbemethoden behandelt

Beim Vergleich der unterschiedlichen Färbemethoden der Polyacrylamidgele wurde SYBR Gold als sensitive Methode ermittelt (Abbildung 4.1-1). Eine Silberfärbung konnte die Nachweisgrenze von SYBR Gold leicht unterbieten. Die Durchführung der Silberfärbung stellte sich jedoch als deutlich arbeits- und zeitaufwendiger dar. Die mehrmaligen, schnell durchzuführenden Waschschrte der Silberfärbung sind mit den äußerst fragilen Polyacrylamidgelen nur schwer durchführbar. Die anderen verglichenen Fluoreszenzfarbstoffe erreichten nicht die Sensitivität von SYBR Gold.

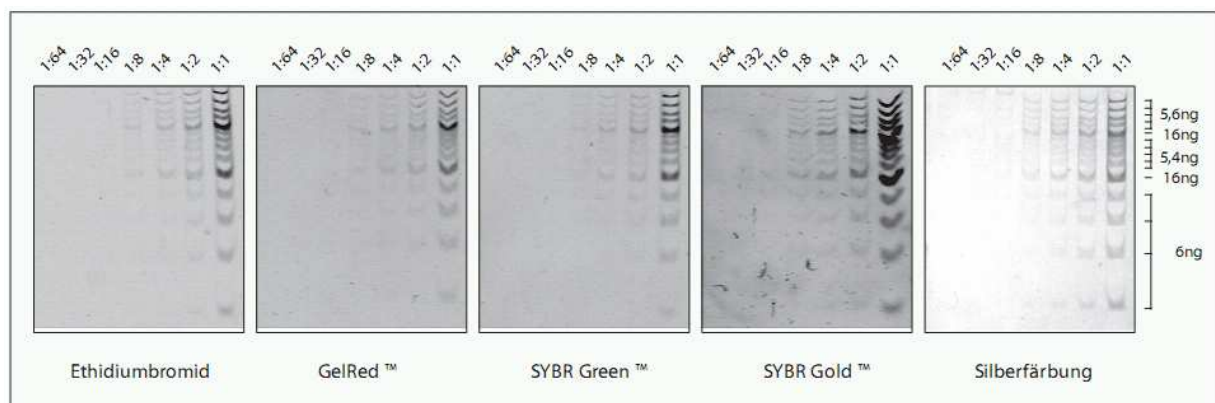


Abbildung 4.2-4 Vergleich der vier Färbemethoden. Vergleichend wurden äquivalente Mengen eines quantitativen Markers aufgetragen. Die Verdünnungsstufe ist über den jeweiligen Taschen bemerkt. Die absolute Masse der jeweiligen Banden der 1:1 Verdünnung ist rechts dargestellt.

4.2.4 Optimierung der Polyacrylamidgelelektrophorese

Da bei der ddPCR 40-60 unterschiedlich große Amplifikate pro PCR-Ansatz entstehen können, ist eine optimale Auftrennung der Proben im Polyacrylamidgel nötig. Eine optimale Auftrennung der Proben im zu erwartenden Größenbereich der Amplifikate hilft zum einen, definierte DNA-Banden zu detektieren und zum anderen, im Falle des Vorhandenseins differenziell exprimierter Genbanden, diese ohne Kontamination mit benachbarten Amplifikaten extrahieren zu können.

Daher sollten denaturierende und nichtdenaturierende Elektrophoresebedingungen auf ihr unterschiedliches Auftrennverhalten hin untersucht werden. Die Denaturierung der Proben

erfolgte vor dem Gellauf durch Erhitzen und/oder Zugabe von Formamid. Die Ergebnisse dieser Versuche können der Abbildung 4.2-5 entnommen werden. Da bei einer ddPCR Amplifikate in einem Größenbereich von 50 bis 2000bp entstehen können, sollte dieser Bereich eine gleichmäßige Auftrennung geben. Die konnte für den nicht-denaturierenden Probenpuffer festgestellt werden. Denaturierte Proben trennen demgegenüber DNA-Moleküle im Bereich von 100 bis 500bp optimal auf.

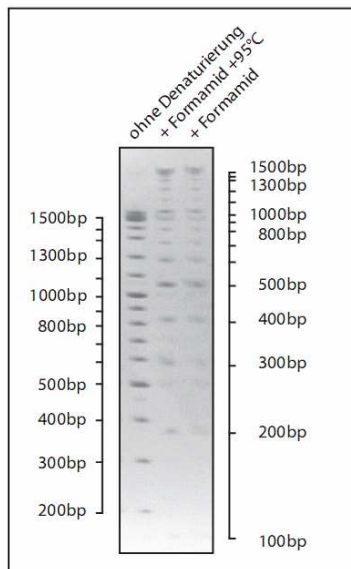


Abbildung 4.2-5 Test verschiedener Probenpuffer. Es sind der Probenpuffer ohne Denaturierung, mit 5 % Formamid und zehnminütiger Hitzedenaturierung dargestellt. Als DNA-Probe diente der DNA-Marker O'GENERULER™ 100bp DNA Ladder Plus der Firma Fermentas.

4.2.5 Differential Display PCR unter optimierten Bedingungen

Die oben beschriebenen optimierten Bedingungen fanden in einem ddPCR-Screening mit zwei verschiedenen gesamt-RNA-Pools und der Kombination aus drei P- und neun T-Primern Anwendung

Das Ergebnis dieses Testlaufs ist in Abbildung 4.2-6 dargestellt. Es konnte eine Vielzahl an DNA-Amplifikaten unterschiedlicher Größe erzeugt werden. Ungefähr 90 Prozent der Banden zeigen keine Unterschiede zwischen den beiden gesamt-RNA-Pools.

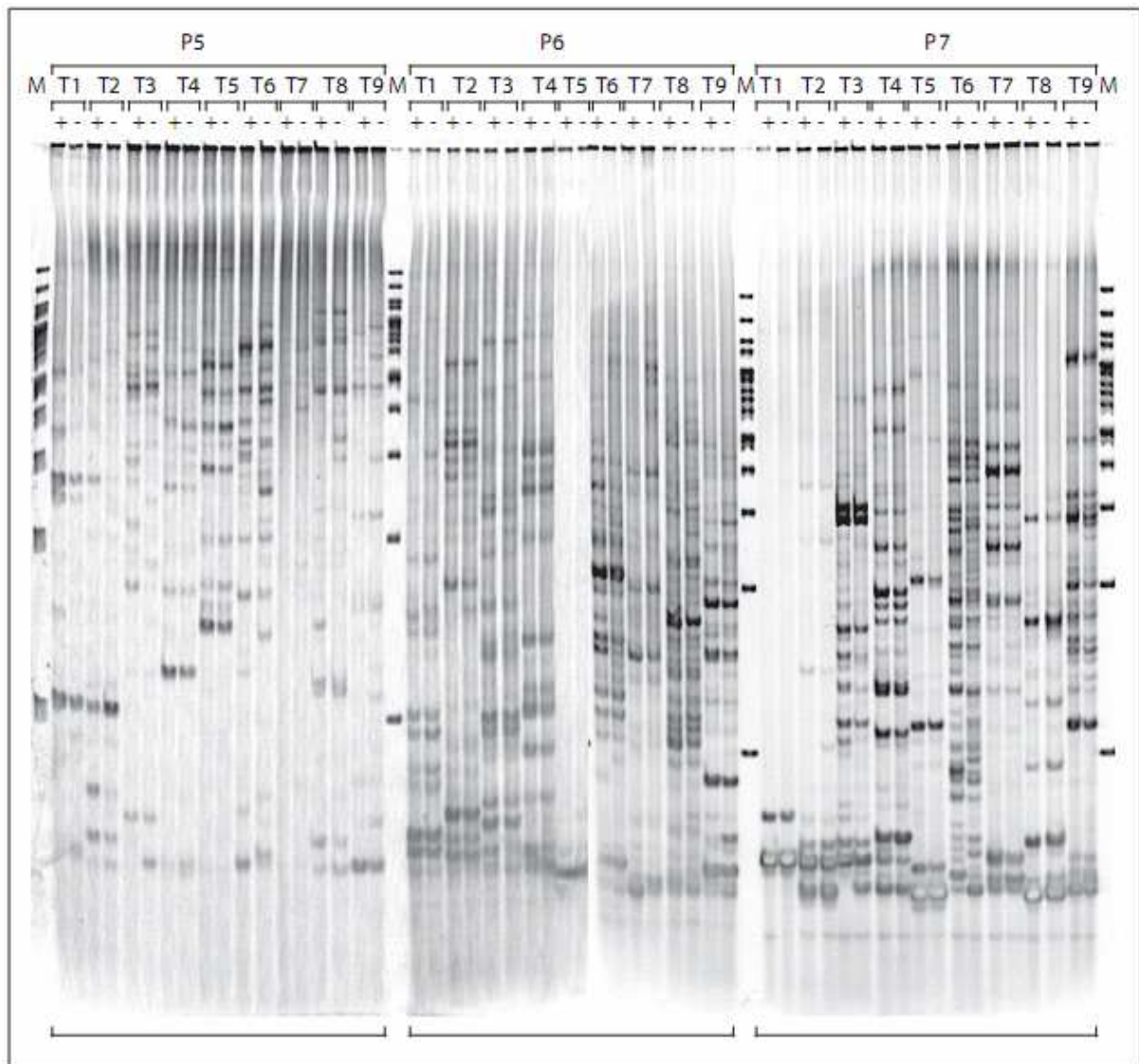


Abbildung 4.2-6 Übersicht eines Differential Display Testlaufs mit drei P-Primern (P5-7) und den verfügbaren T-Primern (T1-T9). Spuren mit der Überschrift M wurden mit DNA-Markern beladen.

Um die Reproduzierbarkeit der verschiedenen DNA-Banden, bzw. die Anfälligkeit des Systems auf artifizielle Amplifikationen zu überprüfen, wurde zusätzlich ein ddPCR-Ansatz in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Abbildung 4.2-7 zeigt die Triplikatmessung für zwei unterschiedliche Konzentrationen der Ausgangs-cDNA mit identischer Primerkombination. Wie man der Abbildung entnehmen kann, zeigen ca. 30 Prozent der hier amplifizierten cDNA-Spezies bereits innerhalb des Triplikats Unterschiede hinsichtlich ihrer Amplifikationsstärke. Schwankungen dieser Art können auch beim Vergleich der gleichen RNA-Pools in unterschiedlichen Konzentrationen detektiert werden. Dennoch ist das Bandenmuster zu ca. 70 Prozent sowohl für die zwei unterschiedlichen RNA-Pools als auch für die zwei unterschiedlichen Matritzen-Konzentrationen identisch.

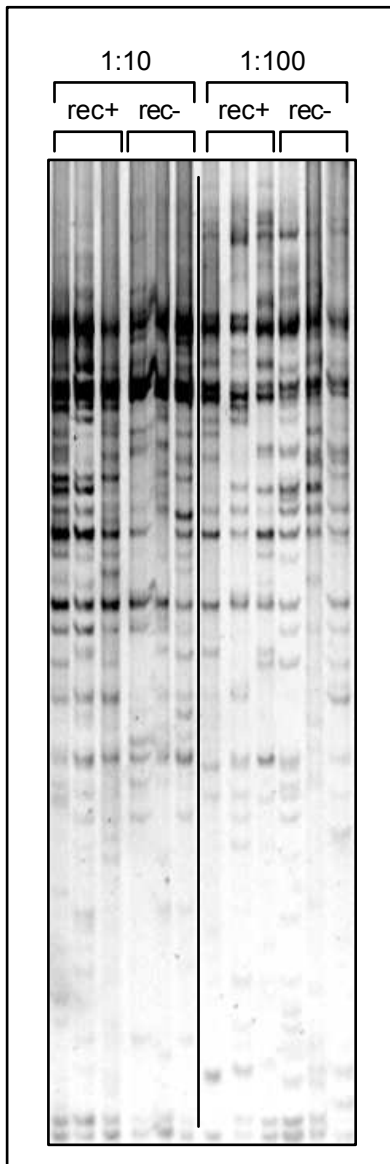


Abbildung 4.2-7 Darstellung eines Differential Display Ansatzes, gemessen im Triplikat und in zwei unterschiedlichen Konzentrationen

4.3 Codonoptimierung und Klonierung von *np9*

Es ist bekannt, dass neben Rec auch die HERV-K-Spleißvariante Np9 in der Lage ist, mit PLZF zu interagieren. Auch diese Interaktion geht mit einer Inaktivierung des Promyeloischen Zinkfingers einher. Dies begründet weitere Analysen der Auswirkungen der Np9-Expression auf das Transkriptom von humanen Zellen. In Vorbereitung für diese Versuche sollte das Gen *np9* codonoptimiert, in einen humanen Expressionsvektor kloniert und dessen Funktionalität untersucht werden.

4.3.1 Codonoptimierung

4.3.1.1 Ermittlung der im Genom vorhandenen Sequenzen

Um die Rohdaten bereits bekannter Sequenzen zu erhalten, ist es am ergiebigsten, in online zur Verfügung stehender Datenbanken zu recherchieren.

Nach Datenbankanalysen wurden die vier Np9-kodierenden Sequenzen ermittelt (Abbildung 4.3-8). Die Anordnung zeigt die sequenziellen Differenzen der auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierten *np9*-Sequenzen. Die proteincodierenden Sequenzen zeigen eine sehr hohe Homologie zueinander und unterscheiden sich nur in wenigen Nukleotiden.

