

Aus der Medizinischen Tierklinik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und
dem José Carreras Zentrum für Immun- und Gentherapie
der Universität des Saarlandes

**Molekularbiologische Untersuchungen zur Interaktion des humanen
endogenen Retrovirus K - Proteins Np9 mit dem Tumorsuppressor p53**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Anne Himber
aus Madrid

Leipzig, 2017

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Walter Brehm

Betreuer: Prof. Dr. Dipl. ECEIM Gerald Fritz Schusser
Prof. Dr. rer. nat. Klaus Römer

Gutachter: Prof. Dr. Dipl. ECEIM Gerald Fritz Schusser, Medizinische Tierklinik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. rer. nat. Klaus Römer, José Carreras Zentrum für Immun-
und Gentherapie der Universität des Saarlandes
Prof. Dr. rer. nat. Kurt Engeland, Molekulare Onkologie, Klinik und
Polyklinik für Frauenheilkunde, Universität Leipzig

Tag der Verteidigung: 08.03.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	1
2	Literaturübersicht.....	2
2.1	Der Tumorsuppressor p53.....	2
2.2	Das Kernprotein Np9	7
2.2.1	Retroviren.....	7
2.2.2	Endogene Retroviren.....	8
2.2.3	Humane endogene Retroviren	8
2.2.4	HERV-K.....	10
2.2.5	Das nukleäre Protein Np9.....	10
3	Material und Methoden	15
3.1	Material	15
3.1.1	Chemikalien	15
3.1.2	Puffer und Lösungen	17
3.1.3	Antikörper.....	21
3.1.4	Enzyme	22
3.1.5	Reaktionskits	22
3.1.6	Bakterienstämme	23
3.1.7	Kulturmedien.....	23
3.1.8	Oligonukleotide für EMSA	23
3.1.9	Größenstandards.....	24
3.1.10	Plasmide	26
3.2	Methoden.....	28
3.2.1	Nukleinsäuretechniken.....	28
3.2.2	Protein-Methoden.....	31
3.2.3	Prokaryonten.....	40
4	Ergebnisse.....	42
4.1	Interaktion zwischen Np9 und dem Tumorsuppressorprotein p53	42
4.2	GST-Pulldown	43
4.2.1	Klonierung für die GST-Pulldown-Analysen	43
4.2.2	Induktion der Proteinexpression	48
4.2.3	GST-Pulldown-Experimente	53
4.3	EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	57

4.3.1	Radioaktive Markierung der Sonden.....	58
4.3.2	EMSA-Experimente.....	58
5	Diskussion.....	63
6	Zusammenfassung.....	68
7	Summary.....	70
8	Literaturverzeichnis.....	72
	Danksagung	86
	Abbildungsverzeichnis.....	87
	Tabellenverzeichnis	88

Abkürzungsverzeichnis

-	Minus
%	Prozent
+	Plus
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
aa	Aminosäurereste
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma extra large
bidest	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
CDK	Cyclin-dependent kinases
CIP	calf intestinal phosphatase
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dest	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EBNA-2	Eppstein-Barr-Virus nuclear antigen 2
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
env	Hüllprotein

EqERV-beta1	erstes equines endogenes Beta-Retrovirus
ERV	endogene Retroviren
ERV-L	endogenous retrovirus-like elements
<i>et al.</i>	et alumni
FeLV	felines leukämievirus
fl	full length (Volllänge)
gag	gruppenspezifisches Antigen
GST	Glutathione S-Transferase
h	hour (Stunden)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HERV	humane endogene Retroviren
HERVd	Human Endogenous Retroviruses Database
HERV-L	human endogenous retrovirus-like elements
HML	Human MMTV like
IgG	Immunglobulin G, Gammaglobulin
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IVT	<i>in vitro</i> -Translatat
kb	Kilobase (1000 Nukleotide)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	lysogeny broth
LNx	ligand of numb protein x
LTR	long terminal repeats
M	molare Masse
Ma	Marker
MDM2	mouse double minute 2
mg	Milligramm
MG132	Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMTV	Maus-Mammatumorvirus
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NLS	nuclear localization signal (Kernlokalisationsignal)
nm	Nanometer
Np9	Nukleäres Protein der Masse 9
OD	optische Dichte
ORF	open reading frames
P	Phosphor
p21	Protein 21
p53	Protein 53, Tumorsuppressor
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
pH	potentia Hydrogenii
PLZF	promyelocytic leukaemia zinc finger protein
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
pol	Polymerase
Poly (dl-dc)	Poly (deoxyinosinic-deoxycytidylic)
prt	Protease
rec	Regulator of Expression encoded by cORF
RNA	Ribonukleinsäure
RNPC1	RNA-binding protein
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S	Schwefel
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
S-Phase	Synthese-Phase
t	time (Zeit)