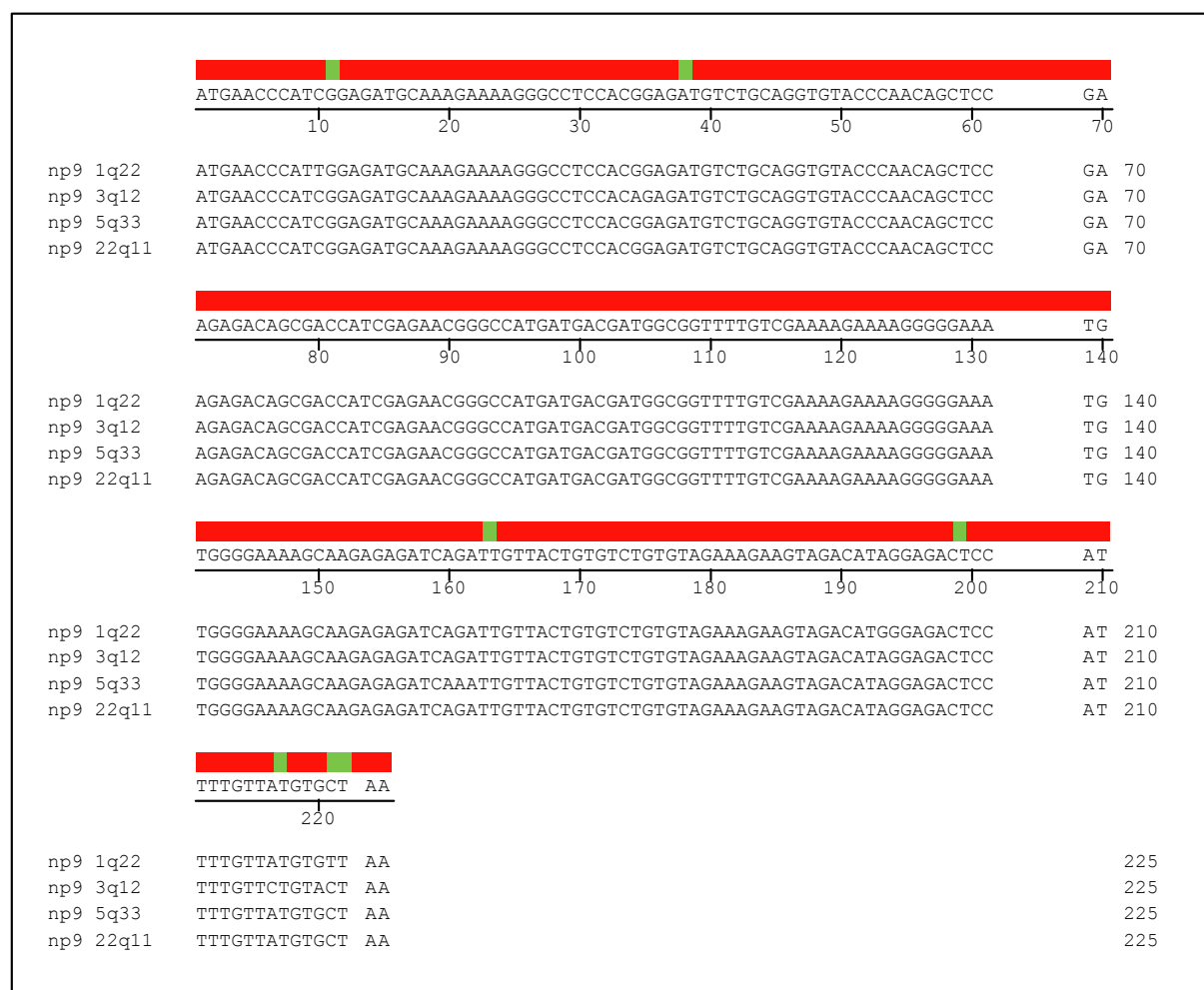


Abbildung 4.3-8 Sequenzvergleich von *np9*-Sequenzen

Ein Vergleich der von Armbrüster et al. untersuchten *np9*-Sequenz mit den in der Datenbankanalyse ermittelten *np9*-Sequenzen zeigt, dass die bereits identifizierten funktionellen Bereiche für die Bindung an PLZF (PLZF Binding Site), die Kernlokalisierungssignale und CKII

(Casein Kinase II) nicht von Sequenzunterschieden betroffen sind (Abbildung 4.3-9). Nur das 1q22 *np9* weist einen Aminosäureaustausch im NLSIII-Bereich auf.

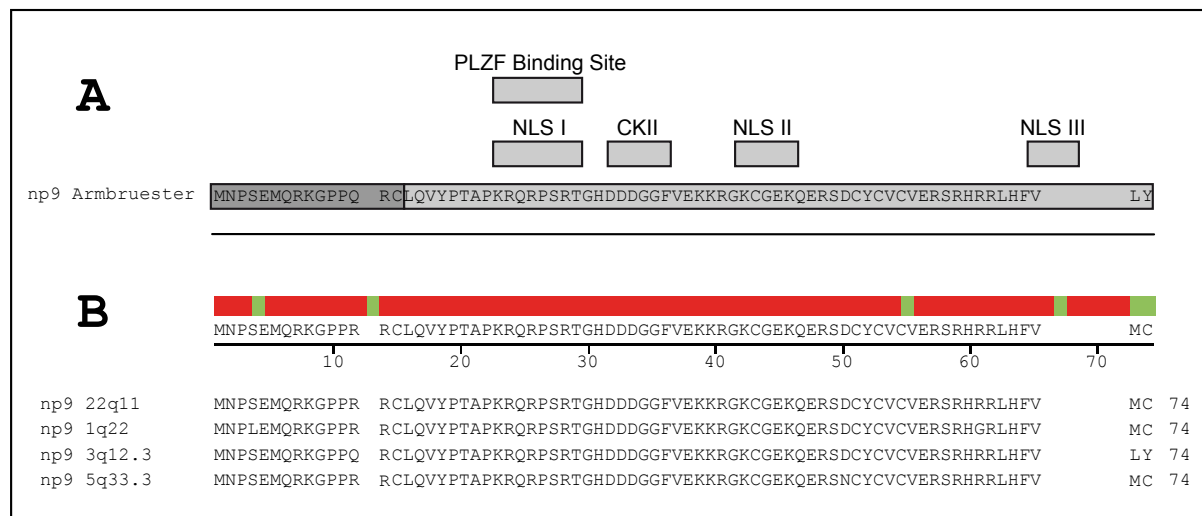


Abbildung 4.3-9 A: Von Armbrüster et al. beschriebene Np9-Aminosäuresequenz mit Kernlokalisierungssignalen I-III (NLS I-III) CKII und PLZF Bindedomäne (Armbrüster et al., 2004). B: Ermittelte Np9-Sequenzen mit Chromosomenlokalisierung (22q11; 1q22; 3q12.3; 5q33.3) und Aminosäuresequenzalignment.

Da jedoch auch einzelne Aminosäureaustausche die Funktion von Proteinen beeinflussen können (Mangenev et al., 2007), sollten alle vier Varianten des Gens synthetisiert und kloniert werden.

4.3.1.2 Herstellung und Charakterisierung der künstlichen *np9*-Gene

4.3.1.2.1 Computergestützte Ermittlung der codonoptimierten Sequenzen

Es wurden die in Abbildung 4.3-9 aufgeführten Aminosäuresequenzen zur Optimierung herangezogen. Die Codonoptimierung wurde mithilfe der Codonusagetabelle von (Puigbo et al., 2008, Puigbo et al., 2007), die in das Programm BioEdit eingebunden wurde, durchgeführt. Das Programm tauscht dabei die weniger häufig genutzten Codon-Spezies mit den entsprechend häufiger genutzten aus und generiert so eine für die Translationseffizienz optimierte Sequenz.

Die neu erstellte Sequenz wurde mit dem unabhängigen Onlineservice „graphical codon usage analyser“ (<http://gcu.schoedl.de>) überprüft. Es wurden die ursprünglichen Sequenzen und die optimierten Sequenzen in Abbildung 4.3-10 gegenübergestellt. Die hier prozentual angegebene Nutzung der jeweiligen Codons zeigt, dass bei ca. 90% nach Optimierung eine 100% optimale Codonverwendung erfolgt. Diese Ergebnisse bestätigten die erfolgreiche Codonoptimierung.

Des Weiteren wurde die Kozak-Sequenz (Kozak, 1987) als Erkennungs- und Startpunkt der Ribosomen für die Translation vor die jeweiligen Konstrukte gesetzt. Anschließend wurden die

Sequenzen durch das Einfügen von flankierenden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen AgeI und NheI vervollständigt (Hilfssequenzen für die Klonierung).

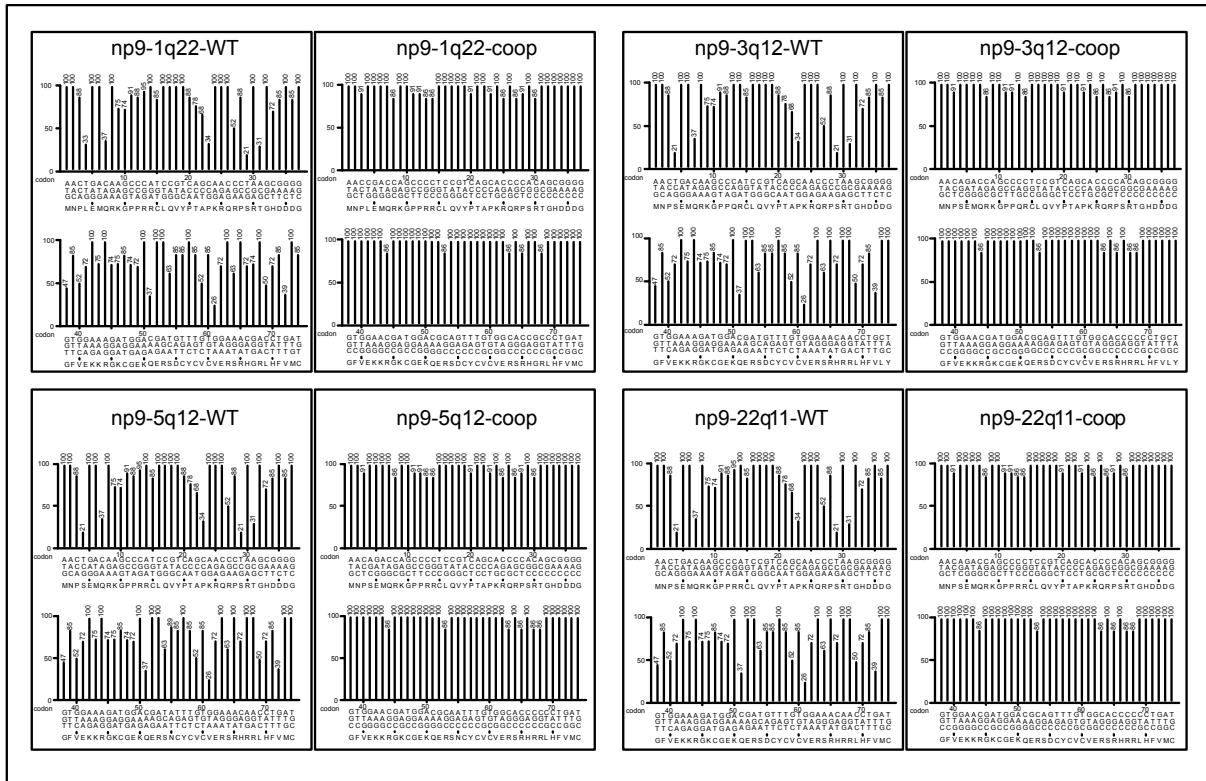


Abbildung 4.3-10 Vergleich der codonoptimierten (-coop) und Wildtypsequenzen (-WT). Ermittelt mit Hilfe des „graphical codon usage analyser“ (<http://gcu.schoedl.de>). Jeder Balken repräsentiert ein Codon, das unter der x-Achse aufgeführt ist unter dem Codon ist der Einbuchstabencode der codierten Aminosäure aufgeführt. Die y-Achse gibt die jeweilige humane Codonverwendung prozentual wieder.

4.3.1.2.2 Gensynthese

Die ermittelten vollständigen Sequenzen der vier Konstrukte wurden für die Gensynthese vorbereitet. Mit Hilfe des Programms BioEdit wurden codogener- und komplementär-Strang der Zielsequenz in jeweils fünf Oligonukleotide aufgeteilt. Sie entsprachen einer Länge von ungefähr 50 Nukleotiden. Die Synthese der Oligonukleotide wurde von der Firma Sigma-Aldrich realisiert. Nachdem die Konstrukte zusammengesetzt und amplifiziert wurden, erfolgte die Überprüfung der Gensynthese im Agarosegel. Für alle vier Konstrukte konnten auf der erwarteten Höhe von 256 bp eine scharfe Bande detektiert werden. Dieses Ergebnis lässt auf eine erfolgreiche Synthese der Konstrukte schließen.

4.3.1.2.3 Klonierung der hergestellten *np9*-Konstrukte

Nach der erfolgreichen Synthese wurde versucht, die Konstrukte in den pcDNA4A-Vektor von Invitrogen zu klonieren. Dies gelang bei drei Konstrukten (1q22, 5q33 und 22q11). Das 3q12-Konstrukt konnte trotz intensiver Bemühungen aus bisher ungeklärten Gründen nicht kloniert werden.

Des Weiteren wurde, um Vergleiche zwischen codonoptimierten und nativen Konstrukten anstellen zu können, eine in HEK-293-Zellen natürlich vorkommende *np9*-Sequenz mit der Lokalisation 3q12.3 kloniert und als Wildtyp (WT) bezeichnet.

Um Mutationen oder Fehler auszuschließen, erfolgte die Sequenzierung der fertigen Konstrukte. Es konnten die korrekten Sequenzen der klonierten Konstrukte verifiziert werden.

Die Vervielfältigung der hergestellten Konstrukte erfolgte nach Klonierung in chemokometenten *E.coli* top10-Zellen. Von den Klonen wurden Glycerinkulturen angelegt. Die Aufreinigung der Plasmide wurde mit Hilfe des Miniprep Kits von Quiagen durchgeführt.

4.3.1.2.4 Kontrolle der Funktionalität der Konstrukte

Um die Konstrukte auf Funktionalität zu überprüfen, erfolgte die Transfektion in HEK-293-Zellen. Die erfolgreiche Transfektion wurde anhand eines im Parallelansatz mitgeführten GFP-Vektors fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Obwohl eine erfolgreiche Transfektion nachgewiesen werden konnte, gelang es nicht, eine Proteinbildung im Western Blot nachzuweisen. Als Grund hierfür wurde der His-Tag vermutet. Folglich wurde der His-Tag durch einen v5-Tag ersetzt. Allerdings gelang auch mit diesen Konstrukten kein Np9-Proteinnachweis im Western Blot. Eine schematische Darstellung der klonierten Konstrukte kann dem oberen Teil der Abbildung 4.3-11 entnommen werden: A stellt das *np9*-Konstrukt mit His-Tag und B das *np9*-Konstrukt mit v5-Tag dar.

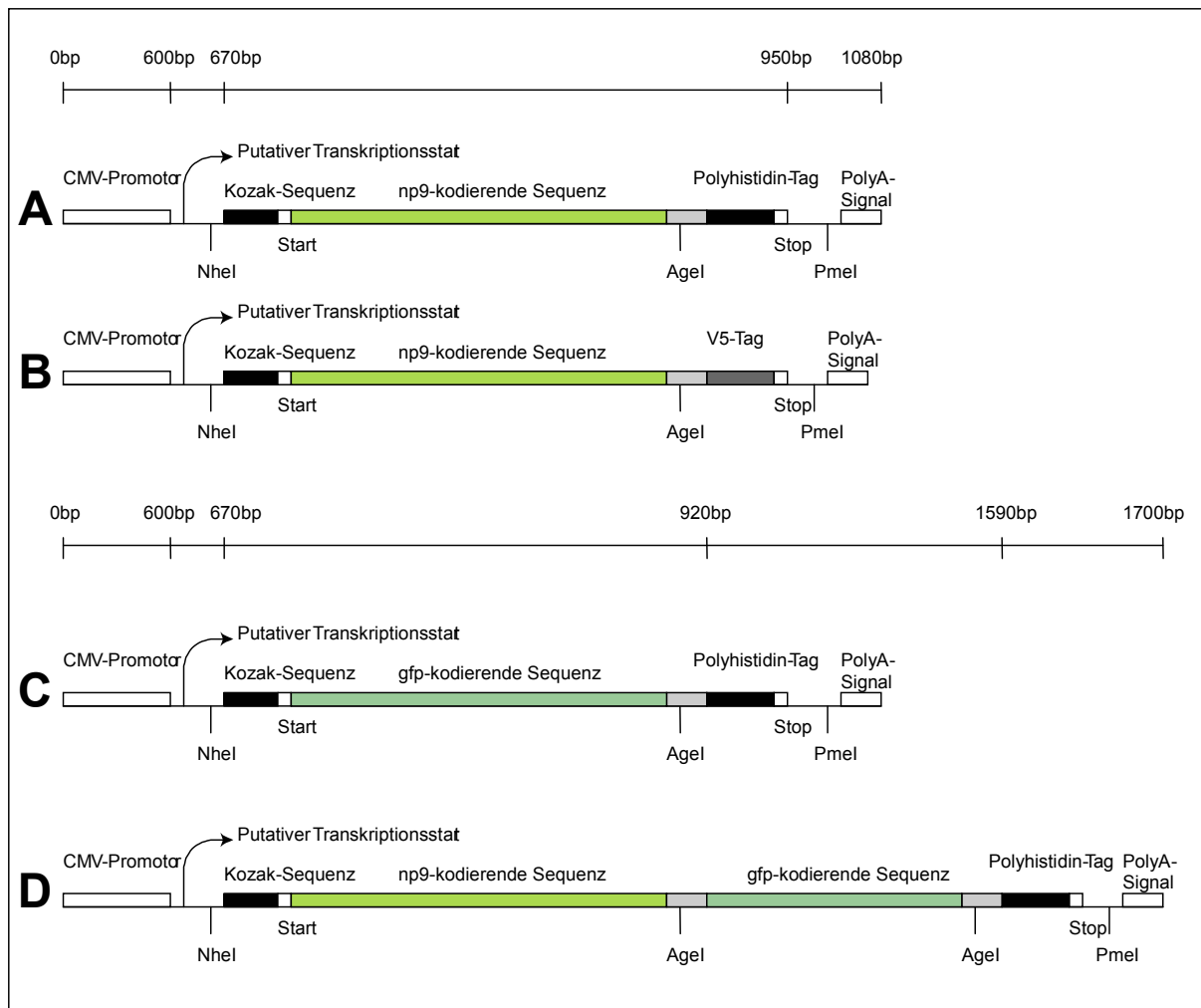


Abbildung 4.3-11 Die unterschiedlich modifizierten *np9*-Genkonstrukte. A: Polyhistidin-Tag enthaltendes Konstrukt. B: v5-Tag enthaltendes Konstrukt. C: *gfp*-Kontrollkonstrukt mit Polyhistidin-Tag. D: *np9*-Fusionskonstrukt, das die *gfp*-kodierende Sequenz und den Polyhistidin-Tag enthält

4.3.1.2.5 Kontrolle des Expressionssystems

Der nicht erbrachte Proteinnachweis trotz korrekter Sequenzen legte die Vermutung nahe, dass es sich entweder um einen Fehler des verwendeten Expressionssystems oder einen sehr schnellen Abbau des Proteins handelt. Die gleichzeitige Überprüfung des Expressionssystems und die Funktionskontrolle der Konstrukte sowie eine Anhebung der Detektionsgrenze sollte durch die Herstellung eines Np9-GFP-Fusionsproteins verwirklicht werden. Hierzu wurde den hergestellten Konstrukten durch Klonierung eine GFP-Sequenz angehängt (siehe Abbildung 4.3-11 D). Diese Np9-GFP-Fusionsproteine konnten erfolgreich transfiziert werden. Auf eine separate GFP-Transfektionskontrolle konnte nunmehr verzichtet werden, da die fluoreszenzmikroskopische Kontrolle direkt mit den Fusionsproteinen erfolgt. Da es sich um Fusionsproteine handelt und nicht um eine Koftransfektion mit einem separaten GFP-Plasmid,

kann weiterhin mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass nicht nur die Synthese des GFPs, sondern auch das vor dem GFP befindliche Np9 translatiert wird. Für eine vergleichende Analyse der zellulären Lokalisation und Stabilität des Fusionsproteins wurde zusätzlich das alleinige GFP-Gen mit vorgeschalteter Kozak-Sequenz in den Vektor pcDNA4A kloniert.

Die Transfektion erfolgte laut Herstellerprotokoll (siehe Kapitel 3.1.4).

Die Herstellung der Präparate zur Fluoreszenzmikroskopie wurden wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben hergestellt.

Die Abbildung 4.3-12 zeigt die Np9-GFP-transfizierten Zellen. Es ist deutlich eine Ansammlung der Np9-GFP-Produkte in den Nukleoli der Zellen erkennbar. Die DAPI gefärbten Zellkerne machen eine eindeutige Lokalisation in der Zelle möglich.

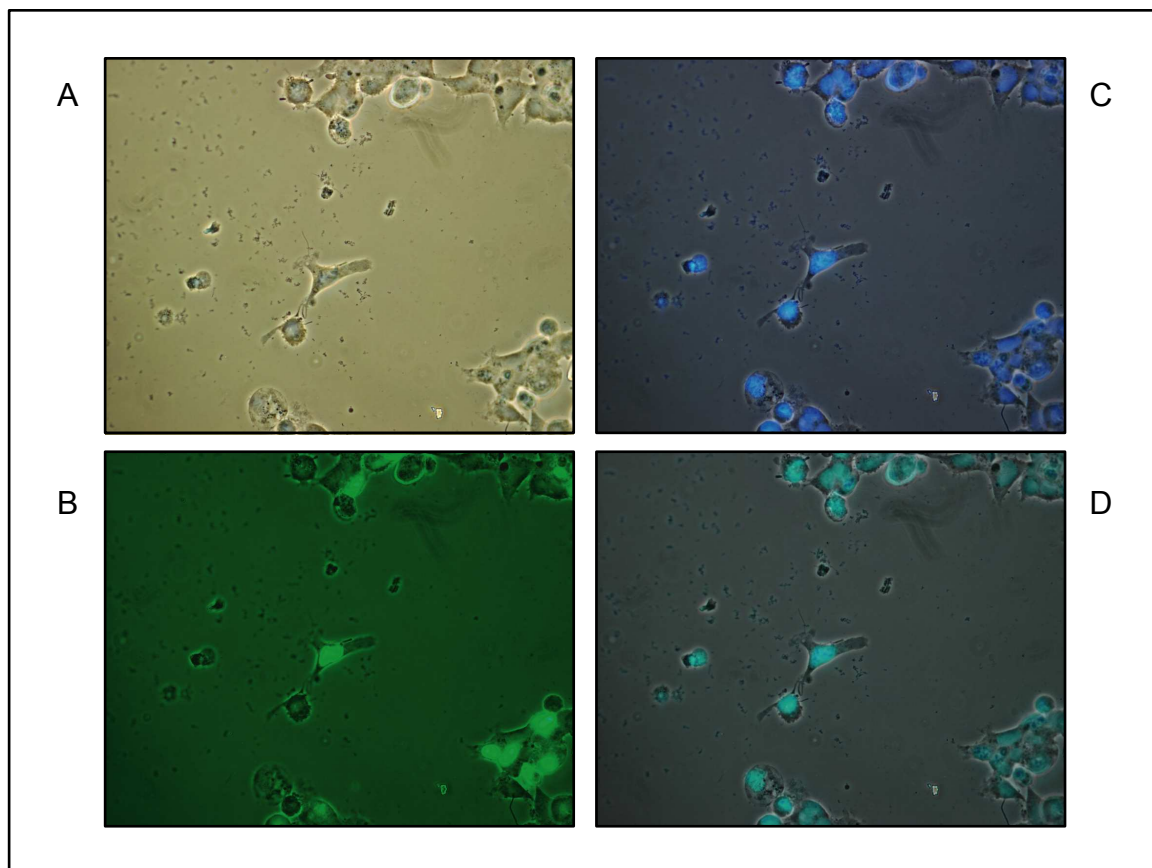


Abbildung 4.3-12 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer *np9*-transfizierten Zelle. A zeigt eine durchlicht Mikroskopische Aufnahme B zeigt eine Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des FITC-Kanals zur GFP-Darstellung C zeigt den Hellfeld DAPI-Kanal zur Darstellung der DAPI-Kernfärbung D zeigt die Kanäle zusammengesetzt

4.3.1.2.6 Vergleich der hergestellten wildtyp- und codonoptimierten-Konstrukte

Um einen Vergleich zwischen den codonoptimierten und dem Wildtyp entsprechenden Konstrukten im Hinblick auf die Expression anstellen zu können, wurde ein vergleichender Western Blot von beiden Konstrukten hergestellt. Als Kontrollen wurden der Leervektor und das GFP-Konstrukt mitgeführt. Die Herstellung der Proteine verlief in Parallelansätzen nach dem Transfektionsprotokoll (siehe Kapitel 3.1.4), anschließender RIPA-Lyse (siehe Kapitel 3.5.1), Auftrennung der Proben im SDS-PAGE-Gel (siehe Kapitel 3.5.3) und Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot (siehe Kapitel 3.5.5).

Dabei zeigte sich, dass die Detektion mit Hilfe der Anti-GFP-Antikörper stärker war als die mit Hilfe der Penta-His-Antikörper (Abbildung 4.3-13). Die GFP-His-Proteine konnten vom Penta-His-Antikörper nicht erkannt werden. Die erfolgte Zweitdetektion mit GFP-Antikörpern, nachdem der Blot gestrippt wurde, zeigte eine Detektion der gebildeten GFP-Proteine.

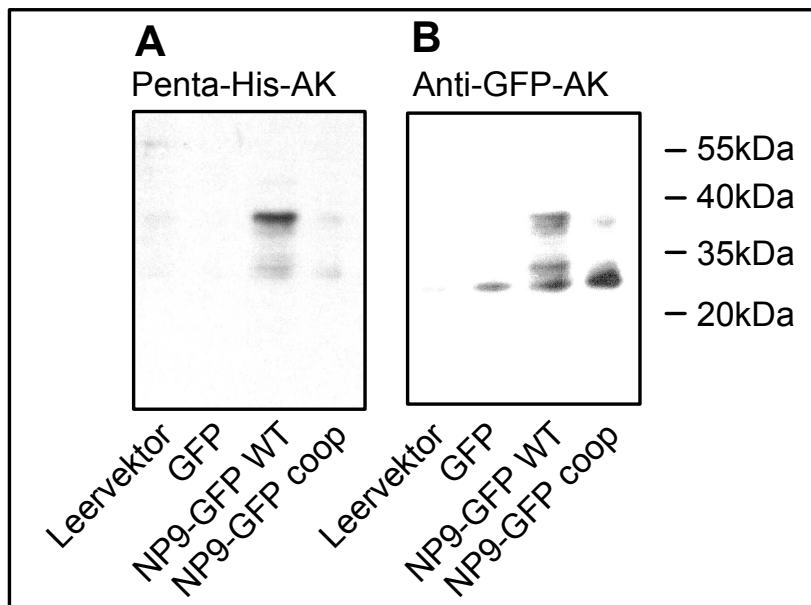


Abbildung 4.3-13 Codonoptimierte- und Wildtyp-Konstrukte im vergleichenden Western Blot: A: Entwicklung mit Penta-His-Antikörpern. B: Zweitentwicklung nach erfolgtem stripping mit Anti-GFP-Antikörpern. Rechts ist der Größenstandard aufgetragen.

4.3.1.2.7 Zeitabhängige Expression bzw. Abbau von Np9

Zur Ermittlung eines zeitlichen Expressionsmaximums beziehungsweise eines Abbauzeitpunktes des Np9-Proteins wurde ein zeitabhängiges Transfektionsexperiment durchgeführt. Hierzu wurden in parallelen Mehrfachansätzen ein *np9*-GFP-Konstrukt gemeinsam mit dem GFP- und einem Np9-Konstrukt transfiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Proteine durch RIPA-Lyse isoliert (siehe Kapitel 3.5.1). Die erhaltenen Proben wurden mittels SDS-PAGE-Gel (siehe Kapitel 3.5.3) aufgetrennt und durch das semidry-Western Blot-Verfahren auf eine PVDF

Membran übertragen (siehe Kapitel 3.5.5). Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit Penta-His-Antikörpern.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4.3-14 dargestellt. Die Zahlenwerte repräsentieren die Zeitpunkte der Probennahme in Stunden nach erfolgter Transfektion. In den nur mit GFP transfizierten Zellen ist GFP nach zwölf Stunden nachweisbar. In den zu mehreren Zeitpunkten analysierten *np9-gfp*-transfizierten Zellen ist bereits nach neun Stunden Np9-GFP im Western Blot sichtbar. Ungefähr zwölf Stunden nach erfolgter Transfektion wird nur noch GFP nachgewiesen. Dieses GFP war vorher noch nicht vorhanden. Es ist eine Verschiebung der nachgewiesenen Proteinbanden von 9 kDa, was der Größe von Np9 entspricht, zu erkennen.