TAF	TBP-assoziierte Faktoren
TATA- Box	Thymin-Adenin-Promotorsquenz
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box-Bindungsprotein
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
tRNA	Transfer-RNA
TZF	Testikular Zink Finger
U	unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
Vgl.	Vergleich
x	Multiplikation
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits im Vorfeld zu der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen Hinweise darauf finden, dass das Kernprotein Np9 an den Tumorsuppressor p53 bindet. Während p53, aufgrund seiner Funktion als Tumorsuppressor, zu den am besten untersuchten Proteinen überhaupt gehört, war über Np9 noch sehr wenig bekannt. Allerdings wurde ja berichtet, dass Np9 vornehmlich in transformierten Zellen und Tumorgeweben, in gesunden Geweben jedoch nur in geringerem Maße, in nachweislicher Menge exprimiert wird (ARMBRUESTER et al. 2002). Folglich war eine durch unsere Entdeckung indizierte, potentiell auch funktionelle Interaktion von Np9 mit dem Tumorsuppressor p53 von großem Interesse. Aus der im folgenden hergeleiteten Evolution von Np9 folgte zudem, dass das Protein ja nur in Hominiden - also Schimpansen, Gorillas und Menschen - exprimiert wird. p53 oder verwandte Proteine hingegen werden in allen Phyla von den Rundwürmern bis zu den Vertebraten produziert. Entsprechend nahe lag es, die Arbeitshypothese zu formulieren, dass unterschiedliche Funktionen des Tumorsuppressors p53 über Np9 auf eine Weise reguliert werden können, die spezifisch für große Affen und auch Menschen ist. Dabei kann diese Arbeit als Grundlagenarbeit gewertet werden, da Tumore ja auch in der Tiermedizin, speziell der Kleintier- und Pferdemedizin, nicht zuletzt aufgrund der steigenden Lebenserwartung, eine große Rolle spielen.

In der vorliegenden Dissertation sollte zunächst eine genaue biochemische Kartierung der Interaktionsdomänen der beiden Proteinbindungspartner erfolgen. Zu diesem Zweck sollten GST-pulldown-Assays mit bakteriell exprimierten Fusionsproteinen und den jeweiligen radioaktiv markierten Beuteproteinen durchgeführt werden. Im Anschluss daran sollten erste funktionelle Konsequenzen der Interaktion von Np9 und p53 untersucht werden. Hierzu wurde zunutze gemacht, dass p53 als Transkriptionsfaktor wirkt, der nach Stimulation an seine DNA-Erkennungssequenzen bindet und somit benachbarte Gene transaktiviert. Die Bindung von nativem p53 an eine radioaktiv markierte DNA kann mittels sog. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) in vitro nachgewiesen und quantifiziert werden.

Es sollte also untersucht werden, ob Np9 die Fähigkeit von aktiviertem p53 an seine spezifische DNA zu binden beeinflusst.

2 Literaturübersicht

2.1 Der Tumorsuppressor p53

Seit seiner Entdeckung und der ersten Beschreibung durch LANE und CRAWFORD (1979), LINZER und LEVINE (1979), KRESS *et al.* (1979) und DELEO *et al.* (1979) vor über 30 Jahren wurde der Tumorsuppressor p53 aus gutem Grund eingehend erforscht (LEVIN und OREN 2009).

Das Protein hat eine Schlüsselrolle bei zahlreichen zellulären Prozessen, einschließlich Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur, Sicherung der Genomstabilität, Induktion des programmierten Zelltodes, Differenzierung (ROTTER *et al.* 1994), Alterungsprozesse (WYNFORD-THOMAS, 1999) und Angiogenese (VOJTA und BARRET, 1995; BOUCK *et al.* 1996).

Im Mausversuch hat sich gezeigt, dass ständig erhöhte p53-Aktivität zu einer Veränderung in den Organen führt, welche altersassoziierten Erkrankungen entsprechen (TYNER *et al.* 2002; MAIER *et al.* 2004). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass p53 unabhängig von seiner Funktion als Tumorsuppressor auch Einfluss auf die Lebensdauer hat. In Studien wurde inzwischen belegt, dass der Transkriptionsfaktor p53 tatsächlich an der Regulation der menschlichen Lebenserwartung beteiligt ist (FENG *et al.* 2008).