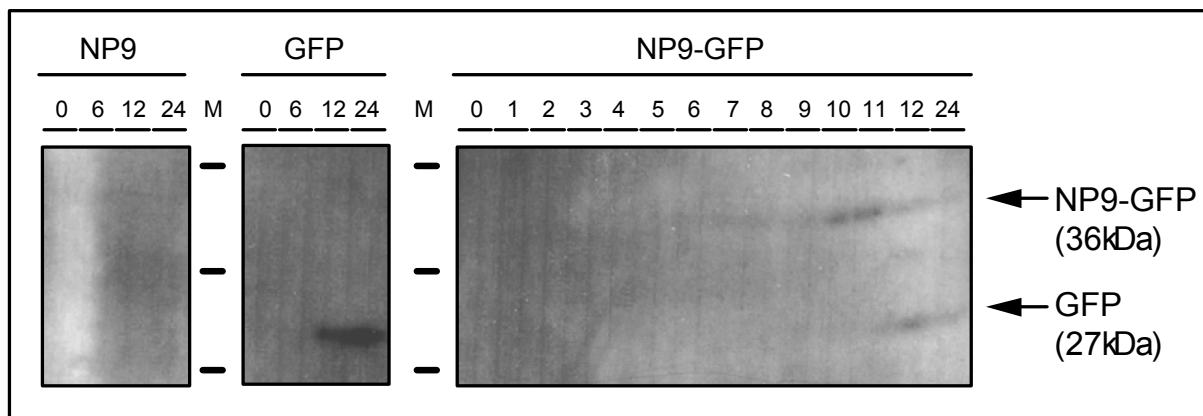


Abbildung 4.3-14 Zeitabhängige Expression von HERV-K Np9.GFP

4.4 Genchip-Analyse der veränderten Genexpression in *rec*-transfizierten Zellen

Für die Untersuchung der Auswirkung einer Rec-Expression auf das Transkriptom humaner Zellen sollten Rec-negative HEK-293 mit einem *rec*-Expressionsplasmid transient transfiziert und somit eine erhöhte Expression des Gens simuliert werden. Der experimentelle Aufbau sah vor, die Zellen nach 72 stündiger transienter Transfektion zu ernten und die gesamte RNA für die RNA-Chip-Hybridisierung zu isolieren. Als Negativkontrolle diente das gleiche Expressionsplasmid ohne die Rec-codierende Sequenz. Als Kontrolle für die erfolgreiche Transfektion sollten Proteinproben der erzeugten Zellkulturen (pcDNA3*rec+* und pcDNAleer) gewonnen und mittels Western Blot mit anschließender Immunfärbung auf Rec-Expression überprüft werden. Des Weiteren sah das Experiment vor, die beiden RNA-Proben mittels BioAnalyzer auf ihre Integrität und damit ihre Verwendbarkeit für die RNA-Chip-Hybridisierung zu untersuchen.

4.4.1 Nachweis der Rec-Expression

Da für einen eindeutigen Vergleich der zwei Zellpopulationen (Rec+ und Rec-) eine hohe Transfektionseffizienz essentiell ist, wurde im ersten Schritt das Einbringen der plasmidären DNA in HEK-293-Zellen optimiert. Dafür wurden unterschiedliche Mengen an DNA und Lipofectamin 2000 gegeneinander ausverdünnt und transfiziert. Hierbei diente ein GFP-Expressionsplasmid (pmax), als Reporter für eine erfolgreiche Transfektion - die Transfektionseffizienz kann direkt durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelt werden. Wie man aus Abbildung 4.4-15 entnehmen kann, lag die höchste Effizienz der Transfektion bei 4 μ L Lipofectamin 2000 je 2 cm^2 kombiniert mit 0,8 μ g DNA.

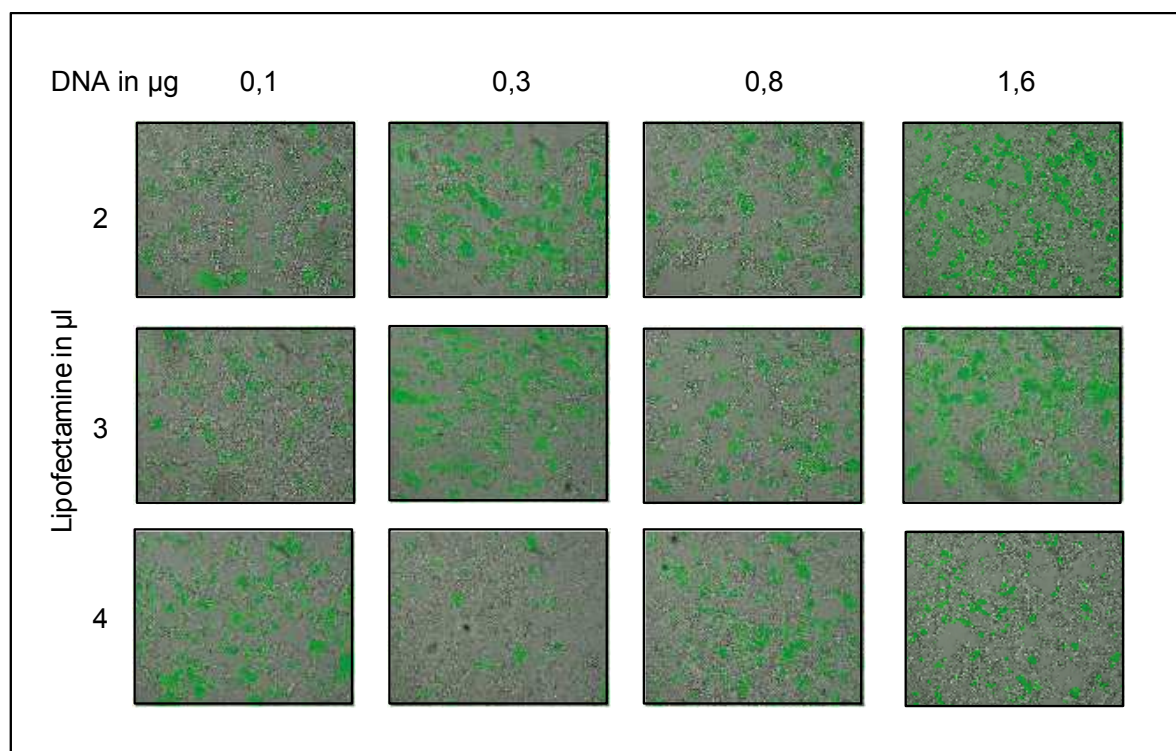


Abbildung 4.4-15 Bestimmung der Transfektionseffizienz für HEK-293-Zellen

Da der Expressionsvektor pcDNA3 neben dem zu exprimierenden Gen noch ein Genitizinresistenzgen trägt, lag es nahe, das Verhältnis transfizierter Zellen zu nichttransfizierter Zellen mit Hilfe einer Genitizinbehandlung zu erhöhen. In Zellen, die nach zweiwöchiger Genitizinbehandlung geerntet wurden, konnte allerdings keine Rec-Expression mehr nachgewiesen werden.

4.4.2 Kontrolle der Proteinexpression

Der zur Rec-Überexpression genutzte Vektor pcDNA3-coop-*rec* wurde von einer kollaborierenden Arbeitsgruppe konstruiert und unserer Arbeitsgruppe in Form einer Glycerinkultur zur Verfügung gestellt. Als *rec*-negativer Kontrollvektor wurde pcDNA3A als Leervektor eingesetzt. Die Produktion der Ausgangsvektoren erfolgte durch eine MaxiPrep nach Angaben des Herstellers (siehe Kapitel 3.2.9).

Um die Funktionalität des Vektors pcDNA3-coop-*rec* zu überprüfen, wurden Transfektionsexperimente mit unterschiedlichen Vektor-DNA-Konzentrationen (0 µg, 0,1 µg, 0,3 µg, 0,8 µg, 1,2 µg und 1,6 µg) in HEK-293-Zellen durchgeführt. Nach 72-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Proteine mittels RIPA-Lyse (siehe 3.5.1) extrahiert. Die gewonnenen Proteinproben konnten anschließend mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.5.3) aufgetrennt und durch einen semi-dry-Western Blot auf eine PVDF-Membran gebracht werden (siehe Kapitel 3.5.5). Der Nachweis von gebildeten Rec-Proteinen erfolgte durch das am C-Terminus des Rec-Proteins angefügte v5-Epitop und spezifischen monoklonalen v5-Tag-Antikörpern und ECL-Detektion.

Die Abbildung 4.4-16 zeigt in den transfizierten Zellen spezifische Banden auf der Höhe des Rec-Proteins. Es sind eine quantitative Abstufung und keine unspezifischen Antikörperbindungen zu erkennen. Untransfizierte HEK-293-Zellen zeigen keine Proteinbande.

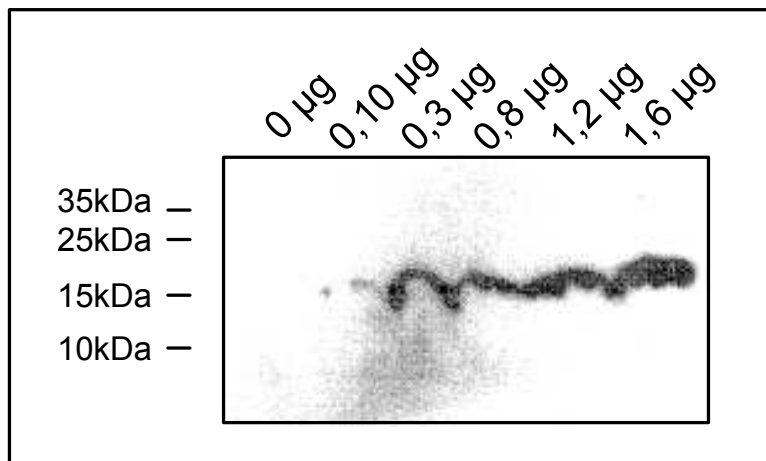


Abbildung 4.4-16 Abhängigkeit der Rec-Expression von der bei der Transfektion eingesetzten DNA-Menge.

4.4.3 Isolierung und Analyse der gesamt-RNA Proben für die Chipanalyse

Für die Herstellung der Gesamt-RNA-Proben für die RNA-Chip-Untersuchung wurden 10cm-Zellkulturschalen mit pcDNA3-coop-*rec* und pcDNA3-Leervektor wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben transfiziert. Dabei wurden identische Ansätze für den *rec*-positiven-, *rec*-negativen- und GFP-Vektor gewählt. Die GFP-transfizierten Zellen dienten der Transfektionskontrolle. Für die Verifizierung der Rec-Überexpression dienten Proteinproben der Zellpopulationen pcDNA3-coop-*rec* und pcDNA3-Leervektor. Die Lyse, Gelauf trennung, das Blotten und die Entwicklung des Blots verliefen analog der Vorversuche (siehe Kapitel 4.3.1.2.6).

Die pcDNA3-coop-*rec* transfizierten Zellen zeigten Rec-Proteinbanden, die bei pcDNA3-Leervektor transfizierten Zellen fehlen (Abbildung 4.4-17).

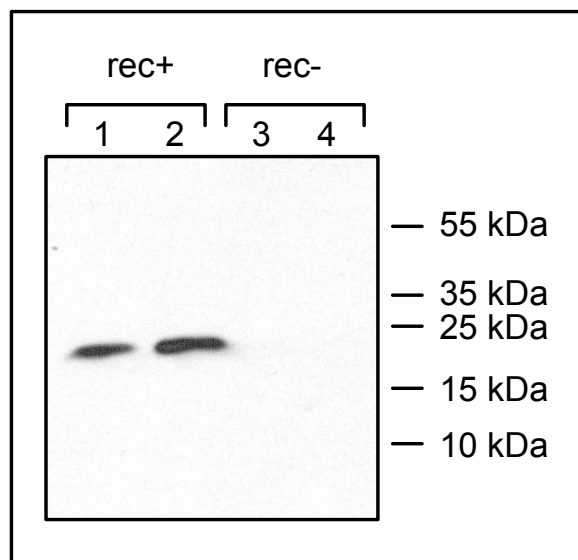


Abbildung 4.4-17 Western Blot der *rec*-transfizierten- und Kontrollvektor transfizierten Zellen. Rec-Proteine sind nur bei den positiv transfizierten Proben vorhanden. Der Größenstandard ist rechts dargestellt.

Die anschließende RNA-Aufarbeitung erfolgte nach Herstellerprotokoll in mehreren Ansätzen, da das verwendete RNeasy Mini-Kit je Reaktion mit maximal 1×10^7 Zellen durchgeführt werden kann (siehe Kapitel 3.2.2).

Um die Integrität der erhaltenen RNA zu ermitteln, wurde eine Analyse mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 und einem Eukaryonten RNA Nano-Chip durchgeführt. Die erhaltenen RIN (RNA Integrity Number)-Werte charakterisieren die Qualität der RNA nicht nur klassisch über das Verhältnis der Ribosomalen Banden, sondern durch die gesamte elektrophoretische Spur der Probe. Dazu gehört auch das Vorhandensein oder Fehlen von Abbauprodukten. Es zeigte sich, dass RNA mit einer RIN von 7,9 bis 9,8 hergestellt wurden. In Abbildung 4.4-18 sind die

Auswertungen von dem mitgeführten Marker (links) und einer exemplarischen RNA-Probe dargestellt. Diese RNA erfüllte die für den Genchip essentiellen Voraussetzungen.

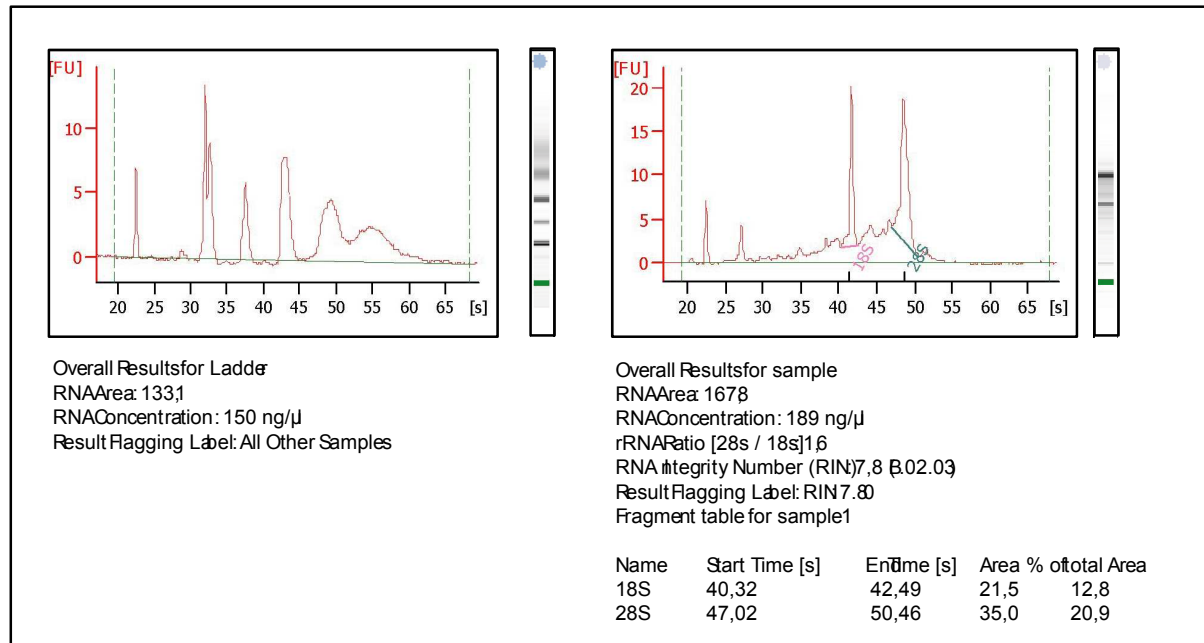


Abbildung 4.4-18 Exemplarische Darstellung der RNA-Integritätsbestimmungen. Links: Chromatogramm des mitgeführten Markers. Rechts: Chromatogramm einer RNA-Probe

Die Hybridisierung, Entwicklung und Detektion der Proben mit den RNA Genchips wurde von der Firma Atlas Biolabs GmbH durchgeführt.

4.4.4 Auswertung der Chipergebnisse

Da das Experiment im Duplett mit zwei unabhängigen Transfektionsansätzen, RNA-Isolationen und Chiphybridisierungen durchgeführt wurde, wurden zwei Auswertungsdateien mit jeweils 47000 untersuchten Sequenzen erhalten.

Diese Daten wurden nach folgenden Kriterien gefiltert:

- Für erhöht exprimierte Gene musste der Spot der *rec*-positiven Probe ein Hybridisierungssignal aufweisen und die Deklaration Increased oder MidIncreased tragen. Die *rec*-negative Probe musste bei dem selben Spot ein Hybridisierungssignal aufweisen.
- Für verringert exprimierte Gene musste der Spot der *rec*-positiven Probe ein Hybridisierungssignal aufweisen und die Deklaration Decreased oder MidDecreased tragen.
- Die gleichen Spots mussten in der Doppelbestimmung den selben Wert aufweisen
- Die nach dem Expressionsstatus sortierten Detektionen mussten bekannte Zielgene repräsentieren.

Danach wurden nur die Sequenzen ermittelt, die bei beiden Chiphybridisierungen die gleiche Expression zeigten. Von diesen Sequenzen wurden im Anschluss nur diejenigen für eine weitere Analyse ausgewählt, die eindeutig auf ein bekanntes Gen hinwiesen.

Die Analyse der gefilterten Daten ergab eine Liste von 33 putativ regulierten Genen, deren Expression mittels real time PCR überprüft werden sollten (Tabelle 6).

Tabelle 6 Expressionsbewertung der mittels Genchip Analyse untersuchten Gene

Erhöhte Expression:
· Histone deacetylase 3 (HDAC3)
· SOX-30
· DNA Topoisomerase I (Human)
· Human MAP kinase kinase MEK5c
· Homo sapiens jun oncogene
· Homo sapiens RNA helicase (RIG-I)
· Structural maintenance of chromosomes protein 3
· Embryonic ectoderm development (EED)
· Homo sapiens cyclin L beta
· Homo sapiens pro-melanin-concentrating hormone (PMCH)
· Homo sapiens zinc finger protein 256
· Interleukin enhancer-binding factor 3
· Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q)
· RRN3 - RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN3
· RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog (<i>S. cerevisiae</i>) pseudogene
· Homo sapiens zinc finger protein 91 (ZNF91)
· Splicing factor, proline- and glutamine-rich
· Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1
· Splicing factor, arginine/serine-rich 7
· RNA-binding protein 9
· Zinc finger protein 24 Long Exon
· Zinc finger protein 24 Short Exon
· Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 5 (EIF5)
· Bromodomain-containing protein 2
Leicht erhöhte Expression:
· Homo sapiens ATF3 mRNA for activating transcription factor 3 delta Zip2
· Homo sapiens down-regulator of transcription 1 Long Exon
· Homo sapiens down-regulator of transcription 1 Short Exon
· Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
· Zinc finger protein 195 Long Version
· Zinc finger protein 195 Short Version
Verringerte Expression:
· Epithelial discoidin domain-containing receptor 1 precursor
Leicht verringerte Expression:
· Integrin alpha-6 precursor (VLA-6)
· Homo sapiens metallothionein 1X (MT1X)

4.4.5 Überprüfung der Expression der identifizierten Gene mittels der Eva Green real time PCR

Die Überprüfung, der mittels Chip-Analyse ermittelten potentiell regulierten Gene erfolgte mit Hilfe der quantitativen Eva Green real time PCR. Alle Messungen erfolgten im Dreifachansatz. Als Template für die real time PCR dienten cDNA-Pools, welche aus den für die Chiphybridisierung verwendeten Gesamt-RNA-Pools gewonnen wurden.

Als interner Standard wurden drei Housekeepinggene ermittelt und verwendet (β -Actin, GUS- β und PUM 1). Diese Housekeepinggene zeigten unter den sechs getesteten Referenzgenen keine Veränderung der Amplifikation zwischen Rec positiven und Rec negativen Proben. Dies ist wichtig um vergleichende quantitative Rückschlüsse auf die Amplifikation ziehen zu können.

4.4.5.1 Überprüfung der real time PCR Primer

Da sich der Fluoreszenzfarbstoff Eva Green unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagert, ist für eine verlässliche Quantifizierung der Genexpression eines Gens mittels real time PCR eine spezifische Amplifikation der Gensequenz nötig. Nebenbanden oder Primerdimer führen hierbei zu Verfälschungen der Ergebnisse. Daher wurden alle 33 Primerpaare auf ihre PCR-Spezifität getestet. Nur Primerpaare, die ein klares Amplifikat ohne Nebenbanden in der Schmelzkurvenanalyse zeigten, wurden für die weitere Analyse herangezogen. In Tabelle 7 sind die Gene aufgeführt, für die kein akzeptables Primerpaar designiert werden konnte.

Tabelle 7 Liste der über- bzw. unterexprimierten Gene, die nicht in der real time PCR detektiert werden konnten

Gen	Abkürzung
Human MAP kinase kinase (MEK5c)	MEK5c
Homo sapiens jun oncogene	v-jun
Homo sapiens RNA helicase(RIG-I)	RIG-I
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	hnRNP
Transcription initiation factor IA	RRN3TIF-IA
Integrin alpha-6 precursor	VLA-6
Homo sapiens metallothionein 1X	MT1x
Epithelial discoidin domain receptor 1	TRK-E

4.4.5.2 Real time PCR Ergebnisse der potentiell regulierten Gene

Die real time PCR-Messungen erfolgen wie oben aufgeführt und wurden mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der real time PCR aufgeführt. Der Faktor gibt die ermittelte Regulation als ein Vielfaches an. Für jeden Wert ist die Standardabweichung (Staab) aufgeführt. Die hellgrün unterlegten Werte weisen eine Überexpression, die dunkelgrün unterlegten eine mittlere Überexpression und die grau unterlegten Werte keine Veränderung der Expression auf. Die hellrot unterlegten Werte stellen unterexprimierte Gene dar. Tabelle 9 fasst die Ergebnisse des Experimentes zusammen.

Tabelle 8 Liste der über- bzw. unterexprimierten Gene, die mittels real time PCR mit spezifischen Primersequenzen analysiert werden konnten. Faktor bezeichnet die Stärke der Überexpression und Staab die ermittelte Standardabweichung. Überexprimierte Gene sind grün unterlegt, unterexprimierte Gene hellrot markiert. Grau unterlegte Werte zeigen keinen Unterschied in der Expression des Gens zwischen den beiden Proben.

	cDNA Chip 1						cDNA Chip 2					
	β-Actin		GUS-β		PUM 1		Actin B		GUS-β		PUM 1	
	Faktor	Staab	Faktor	Staab	Faktor	Staab	Faktor	Staab	Faktor	Staab	Faktor	Staab
HDAC3	1,329	0,159	1,016	0,094	1,008	0,160	1,600	0,170	1,274	0,082	0,898	0,162
SOX-30	1,636	0,161	1,251	0,079	1,240	0,177	1,823	0,303	1,452	0,208	1,023	0,227
DNA TOPO I	1,156	0,132	0,884	0,076	0,877	0,136	1,219	0,201	0,971	0,137	0,684	0,151
hCAP	1,200	0,111	0,917	0,049	0,910	0,127	1,226	0,127	0,977	0,058	0,688	0,123
EED	1,363	0,165	1,042	0,049	0,910	0,127	1,600	0,167	1,274	0,058	0,688	0,123
Cyclin L beta	1,813	0,201	1,386	0,112	1,375	0,209	1,774	0,219	1,413	0,127	0,996	0,191
ZNF256	1,806	0,237	1,380	0,148	1,369	0,230	2,003	0,301	1,562	0,270	1,369	0,473
NFAR	3,644	0,647	2,786	0,446	2,763	0,571	6,902	3,708	5,497	2,906	3,873	2,177
RRN3 TIF-1A PG	0,918	0,247	0,938	0,265	0,422	0,234	2,055	0,650	1,603	0,526	1,405	0,636
ZNF91	3,826	1,180	3,911	1,251	1,761	1,022	1,612	0,482	1,257	0,392	1,102	0,484
SFPQ	2,172	0,548	2,221	0,590	1,000	0,543	3,054	1,414	2,381	1,125	2,087	1,198
MDA-5	1,527	0,602	1,561	0,630	0,703	0,448	1,575	0,204	1,144	0,138	1,131	0,239
SF-9G8	0,810	0,489	0,828	0,505	0,373	0,303	1,252	0,154	0,909	0,104	0,899	0,187
RNA-BP-9	0,632	0,129	0,646	0,142	0,291	0,151	0,711	0,125	0,516	0,088	0,510	0,124
KOX17 LE	1,189	0,872	1,216	0,900	0,548	0,511	0,927	0,269	0,674	0,193	0,666	0,225
KOX17 SE	0,991	0,301	1,013	0,319	0,456	0,262	1,532	0,199	1,113	0,135	1,100	0,233
Bromo-Prot2	1,002	0,662	1,025	0,684	0,461	0,399	0,593	0,077	0,431	0,052	0,426	0,090
ATF-3	2,058	0,595	1,633	0,276	1,004	0,241	2,178	0,202	1,582	0,052	0,426	0,090
hsDRoT-1 LE	2,106	1,463	2,153	0,505	0,373	0,303	1,306	0,168	0,948	0,114	0,937	0,198
hsDRoT-1 SE	1,218	0,351	0,967	0,163	0,594	0,142	1,170	0,114	0,850	0,074	0,840	0,162
hnRNP-Protein A1	1,350	0,324	1,071	0,163	0,594	0,142	1,099	0,146	0,798	0,100	0,789	0,169
ZN195 LV	1,430	0,356	1,135	0,104	0,697	0,134	1,524	0,198	1,107	0,135	1,094	0,232
ZN195 SV	1,113	0,364	0,884	0,200	0,543	0,154	1,286	0,489	0,934	0,352	0,923	0,387

Tabelle 9 Gene die durch die Eva Green real time PCR als differentiell Exprimiert nachgewiesen werden konnten

Protein	Abkürzung	Synonyme	Genomische Lokalisation	Expression
Histon deacetylase 3	HDAC3	HD3, RPD3, RPD3-2, SMAP45	5q31.1-q31.2	+
SRY (sex determining region Y)-box 30	SOX-30	Sox30 protein type II	5q33.3	+
Homo sapiens zinc finger protein 256	ZNF256	BMZF-3, BMZF3	19q13.43	+
Interleukin enhancer-binding factor 3	NFAR	DRBF, DRBP76, MMP4, MPHOSPH4, MPP4, NF-AT-90, NF90, NFAR-1, TCP80, ILF3	19q13.2	+
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	POMP100, PSF, hPOMp100	1q34.3	+
RNA-binding protein 9	RNA-BP-9	Fox-2, HNRBP2, RTA, fzh, RBM9	22q12.3	-

5 Diskussion

5.1 Etablierung der Differential Display Methodik

Alle lebenden Organismen besitzen tausende bis zehntausende von Genen, die in ihrem Genom codiert sind. Von diesen wird nur eine kleine Fraktion, ungefähr 15 %, in jeder einzelnen Zelle exprimiert. Die temporär und räumlich spezifische Regulation der Genexpression ist für den lebenden Organismus essentiell. Die normale Zellentwicklung, aber auch pathologische Veränderungen, die mit Krankheiten wie Krebs einhergehen, sind auf Veränderungen der Genexpression zurückzuführen. Zur Detektion dieser Expressionsunterschiede, die zum Beispiel bei der Tumorinduktion beobachtet werden, dienen Methoden wie subtraktive Hybridisierung oder das differentielle Screening dazu, differentiell exprimierte Transkripte auffindig zu machen. Die Methode der Differential Display PCR erlaubt im Gegensatz zu anderen Methoden die simultane Untersuchung der Genexpression unterschiedlicher mRNA-Populationen (Rebagliati et al., 1985).

Von Vorteil ist auch die schnelle Bewertbarkeit der Differential Display PCR-Ergebnisse, die es ermöglicht, zeitliche Verläufe und qualitative Aussagen der Versuche darzustellen.

5.1.1 *dd-PCR Optimierung der PCR-Reaktion*

Ein Schlüsselpunkt in der dd-PCR ist die Einstellung der PCR-Reaktion, die Reaktionsansatz und Temperaturprogramm einschließt. Hierdurch werden die Ergebnisse wie Bandenanzahl (Abdeckung des analysierten Bereiches), Bandenschärfe (Reproduzierbarkeit und Genauigkeit bei der Reamplifikation) und Bandenstärke (Sensitivität der detektierbaren Transkriptanzahl) grundlegend beeinflusst.

Eine Anpassung der Magnesiumchlorid-Konzentration ist hierbei mit den größten Veränderungen der Ergebnisse verbunden. Sie erfolgte mit dem Bestreben möglichst viele Amplifikate von den cDNA-Matrizen zu erhalten.

Die Wahl der verwendeten Polymerase sollte, wie gezeigt werden konnte, auf ein hochwertiges und stabiles Enzym fallen. Eine Stabilität der Polymerase ist bei dem über viele Zyklen andauernden Temperaturprogramm essentiell. Je effektiver das Enzym arbeitet umso mehr Amplifikate werden in Form von stärkeren Banden im Gel sichtbar.

Es konnte gezeigt werden, dass es unabdingbar ist, die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes innerhalb einer Versuchsreihe konstant zu halten. Kleine Veränderungen führen zu unterschiedlichen Ergebnissen und erschweren die Reproduzierbarkeit der Versuche.