Der Transkriptionsfaktor p53 steuert auch die weibliche Fertilität (KANG *et al.* 2009), dabei sind reduzierte Fruchtbarkeit und Langlebigkeit in manchen Populationen korreliert (JASIENSKA, 2009). Im Mausversuch zeigte sich bei fehlendem oder reduziertem p53 in weiblichen Mäusen ein Abfall der Trächtigkeitsraten auf bis zu 1/3 (HU *et al.* 2007).

Auch beim Menschen ist der Tumorsuppressor p53 in der Lage, die Expression des humanen Choriongonadotropins β 7 (CG β 7) zu induzieren (SOHR und ENGELAND 2011). Dieses Peptidhormon ist für die Implantation der Blastocyste und den Erhalt der frühen Schwangerschaft verantwortlich

Der Tumorsuppressor p53 liegt in zahlreichen veränderten Zellen in hohem Level vor, in unveränderten Zellen hingegen generell niedrig (KRESS *et al.* 1979; LANE und CRAWFORD 1979; LINZER und LEVINE 1979; ROTTER *et al.* 1980), bedingt durch die Instabilität des kurzlebigen Proteins und eine sehr geringe Transkription des p53-Gens (OREN *et al.* 1982 und LANE, DP, unveröffentlicht). Stabilisiertes p53 akkumuliert im Zellkern und induziert die Expression unterschiedlicher Gene (BODE und DONG 2004).

Als Zellzyklusregulator induziert es als Reaktion auf intrinsischen Stress die Expression von *p21*, welches an den G1/S-Cdk Komplex bindet. Dieser besteht aus Cyklin E und der Cyklin-abhängigen Kinase 2 und hilft der Zelle den G1/G2-Kontrollpunkt zu überwinden und so den Zellzyklus voranzutreiben. Das Protein p21 verhindert, dass die Zelle in die S-Phase eintritt. Der folgende Zellzyklusarrest ermöglicht entweder eine Reparatur des Zellschadens oder, bei irreparablen Schäden, die Einleitung der Apoptose (ALBERTS, 2005). Verschiedene Faktoren, einschließlich Zelltyp, genetische Information, Ausdehnung des DNA-Schadens und p53-Level bestimmen die Entscheidung für Zellzyklusarrest oder Apoptose (CHEN *et al.* 1996). Der Tumorsuppressor p53 befindet sich üblicherweise im Nukleus, kann aber in Mitochondrien translozieren um dort an antiapoptotische Proteine wie BCL2 und BCL-XL zu binden und somit die Apoptose zu induzieren (BODE und DONG, 2004). Aufgrund seiner Fähigkeiten als Zellzyklusregulator wurde p53 von LANE (1992) als „Wächter des Genoms“ bezeichnet.

In etwa der Hälfte sämtlicher humaner Krebsformen zahlreicher verschiedener Gewebe konnte entweder ein Verlust von p53 oder eine Mutation, die zu seiner Inaktivierung führt nachgewiesen werden (BAKER *et al.* 1989, 1990; CARON DE FROMENTEL und SOUSSI 1992; HOLLSTEIN *et al.* 1994; MARSHALL 1991; NIGRO *et al.* 1989). Heute ist der Tumorsuppressor p53 bekannt als das am häufigsten veränderte Gen in menschlichen Tumoren (CARON DE FROMENTEL und SOUSSI 1992; HOLLSTEIN *et al.* 1994, 1996).

Genau wie beim Menschen wurden auch bei Hunden in unterschiedlichen Tumoren Veränderungen des Transkriptionsfaktors p53 berichtet. Hunde, die an Lymphomen erkrankten, welche Mutationen des Tumorsuppressors p53 aufwiesen, zeigten ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie und eine kürzere Überlebenszeit, als solche, in deren Lymphomen unveränderter p53-Wildtyp nachgewiesen werden konnte (KOSHINO *et al.* 2016). Zhang *et al.* zeigten 2011, dass das Protein RNPC1, welches häufig in caninen Lymphomen überexprimiert wird, zu einer verringerten Expression des Tumorsuppressors

p53 führt. Im Gegensatz dazu führte ein Verlust von RNP1 in embryonalen Mäusefibroblasten zu einem stark erhöhten p53-Level und somit einer frühzeitigen Alterung. Auch bei Katzen finden sich Studien zu der Bedeutung des Tumorsuppressors p53. So ging der somatische Verlust der Heterozygotie der p53-Gensequenz in impfassozierten Fibrosarkomen der Katze einher mit früheren Rezidiven und einer kürzeren Überlebenszeit als bei den Patienten ohne diese Veränderung (BANERJI und KANJILAL, 2006). Des Weiteren blieben die Katzen, bei denen p53 vermehrt im Nukleus lokalisiert war, wesentlich länger gesund (325 Tage) als Tiere, bei denen p53 vermehrt im Zytoplasma vorkam (135 Tage) (HERSHEY et al. 2005)

Keimbahn-Mutationen von p53 sind auch überwiegend für die Erbkrankheit Li-Fraumeni-Syndrom verantwortlich. Betroffene Individuen haben ein hohes Risiko außergewöhnlich früh eine Vielzahl von Krebsformen zu entwickeln, darunter Weichteilkarzinome, Knochenkrebs, Brustkrebs und Tumore des Gehirns oder Urogenital-Traktes (MALKIN et al. 1990).