5.1.2 Auswahl der geeigneten DNA-Färbemethoden

Die sensitivste Methode der Färbungen ist die Silberfärbung. Allerdings ist die Durchführung der Methode mit mehreren Reaktionslösungen (Färbelösung, Verstärker-Lösung, Entwickler-Lösung) und den damit verbundenen häufigen und schnell aufeinander abfolgenden Waschschritten sehr aufwendig. Auch die Dicke des Gels von nur 1,5 mm und die geringe Polyacrylamidkonzentration lassen das relativ große Gel schnell zerreißen. Hier ist die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen, die nur eine Inkubation mit der Färbelösung verlangt, wesentlich schneller und einfacher durchzuführen. Auch die Toxizität der SYBR Gold-Färbung ist geringer. Um eine qualitativ hochwertige Silberfärbung durchzuführen, ist es nicht zu vermeiden, als Färbungsverstärker Kaliumdichromat einzusetzen. Dies ist durch seine starke Toxizität und mutagene Wirkung gekennzeichnet. Der Einsatz dieser Chemikalie kann durch die Verwendung der SYBR Gold-Färbung vermieden werden.

Falls die Gele getrocknet und archiviert werden sollen, ist die Silberfärbung allerdings vorzuziehen, da ein Verblässen der Färbung hier ausgeschlossen ist. Die Fluoreszenzfarbstoffe verlieren ihre färbenden Eigenschaften mit der Zeit. Auch die Aufbewahrung nicht getrockneter Gele ist problematisch.

5.1.3 Erforderliche Mehrfachbestimmungen

Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, ist es wichtig, die Experimente mit Duplikaten, besser noch Triplikaten, der jeweiligen Proben durchzuführen (siehe Abbildung 4.2-7). So kann verhindert werden, dass durch methodisch bedingte Ausfälle einzelner Banden diese nicht als differentielle Expressionen gewertet werden. Andererseits ist es ratsam, auf einem Gel Proben unterschiedlicher RNA-Pools, beispielsweise verschiedener Zelllinien oder Transfektionen, für einen direkten Vergleich nebeneinander zu analysieren.

Auch das Mitführen mindestens einer Verdünnungsstufe der synthetisierten cDNA hilft dabei, falsch positive Banden auszuschließen (siehe Abbildung 4.2-7).

Somit ist es zudem möglich, Gene zu identifizieren, die quantitativ reguliert sind und deren Banden auch in der Kontrolle vorhanden sind. Wenn die Intensitätsunterschiede der Banden in allen Vergleichsproben ähnlich sind, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine echte Über- bzw.

Unterexpression vor. In dieser Arbeit zeigte sich das eine Messung von zwei Verdünnungsstufen im Triplikate ausreicht, um falsch positive Amplifikationen auszuschließen.

Da man mit dieser Methode für die gefundenen Gene aber keine absolut quantitative Aussage erhalten kann, verlangt die Beantwortung dieser Frage zusätzliche Analysen, zum Beispiel durch quantitative PCR-Methoden wie real time- oder Taqman-PCR

5.1.4 dd-PCR Ausblick

Seit ihrer Entwicklung 1992 von Liang und Pardee wird die Methodik der Differential Display-PCR erfolgreich eingesetzt.

Die dd-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit funktionell etabliert und deckt mit dem jetzigen Set ungefähr 1/3 der gesamten cDNA ab. Dieses System kann zukünftig dazu genutzt werden, zusätzliche regulierte Gene nach Rec-Überexpression zu finden, da es im Unterschied zu den durchgeführten Genchip-Analysen, ein offenes System ist und auch ungespleißte RNA detektieren kann. Auch weitere Fragestellungen im Hinblick auf andere retrovirale Transkripte können hiermit untersucht werden.

Gegenüber subtraktiven cDNA-Bibliotheken zeichnen sich die Ergebnisse der ddPCR durch eine hohe Reproduzierbarkeit und einer geringeren Anzahl falsch positiver Gene aus.

5.2 Codonoptimierung und Klonierung von *np9*

Nach der ursprünglichen Integration von endogenen Retroviren in die Keimzellbahn des Menschen führten viele Mutationen zum funktionellen Verlust dieser Gene. Auch die offenen Leseraster der HERV-K(HML-2)-Familie blieben seit dem Integrationsereignis vor vielen Millionen Jahren nicht konserviert. Die Deletion, welche zur Bildung der Typ 1- und Typ 2-Proviren führte, fand direkt nach der evolutionären Trennung der Hominoiden von den Affen statt. Die Typ 1-Proviren sind nicht im Affen zu finden (Mayer et al., 1999).

Dem vom Typ 1-Provirus codierten *Np9* wird, wie auch dem Typ 2-Provirus codierten *Rec* ein transformationsförderndes Potential zugesprochen (Denne et al., 2007).

Dies qualifiziert dieses Gen für Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Funktion als transkriptioneller Regulator von humanen Genen. Daher sollten in dieser Arbeit *np9*-Expressionsvektoren generiert und auf ihre Funktionalität hin untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten drei codonoptimierten *np9*-codierende Sequenzen (1q22, 5q33 und 22q11) erfolgreich in den Expressionsvektor pcDNA4A kloniert werden. Des Weiteren wurde ein Wildtyp *np9* (*np9*-3q12) erfolgreich kloniert.

Obwohl mit Hilfe dieser *Np9*-Expressionvektoren kein direkter Proteinnachweis von *Np9* erbracht werden konnte, zeigen die *Np9*-GFP-Fusionsproteine die Funktionalität des hier verwendeten Expressionssystems.

Der Vergleich der wildtyp- und codonoptimierten-Konstrukte (siehe 4.3.1.2.6) konnte zeigen, dass entgegen der Erwartungen der *Np9*-GFP-Wildtyp bei Verwendung der Penta-His-Antikörper im Western Blot ein stärkeres Signal zeigt, als die Codonoptimierte Variante.

Es ist beschrieben, dass die Zelle sehr schnell das *Np9*-Protein abbaut (Armbruster et al., 2004). Die Zelle scheint auch dazu in der Lage zu sein, sehr schnell auf hohe *Np9* Konzentrationen zu reagieren und Kapazitäten zu besitzen, viel *Np9* abzubauen. Diese Vermutung wird durch die Entwicklung desselben Blots mit dem Anti-GFP-Antikörper gestützt. Hier wurde ein stärkeres Signal des GFP-Abbauproduktes bei der codonoptimierten Variante beobachtet. Dagegen spricht allerdings, dass der *Np9*-GFP-Wildtyp in beiden Blots Banden zwischen dem kompletten Fusionsprotein und dem Abbauprodukt aufweist, der *Np9*-GFP-codonoptimierte-Typ hingegen nicht. Dies könnte in der Summe eine annähernd gleiche *Np9*-Konzentration ergeben. Auch die Abstufung der *Np9*-wildtyp-Proteinbanden ist interessant. Wahrscheinlich ist dieses Phänomen auf die Codonoptimierung zurückzuführen.

Die Lokalisation der Fusionsproteine im Kern der Zelle und die 9 kDa umfassende Verschiebung der Proteinbanden im zeitabhängigen Experiment (siehe Kapitel 4.3.1.2.7) bestätigen die bereits bekannten biologischen Aktivitäten für dieses Protein. Die Verschiebung der Banden deutet auf einen selektiven Abbau des *Np9*-Proteinanteils vom Fusionsprotein hin. Dies deckt sich mit der Annahme, dass durch LNX spezifisch ubiquitiniertes *Np9* direkt im 26S-Proteasom abgebaut wird (Armbruster et al., 2004). Es wird hier aber wahrscheinlich nur der *Np9*-Teil markiert und im Proteasom abgebaut. Das angehängte GFP hingegen bleibt unberührt und existiert als einzelnes Protein weiter. Das Vorhandensein eines biologisch aktiven *Np9*-Proteins, ausgehend von den in dieser Arbeit hergestellten Expressionsvektoren, ist somit als sehr wahrscheinlich anzusehen. Der fehlende Nachweis des *Np9*-Proteins im Western Blot kann auf den schnellen Abbau des Proteins zurückgeführt werden. Dennoch zeigen die zeitabhängigen Experimente, dass das Fusionsprotein nicht sofort abgebaut, sondern als intaktes Molekül für mindestens zwei Stunden in der Zelle vorliegt. Für die Untersuchung der Auswirkung einer *Np9*-Expression auf

die Expression anderer zellulärer Gene in humanen Zellen können diese Vektoren somit verwendet werden.

5.3 Affymetrix Genchip-Analyse bei *rec*-transfizierten Zellen

In dieser Arbeit kam der Genchip U133 plus 2.0 der Firma Affymetrix zur Anwendung. Damit war es möglich, 33000 humane Gene auf transkriptionelle Unterschiede hin zu untersuchen. Dies entspricht allen bisher bekannten Transkripten des humanen Genoms. Der Chip beinhaltet 51500 Proben, die über 47000 Transkripte von 39500 bekannten Genen repräsentieren.

Als Proben dienten *rec*-transfizierte HEK-293-Zellen und mit Leervektor transfizierte HEK-293-Zellen. Die RNA-Qualität, cDNA-Synthese und Hybridisierung der Chips erfolgte laut Herstellerfirma sehr gut oder optimal. Die gewonnenen Expressionsdaten wurden in Form einer Excel-Tabelle übermittelt. Die Analyse der Daten erfolgte nach selektivem Filtern. Dies führte zu einer Liste von 33 über- bzw. unterregulierten Genen (siehe Kapitel 4.4.4).

5.3.1 Auswirkungen der Transfektionseffizienz

Eine Analyse der Transfektionseffizienz ist essentiell, um die nachfolgenden Experimente richtig bewerten zu können. Die transiente Transfektion ist in ihrer Effizienz nicht immer voraussehbar. Die Anzahl der erfolgreich transfizierten Zellen kann auch in Parallelansätzen durchgeführter Transfektion stark variieren.

Die Transfektionseffizienz der hergestellten *rec*-Transfektionen lag trotz erfolgter Optimierung bei ungefähr 25%. Dies bedeutet, dass dreiviertel der untersuchten RNA-Pools aus nicht transfizierten Zellen gewonnen wurden. Diese Tatsache lässt die erhaltenen Ergebnisse des Chips, als auch der real time PCR Experimente geringer erscheinen als sie sind. Sie würden demnach bei einer 100 % Transfektionseffizienz eine ca. vierfach höhere Über- bzw. Unterregulation aufweisen. Des Weiteren gehen weniger stark exprimierte Gene unter, die bei einer höheren Transfektionseffizienz eventuell detektiert werden könnten. Um das eventuell nicht realisierbare Herstellen einer stabil transfizierten Zelllinie zu umgehen, könnten markierte transfizierte Zellen mit einem selektiven Zellsortierer (FACS) separiert werden. Die in Kapitel 4.3.1.2.5 beschriebenen GFP-gekoppelten Np9-Proteine würden ein solches Vorgehen ermöglichen. Der Nachteil hierbei liegt in der Einbringung eines weiteren Proteins in die Zelle. Somit können etwaige Reaktionen des zusätzlichen Proteins in der späteren Auswertung nicht von denen des untersuchten unterschieden werden. Auch eine Beeinträchtigung der biologischen

Funktion des untersuchten Proteins durch Kopplung an ein anderes kann hierbei nicht ausgeschlossen werden.

5.3.2 Verifizierung der Expression der identifizierten Gene mittels real time PCR

Um die identifizierten Gene auf ihre Existenz und Regulation zu überprüfen, wurden die entsprechenden cDNA-Pools mit Hilfe der real time PCR analysiert.

Durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Eva Green wird eine quantitative Aussage über die während der PCR hergestellten Transkripte ermöglicht.

Es wurden 33 Gene untersucht. Damit ein quantitativer Vergleich der detektierten Transkripte in der real time PCR möglich ist, muss eine Normalisierung der zu vergleichenden cDNA-Pools erfolgen. Dies wurde durch ein Mitführen von drei unterschiedlichen Housekeepinggenen realisiert. Die Daten der Housekeepinggene konnten durch Anwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit denen der potentiellen Kandidatengene verrechnet werden. Im Folgenden wurden nur die Gene, welche mindestens bei zwei Housekeepinggenen eine Regulation aufwiesen, als anders exprimiert gewertet. Unter diesen Voraussetzungen konnten 5 Gene als differentiell Exprimiert identifiziert werden.

Problematisch stellte sich PUM 1 als Housekeepinggen heraus. Die Daten dieses Gens variierten häufig sehr stark. Dies legt die Vermutung nahe, dass in gewissem Maße auch eine Regulation von PUM 1 erfolgt ist. Dass ein solches Phänomen auftritt ist nicht unwahrscheinlich. Die komplexen Regulationsmechanismen innerhalb der Zelle, insbesondere bei unerforschten Veränderungen, sind kaum voraussehbar. Somit ist auch eine gewisse Regulation der beiden anderen verwendeten Housekeepinggene nicht auszuschließen.

Ein absoluter Standard könnte nur mit hohem Aufwand hergestellt werden. Falls es sich um einkernige Zellen, die demnach nur ein Genom beinhalten, handelt, kann von definierten Zellzahlen die RNA simultan aufgearbeitet werden. Bei vorausgesetzter gleich bleibender Effizienz der Aufarbeitung könnten die erhaltenen Proben direkt, ohne erfolgtes Angleichen, miteinander verglichen werden. Die Effizienz der Aufarbeitung kann durch eine vor der Aufarbeitung zugegebenen definierten, organismusfremden RNA ermittelt werden. Hierbei wird nach erfolgter RNA Isolation die Effizienz durch eine quantitative Bestimmung der Ausbeute der zugegebenen Fremd-RNA bestimmt. Wenn die Effizienz des Aufreinigungsschrittes bekannt ist, können die zu vergleichenden Proben genau aneinander angepasst werden. Bei einer transienten Transfektion würden aber ohne adäquate Transfektionskontrolle die in Kapitel 5.3.1 aufgeführten Probleme auftreten.

Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die Funktion der durch die Rec-Überexpression verändert regulierten Gene und versucht, Verknüpfungen zu den bereits bekannten Funktionen des Proteins Rec herzustellen.

5.3.3 *Histon deacetylase 3 (HDAC3)*

Die Histon deacetylase 3 ist ein 428 Aminosäuren langes Protein, dass zur Subfamilie der Klasse I Histon deacetylasen gehört. Sie wurde 1998 mit Hilfe der Differential Display Technik entdeckt (Dangond et al., 1998). Sie ist verantwortlich für die Deacetylierung der Lysine auf den N-terminalen Enden der Kernhistone (H2A, H2B, H3 und H4). Deacetylierung von Histonen bewirkt eine epigenetische Veränderung und spielt eine große Rolle bei der Regulierung der Transkription, des Zellzyklus und in der Entwicklung. Die HDAC3 formt Multiprotein Corepressor Komplexe um die Transkription von Genen zu reprimieren. Des Weiteren ist das Protein zur korrekten Ausbildung der Mitosespindel nötig (Ishii et al., 2008). In colorectalen Adenocarcinomen konnte neben einer starken Überexpression von HDAC3 dem Protein durch eine selektive Inhibition der Zelldifferenzierungs-Marker Mucin 2 und ITF (Intestinal trefoil factor) in SW480-Zellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt wird auch durch Chemotherapeutika hervorgerufen (Spurling et al., 2008).

Die nachgewiesene Überexpression der HDAC3 könnte auf der Bindung des Rec- and as PLZF-Protein beruhen. HDAC3 ist ein beschriebener Interaktionspartner von PLZF, das normalerweise als Transkriptionsrepressor fungiert. Eine fehlende Repression durch das von Rec abgefangene PLZF verursacht eine Verstärkung der HDAC3 Aktivität. Daraus könnte eine antiapoptotische Wirkung und vermehrte Histondeacetylierung in der Zelle resultieren. Dies sind direkte Voraussetzungen für eine Entartung der Zelle und mögliche Tumorentstehung.

5.3.4 *Sry-Box 30*

Der von SRY codierte Transkriptionsfaktor ist ein Mitglied der HMG-Box (high mobility group)-Familie von DNA bindenden Proteinen. Mutationen in diesem Gen verursachen eine Fehlentwicklung der Gonaden und eine Translokation in das X Chromosom hat XX-gonosomale Männer zur Folge (Goodfellow and Lovell-Badge, 1993). Sox30 wird nur in der Testis von Spermatozyten und weiter differenzierten Zellen exprimiert. Neben Sox5 und Sox17 wird Sox30 differentiell während der Spermatogenese exprimiert. Sie sind an der Regulation der männlichen Keimzellentwicklung maßgeblich beteiligt (Osaki et al., 1999). SOX30 unterdrückt indirekt über eine Interaktion mit TRAF2 die T-Zell-aktivierung und -cytokinproduktion. Eine mögliche

immunsuppressive Wirkung von Rec ist nicht ausgeschlossen und liegt möglicherweise in diesem Interaktionsweg begründet.

5.3.5 Homo sapiens zinc finger protein 256 (ZNF256)

Das ZNF256-Gen ist mit kaum in der Literatur beschrieben. Die sehr große Gruppe der Zinkfingerproteine zeigt in ihrer Charakterisierung noch sehr große Lücken. Das ZNF217 hingegen konnte bereits mit Brustkrebs in Zusammenhang gebracht werden. Auch andere Proteine dieser Familie sind beschrieben. Eine Beschreibung der Wirkung des ZNF256 würde weitere charakterisierende Versuche voraussetzen. Die in dieser Arbeit ermittelte Hochregulation der Transkription von ZNF256 lässt eine Involvierung in durch Rec-expression hervorgerufene zelluläre Veränderungen vermuten.

5.3.6 Interleukin enhancer binding factor 3 (NFAR)

NFAR ermöglicht eine post-transkriptionale Regulation von durch doppelstängiger RNA regulierten Genexpressionen. Es wirkt als inhibitorisches Protein, das an codierende mRNA-Sequenzen bindet (Patel et al., 1999). Primär ist NFAR an Ribosomen lokalisiert (Langland et al., 1999). Es wird ihm auch eine Regulation der Transkription des *il-2*-Gens während der T-Zellaktivierung zugesprochen (Kao et al., 1994). Ein nucleärer Export von NFAR wird für eine Stabilisierung der *Il-2* mRNA benötigt (Shim et al., 2002).

5.3.7 Splicing factor proline- and glutamine-rich (SFPQ)

SFPQ ist ein DNA- und RNA Bindeprotein, das an vielen Kernprozessen beteiligt ist (Patton et al., 1993). Eine pathologische Funktion ist durch eine Translokation des SFPQ-Gens in Nierenzelltumoren beschrieben (Clark et al., 1997).

5.3.8 RNA binding Protein 9 (RNA:BP-9)

Das im Rahmen dieser Arbeit ermittelten RNA BP-9 verlangt eine gesonderte Betrachtung als einziges Gen, das im Chipexperiment als überexprimiert, aber in der real time PCR eindeutig als unterexprimiert gewertet wurde. Ihm wird eine wichtige Rolle in der Oogenese zugesprochen. Eine Mutation, die den Funktionsverlust von RNA BP-9 zur Folge hat, induziert Ovarientumore (Jeong K 2004). Die verminderte Expression des RNA BP-9 scheint die antimutagene Wirkung

des Proteins herabzusetzen und eine Entartung der Zelle zu ermöglichen. Diese Annahme stützt die Vermutung, dass Rec tumorinduzierendes Potential besitzt.

Weitere Untersuchungen müssen den Zusammenhang zwischen der Rec-Überexpression und der modifizierten Expression der genannten Gene zum Inhalt haben.

6 Zusammenfassung

Die Genprodukte der doppelt gespleißten mRNA-Transkripte *rec* und *np9* der HERV-K(HML-2)-Proviren im humanen Genom besitzen Domänen für die Interaktion mit dem promyeloisch leukämischen Zinkfinger Protein (PLZF) und verursachen durch die Bindung an PLZF dessen Inaktivierung. Die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors bedingt eine Veränderung der Genregulation seiner Zielgene, beispielsweise eine Erhöhung von *c-myc*.

In der vorliegenden Arbeit konnten Gene identifiziert werden, die nach transienter Überexpression des HERV-K(HML-2) codierten Proteins Rec in humanen HEK-293 Zellen eine differentielle Expression zeigten. Die Analyse der differentiel exprimierten Gene erfolgte mittels Affymetrix Genchipanalyse. Die Expression der differentiel exprimierten Gene wurde mit Hilfe der real time PCR bestätigt. Die Gene HDAC3 (Gene Histon deacetylase 3), SRY (sex determining region Y)-box 30, Homo sapiens zinc finger protein 256, Interleukin enhancer-binding factor 3 und Splicing factor, proline- and glutamine-rich zeigten sowohl in der Genchip-Analyse, als auch in der real time PCR Analyse eine Heraufregulation. Das RNA-binding protein 9 konnte mit Hilfe der real time PCR als herunterreguliert identifiziert werden.

Des Weiteren konnte die Methode der Differential Display-PCR etabliert werden. Damit steht nun eine Methode zur Verfügung, die es erlaubt auch differentiel exprimierte, unbekannte mRNA-Transkripte zu identifizieren.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde das ebenfalls von HERV-K(HML-2) codierte Gen *np9* codonoptimiert und mittels Gensynthese neusynthetisiert. Die Syntheseprodukte wurden anschließend in den Expressionsvektor pcDNA4A kloniert und die Funktionalität des Systems wurde untersucht. Die Analysen der biologischen Aktivität des Np9 Proteins zeigt einen bereits in der Literatur beschriebenen schnellen Abbau von Np9 und die Lokalisation des Proteins im Zellkern der Zelle. Die gewonnenen Expressionsvektoren können nun für weitere Genchip- oder Differential Display-Analysen zur Verfügung.

7 Literaturverzeichnis

- ADAMAH, D. J., GOKHALE, P. J., EASTWOOD, D. J., RAJPERT DE-MEYTS, E., GOEPEL, J., WALSH, J. R., MOORE, H. D. & ANDREWS, P. W. (2006) Dysfunction of the mitotic:meiotic switch as a potential cause of neoplastic conversion of primordial germ cells. *Int J Androl*, 29, 219-27.
- ANTONY, J. M., VAN MARLE, G., OPII, W., BUTTERFIELD, D. A., MALLET, F., YONG, V. W., WALLACE, J. L., DEACON, R. M., WARREN, K. & POWER, C. (2004) Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci*, 7, 1088-95.
- ARMBRUESTER, V., SAUTER, M., ROEMER, K., BEST, B., HAHN, S., NTY, A., SCHMID, A., PHILIPP, S., MUELLER, A. & MUELLER-LANTZSCH, N. (2004) Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X. *J Virol*, 78, 10310-9.
- ARNAUD, F., CAPORALE, M., VARELA, M., BIEK, R., CHESSA, B., ALBERTI, A., GOLDBERGER, M., MURA, M., ZHANG, Y. P., YU, L., PEREIRA, F., DEMARTINI, J. C., LEYMASTER, K., SPENCER, T. E. & PALMARINI, M. (2007) A paradigm for virus-host coevolution: sequential counter-adaptations between endogenous and exogenous retroviruses. *PLoS Pathog*, 3, e170.
- BANNERT, N. & KURTH, R. (2004) Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 Suppl 2, 14572-9.
- BARMAK, K., HARHAJ, E., GRANT, C., ALEFANTIS, T. & WIGDAHL, B. (2003) Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology*, 308, 1-12.
- BARNA, M., HAWE, N., NISWANDER, L. & PANDOLFI, P. P. (2000) Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat Genet*, 25, 166-72.
- BARRE-SINOUSI, F., CHERMANN, J. C., REY, F., NUGEYRE, M. T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROZENBAUM, W. & MONTAGNIER, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220, 868-71.
- BAUST, C., SEIFARTH, W., GERMAIER, H., HEHLMANN, R. & LEIB-MOSCH, C. (2000) HERV-K-T47D-Related long terminal repeats mediate polyadenylation of cellular transcripts. *Genomics*, 66, 98-103.
- BELSHAW, R., PEREIRA, V., KATZOURAKIS, A., TALBOT, G., PACES, J., BURT, A. & TRISTEM, M. (2004) Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4894-9.
- BIECHE, I., LAURENT, A., LAURENDEAU, I., DURET, L., GIOVANGRANDI, Y., FRENDON, J. L., OLIVI, M., FAUSSER, J. L., EVAIN-BRION, D. & VIDAUD, M. (2003) Placenta-specific INSL4 expression is mediated by a human endogenous retrovirus element. *Biol Reprod*, 68, 1422-9.
- BLOND, J. L., BESEME, F., DURET, L., BOUTON, O., BEDIN, F., PERRON, H., MANDRAND, B. & MALLET, F. (1999) Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol*, 73, 1175-85.
- BLOND, J. L., LAVILLETTE, D., CHEYNET, V., BOUTON, O., ORIOL, G., CHAPEL-FERNANDES, S., MANDRAND, B., MALLET, F. & COSSET, F. L. (2000) An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol*, 74, 3321-9.

- BOESE, A., GALLI, U., GEYER, M., SAUTER, M. & MUELLER-LANTZSCH, N. (2001) The Rev/Rex homolog HERV-K cORF multimerizes via a C-terminal domain. *FEBS Lett*, 493, 117-21.
- BOESE, A., SAUTER, M., GALLI, U., BEST, B., HERBST, H., MAYER, J., KREMMER, E., ROEMER, K. & MUELLER-LANTZSCH, N. (2000) Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Oncogene*, 19, 4328-36.
- BOLLER, K., KONIG, H., SAUTER, M., MUELLER-LANTZSCH, N., LOWER, R., LOWER, J. & KURTH, R. (1993) Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology*, 196, 349-53.
- BOYD, M. T., BAX, C. M., BAX, B. E., BLOXAM, D. L. & WEISS, R. A. (1993) The human endogenous retrovirus ERV-3 is upregulated in differentiating placental trophoblast cells. *Virology*, 196, 905-9.
- BUAAS, F. W., KIRSH, A. L., SHARMA, M., MCLEAN, D. J., MORRIS, J. L., GRISWOLD, M. D., DE ROOIJ, D. G. & BRAUN, R. E. (2004) Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet*, 36, 647-52.
- BUSCHER, K., TREFZER, U., HOFMANN, M., STERRY, W., KURTH, R. & DENNER, J. (2005) Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res*, 65, 4172-80.
- CHEN, S. J., ZELENIT, A., TONG, J. H., YU, H. Q., WANG, Z. Y., DERRE, J., BERGER, R., WAXMAN, S. & CHEN, Z. (1993) Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest*, 91, 2260-7.
- CLARK, J., LU, Y. J., SIDHAR, S. K., PARKER, C., GILL, S., SMEDLEY, D., HAMOUDI, R., LINEHAN, W. M., SHIPLEY, J. & COOPER, C. S. (1997) Fusion of splicing factor genes PSF and NonO (p54nrb) to the TFE3 gene in papillary renal cell carcinoma. *Oncogene*, 15, 2233-9.
- CLAVEL, F., GUÉTARD, D., BRUN-VEZINET, F., CHAMARET, S., REY, M. A., SANTOS-FERREIRA, M. O., LAURENT, A. G., DAUGUET, C., KATLAMA, C., ROUZIOUX, C. & ET AL. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233, 343-6.
- COFFIN, S. E., MOSER, C. A., COHEN, S., CLARK, H. F. & OFFIT, P. A. (1997) Immunologic correlates of protection against rotavirus challenge after intramuscular immunization of mice. *J Virol*, 71, 7851-6.
- COSTOYA, J. A., HOBBS, R. M. & PANDOLFI, P. P. (2008) Cyclin-dependent kinase antagonizes promyelocytic leukemia zinc-finger through phosphorylation. *Oncogene*.
- DANGEL, A. W., BAKER, B. J., MENDOZA, A. R. & YU, C. Y. (1995) Complement component C4 gene intron 9 as a phylogenetic marker for primates: long terminal repeats of the endogenous retrovirus ERV-K(C4) are a molecular clock of evolution. *Immunogenetics*, 42, 41-52.
- DANGOND, F., HAFLER, D. A., TONG, J. K., RANDALL, J., KOJIMA, R., UTKU, N. & GULLANS, S. R. (1998) Differential display cloning of a novel human histone deacetylase (HDAC3) cDNA from PHA-activated immune cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 242, 648-52.
- DEININGER, P. L. & BATZER, M. A. (2002) Mammalian retroelements. *Genome Res*, 12, 1455-65.
- DENNE, M., SAUTER, M., ARMBRUESTER, V., LICHT, J. D., ROEMER, K. & MUELLER-LANTZSCH, N. (2007) Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Virol*, 81, 5607-16.

- DENNER, J., PHELPS, R.C., LÖWER, R., LÖWER, J., AND KURTH, R. (1995) Expression of the human endogenous retrovirus HERV-K in tumor and normal tissue and antibody response in pregnant women, tumor and AIDS patients against HERV-K Gag and Env peptides. *AIDS Res*, 11, 103.
- DOOLITTLE, R. F., FENG, D. F., JOHNSON, M. S. & MCCLURE, M. A. (1989) Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Q Rev Biol*, 64, 1-30.
- FASKEN, M. B., SAUNDERS, R., ROSENBERG, M. & BRIGHTY, D. W. (2000) A leptomycin B-sensitive homologue of human CRM1 promotes nuclear export of nuclear export sequence-containing proteins in Drosophila cells. *J Biol Chem*, 275, 1878-86.
- FLOCKERZI, A., BURKHARDT, S., SCHEMPF, W., MEESE, E. & MAYER, J. (2005) Human endogenous retrovirus HERV-K14 families: status, variants, evolution, and mobilization of other cellular sequences. *J Virol*, 79, 2941-9.
- FRENDO, J. L., OLIVIER, D., CHEYNET, V., BLOND, J. L., BOUTON, O., VIDAUD, M., RABREAU, M., EVAIN-BRION, D. & MALLET, F. (2003) Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol*, 23, 3566-74.
- GALLI, U. M., SAUTER, M., LECHER, B., MAURER, S., HERBST, H., ROEMER, K. & MUELLER-LANTZSCH, N. (2005) Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. *Oncogene*, 24, 3223-8.
- GOODFELLOW, P. N. & LOVELL-BADGE, R. (1993) SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet*, 27, 71-92.
- GROSS, L. & FELDMAN, D. G. (1970) Comparative study of the morphology and distribution of virus particles causing leukemia and lymphosarcoma in mice, rats, cats, and guinea pigs. *Arch Geschwulstforsch*, 36, 1-9.
- HARAGUCHI, S., GOOD, R. A. & DAY, N. K. (1995a) Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns. *Immunol Today*, 16, 595-603.
- HARAGUCHI, S., GOOD, R. A., JAMES-YARISH, M., CIANCIOLO, G. J. & DAY, N. K. (1995b) Differential modulation of Th1- and Th2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 3611-5.
- HAYASHIDA, H. & MIYATA, T. (1983) Unusual evolutionary conservation and frequent DNA segment exchange in class I genes of the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 2671-5.
- HERBST, H., KUHLE-OBARIUS, C., LAUKE, H., SAUTER, M., MUELLER-LANTZSCH, N., HARMS, D. & LONING, T. (1999) Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in gonadoblastomas and gonadoblastoma-derived germ cell tumours. *Virchows Arch*, 434, 11-5.
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P. S. & GRIFFITH, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10, 413-7.
- HISHINUMA, F., DEBONA, P. J., ASTRIN, S. & SKALKA, A. M. (1981) Nucleotide sequence of acceptor site and termini of integrated avian endogenous provirus ev1: integration creates a 6 bp repeat of host DNA. *Cell*, 23, 155-64.
- HUGHES, J. F. & COFFIN, J. M. (2001) Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution. *Nat Genet*, 29, 487-9.
- HUGHES, J. F. & COFFIN, J. M. (2004) Human endogenous retrovirus K solo-LTR formation and insertional polymorphisms: implications for human and viral evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1668-72.
- ISHII, S., KURASAWA, Y., WONG, J. & YU-LEE, L. Y. (2008) Histone deacetylase 3 localizes to the mitotic spindle and is required for kinetochore-microtubule attachment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 4179-84.

- JERN, P., SPERBER, G. O. & BLOMBERG, J. (2005) Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy. *Retrovirology*, 2, 50.
- KALYANARAMAN, V. S., SARNGADHARAN, M. G., ROBERT-GUROFF, M., MIYOSHI, I., GOLDE, D. & GALLO, R. C. (1982) A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, 218, 571-3.
- KAO, P. N., CHEN, L., BROCK, G., NG, J., KENNY, J., SMITH, A. J. & CORTHESEY, B. (1994) Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90. *J Biol Chem*, 269, 20691-9.
- KEYDAR, I., OHNO, T., NAYAK, R., SWEET, R., SIMONI, F., WEISS, F., KARBY, S., MESA-TEJADA, R. & SPIEGELMAN, S. (1984) Properties of retrovirus-like particles produced by a human breast carcinoma cell line: immunological relationship with mouse mammary tumor virus proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 4188-92.
- KIM, T. H., JEON, Y. J., YI, J. M., KIM, D. S., HUH, J. W., HUR, C. G. & KIM, H. S. (2004) The distribution and expression of HERV families in the human genome. *Mol Cells*, 18, 87-93.
- KITAMURA, M., MARUYAMA, N., SHIRASAWA, T., NAGASAWA, R., WATANABE, K., TATENO, M. & YOSHIKI, T. (1994) Expression of an endogenous retroviral gene product in human placenta. *Int J Cancer*, 58, 836-40.
- KOBAYASHI, K., NAKAHORI, Y., MIYAKE, M., MATSUMURA, K., KONDO-IIDA, E., NOMURA, Y., SEGAWA, M., YOSHIOKA, M., SAITO, K., OSAWA, M., HAMANO, K., SAKAKIHARA, Y., NONAKA, I., NAKAGOME, Y., KANAZAWA, I., NAKAMURA, Y., TOKUNAGA, K. & TODA, T. (1998) An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*, 394, 388-92.
- KOZAK, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, 15, 8125-48.
- LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J. P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, N., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, J., CLEE, C., CARTER, N., COULSON, A., DEADMAN, R., DELOUKAS, P., DUNHAM, A., DUNHAM, I., DURBIN, R., FRENCH, L., GRAFHAM, D., GREGORY, S., HUBBARD, T., HUMPHRAY, S., HUNT, A., JONES, M., LLOYD, C., MCMURRAY, A., MATTHEWS, L., MERCER, S., MILNE, S., MULLIKIN, J. C., MUNGALL, A., PLUMB, R., ROSS, M., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., WATERSTON, R. H., WILSON, R. K., HILLIER, L. W., MCPHERSON, J. D., MARRA, M. A., MARDIS, E. R., FULTON, L. A., CHINWALLA, A. T., PEPIN, K. H., GISH, W. R., CHISSOE, S. L., WENDL, M. C., DELEHAUNTY, K. D., MINER, T. L., DELEHAUNTY, A., KRAMER, J. B., COOK, L. L., FULTON, R. S., JOHNSON, D. L., MINX, P. J., CLIFTON, S. W., HAWKINS, T., BRANSCOMB, E., PREDKI, P., RICHARDSON, P., WENNING, S., SLEZAK, T., DOGGETT, N., CHENG, J. F., OLSEN, A., LUCAS, S., ELKIN, C., UBERBACHER, E., FRAZIER, M., et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- LANDRY, J. R., ROUHI, A., MEDSTRAND, P. & MAGER, D. L. (2002) The Opitz syndrome gene *Mid1* is transcribed from a human endogenous retroviral promoter. *Mol Biol Evol*, 19, 1934-42.

- LANGLAND, J. O., KAO, P. N. & JACOBS, B. L. (1999) Nuclear factor-90 of activated T-cells: A double-stranded RNA-binding protein and substrate for the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *Biochemistry*, 38, 6361-8.
- LARSSON, E., ANDERSSON, A. C. & NILSSON, B. O. (1994) Expression of an endogenous retrovirus (ERV3 HERV-R) in human reproductive and embryonic tissues--evidence for a function for envelope gene products. *Ups J Med Sci*, 99, 113-20.
- LEIB-MOSCH, C. & SEIFARTH, W. (1995) Evolution and biological significance of human retroelements. *Virus Genes*, 11, 133-45.
- LIANG, P. & PARDEE, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257, 967-71.
- LIAO, D., PAVELITZ, T. & WEINER, A. M. (1998) Characterization of a novel class of interspersed LTR elements in primate genomes: structure, genomic distribution, and evolution. *J Mol Evol*, 46, 649-60.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOWER, R. (1999) The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *Trends Microbiol*, 7, 350-6.
- LOWER, R., BOLLER, K., HASENMAIER, B., KORBMACHER, C., MULLER-LANTZSCH, N., LOWER, J. & KURTH, R. (1993) Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 4480-4.
- MAGER, D. L., HUNTER, D. G., SCHERTZER, M. & FREEMAN, J. D. (1999) Endogenous retroviruses provide the primary polyadenylation signal for two new human genes (HHLA2 and HHLA3). *Genomics*, 59, 255-63.
- MAGIN, C., LOWER, R. & LOWER, J. (1999) cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. *J Virol*, 73, 9496-507.
- MANGENEY, M., DE PARSEVAL, N., THOMAS, G. & HEIDMANN, T. (2001) The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol*, 82, 2515-8.
- MANGENEY, M., RENARD, M., SCHLECHT-LOUF, G., BOUALLAGA, I., HEIDMANN, O., LETZELTER, C., RICHAUD, A., DUCOS, B. & HEIDMANN, T. (2007) Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20534-9.
- MARTIN, M. A., BRYAN, T., RASHEED, S. & KHAN, A. S. (1981) Identification and cloning of endogenous retroviral sequences present in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 4892-6.
- MAYER, J. & MEESE, E. U. (2002) The human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-3). *Genomics*, 80, 331-43.
- MAYER, J., SAUTER, M., RACZ, A., SCHERER, D., MUELLER-LANTZSCH, N. & MEESE, E. (1999) An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nat Genet*, 21, 257-8.
- MEYERS, J. A., SANCHEZ, D., ELWELL, L. P. & FALKOW, S. (1976) Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*, 127, 1529-37.
- MI, S., LEE, X., LI, X., VELDMAN, G. M., FINNERTY, H., RACIE, L., LAVALLIE, E., TANG, X. Y., EDOUARD, P., HOWES, S., KEITH, J. C., JR. & MCCOY, J. M. (2000) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403, 785-9.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.

- NELSON, P. N., LEVER, A. M., SMITH, S., PITTMAN, R., MURRAY, P., PERERA, S. A., WESTWOOD, O. M., HAY, F. C., EJTEHADI, H. D. & BOOTH, J. C. (1999) Molecular investigations implicate human endogenous retroviruses as mediators of anti-retroviral antibodies in autoimmune rheumatic disease. *Immunol Invest*, 28, 277-89.
- ONO, M. (1986) Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes. *J Virol*, 58, 937-44.
- OSAKI, E., NISHINA, Y., INAZAWA, J., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A., OHSUGI, M., TEZUKA, T., YOSHIDA, M. & SEMBA, K. (1999) Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res*, 27, 2503-10.
- OSTERTAG, E. M., GOODIER, J. L., ZHANG, Y. & KAZAZIAN, H. H., JR. (2003) SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *Am J Hum Genet*, 73, 1444-51.
- PATEL, R. C., VESTAL, D. J., XU, Z., BANDYOPADHYAY, S., GUO, W., ERME, S. M., WILLIAMS, B. R. & SEN, G. C. (1999) DRBP76, a double-stranded RNA-binding nuclear protein, is phosphorylated by the interferon-induced protein kinase, PKR. *J Biol Chem*, 274, 20432-7.
- PATTON, J. G., PORRO, E. B., GALCERAN, J., TEMPST, P. & NADAL-GINARD, B. (1993) Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev*, 7, 393-406.
- POIESZ, B. J., RUSCETTI, F. W., GAZDAR, A. F., BUNN, P. A., MINNA, J. D. & GALLO, R. C. (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 7415-9.
- PRUDHOMME, S., BONNAUD, B. & MALLET, F. (2005) Endogenous retroviruses and animal reproduction. *Cytogenet Genome Res*, 110, 353-64.
- PUIGBO, P., BRAVO, I. G. & GARCIA-VALLVE, S. (2008) E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). *BMC Bioinformatics*, 9, 65.
- PUIGBO, P., GUZMAN, E., ROMEU, A. & GARCIA-VALLVE, S. (2007) OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 35, W126-31.
- REBAGLIATI, M. R., WEEKS, D. L., HARVEY, R. P. & MELTON, D. A. (1985) Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. *Cell*, 42, 769-77.
- ROUCOUX, D. F. & MURPHY, E. L. (2004) The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev*, 6, 144-54.
- SAMUELSON, L. C., WIEBAUER, K., SNOW, C. M. & MEISLER, M. H. (1990) Retroviral and pseudogene insertion sites reveal the lineage of human salivary and pancreatic amylase genes from a single gene during primate evolution. *Mol Cell Biol*, 10, 2513-20.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SCHULTE, A. M., LAI, S., KURTZ, A., CZUBAYKO, F., RIEGEL, A. T. & WELLSTEIN, A. (1996) Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14759-64.
- SENE-DIOUF, F., NDIAYE, M., DIOP, A. G., THIAM, A., NDAO, A. K., DIAGNE, M., NDIAYE, M. M. & NDIAYE, I. P. (2000) [Epidemiological, clinical and progressive aspects of neurological manifestations associated with retroviral infections: eleven year retrospective study]. *Dakar Med*, 45, 162-6.
- SHIM, J., LIM, H., J, R. Y. & KARIN, M. (2002) Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization. *Mol Cell*, 10, 1331-44.

- SPURLING, C. C., GODMAN, C. A., NOONAN, E. J., RASMUSSEN, T. P., ROSENBERG, D. W. & GIARDINA, C. (2008) HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation. *Mol Carcinog*, 47, 137-47.
- STEINHUBER, S., BRACK, M., HUNSMANN, G., SCHWELBERGER, H., DIERICH, M. P. & VOGETSEDER, W. (1995) Distribution of human endogenous retrovirus HERV-K genomes in humans and different primates. *Hum Genet*, 96, 188-92.
- TEMIN, H. M. (1964) Homology between Rna from Rous Sarcoma Virus and DNA from Rous Sarcoma Virus-Infected Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 52, 323-9.
- TING, C. N., ROSENBERG, M. P., SNOW, C. M., SAMUELSON, L. C. & MEISLER, M. H. (1992) Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev*, 6, 1457-65.
- TONJES, R. R., BOLLER, K., LIMBACH, C., LUGERT, R. & KURTH, R. (1997) Characterization of human endogenous retrovirus type K virus-like particles generated from recombinant baculoviruses. *Virology*, 233, 280-91.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1989) Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem*, 27, 495-501.
- WANG-JOHANNING, F., FROST, A. R., JIAN, B., AZEROU, R., LU, D. W., CHEN, D. T. & JOHANNING, G. L. (2003) Detecting the expression of human endogenous retrovirus E envelope transcripts in human prostate adenocarcinoma. *Cancer*, 98, 187-97.
- WEISS, R. (1984) Tissue-specific transformation by human T-cell leukaemia virus. *Nature*, 310, 273-4.
- YANG, M. K. & WU, P. I. (1999) Identification of the promoter region of the *Xanthomonas campestris* pv. *citri* recA gene responsible for induction by DNA-damaging agents. *FEMS Microbiol Lett*, 176, 57-65.