Transgene Mäuse, welche mutierte *p53*-Allele exprimieren, entwickeln sich zunächst normal, haben dann aber eine hohe Tumorraten, speziell des Lymphgewebes (LAVIGUEUR et al. 1989). Die Funktionen von p53 können auch durch Interaktion mit speziellen viralen Onkoproteinen oder dem Zellprotein MDM2 verändert oder inhibiert werden. MDM-2 ist das Produkt des *mdm2*-Onkogens, welches vermehrt in zahlreichen Tumoren vorkommt (MOMAND et al. 1992; OLINER et al. 1992). Bei der Inaktivierung von p53, welche in vielen Tumortypen (Weichteilsarkome, Neurentumoren, Blasen-, Zervikal- und Brustkarzinome, Leukämie) üblich ist, werden bestimmte DNA-Bindungen und/oder Transaktivierungsaktivitäten außer Kraft gesetzt; p53 im Zytoplasma festgehalten oder seine Degradation veranlasst (BEAUDRY et al. 1996).

MDM2 hemmt den Tumorsuppressor p53 auf 2 Arten: es bindet an die Transaktivierungsdomäne und verhindert somit die Aktivierung der Transkription durch p53 (MOMAND et al. 1992; OLINER et al. 1993). Außerdem kann es p53 durch Ubiquitinierung für den schnellen proteasomalen Abbau markieren (HAUPT et al. 1997; KUBBUTAT et al. 1998, IWAKUMA und LOZANO 2003). Das *mdm2*-Gen wird darüber hinaus durch p53

aktiviert, was zu einer negativen Rückkopplung führt (WU *et al.* 1993). Dies erklärt zum Teil, warum p53 weniger stabil ist als die mutierten Formen, da diese nicht in der Lage sind die Expression von *mdm-2* zu induzieren (MIDGLEY und LANE 1997). MDM2 bewegt sich zwischen Nukleus und Zytoplasma und kann dabei das üblicherweise im Kern lokalisierte p53 ins Zytoplasma exportieren. Dies ist entscheidend um p53 für den Abbau zu markieren.

Das humane *p53*-Gen erstreckt sich über 20 kb DNA und befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13). Es besteht aus 11 Exons, von denen das erste nicht kodiert und 8-10 kb von Exons 2-11 entfernt liegt (BENCHIMOL *et al.* 1985; ISOBE *et al.* 1986; MCBRIDE *et al.* 1986; MILLER *et al.* 1986; OREN *et al.* 1985).

Das Protein besteht aus 393 Aminosäuren und 4 funktionalen Domänen: am N-Terminus liegt die Transaktivierungsdomäne (Aminosäuren 1-42), im Zentrum die sequenzspezifische Bindedomäne (AS 102-292) und am C-Term die Oligomerisierungs- (AS 323-356) sowie die Regulationsdomäne (AS 360-393) (SMITH *et al.* 2003). Innerhalb der sequenzspezifischen Bindedomäne finden sich 80-90% der Tumormutationen (LEVINE 1997).

Die n-terminale Transaktivierungsdomäne erlaubt p53 die Rekrutierung des Transkriptionsapparates, u.a. des TATA-Box-Bindungsproteins TBP und TBP-assoziierten Faktoren (TAF) (LU und LEVINE 1995; THUT *et al.* 1995). Mit Hilfe der Oligomerisierungs- oder Tetramerisierungsdomäne am c-terminalen Ende (AS 323-356) bildet der Tumorsuppressor p53 Tetramere als aktive Form (KRAISS *et al.* 1988; CLORE *et al.* 1994, 1995). Die Tetramerstruktur ist erforderlich für eine effektive Transaktivierung *in vivo* sowie die Wachstumsunterdrückung von Karzinomzellen (PIETENPOL *et al.* 1994). Dabei bilden 2 Proteine ein Dimer und 2 Dimere wiederum einen tetrameren Regulatorkomplex (SMITH *et al.* 2003). Abbildung 1 zeigt schematisch die Struktur von p53.

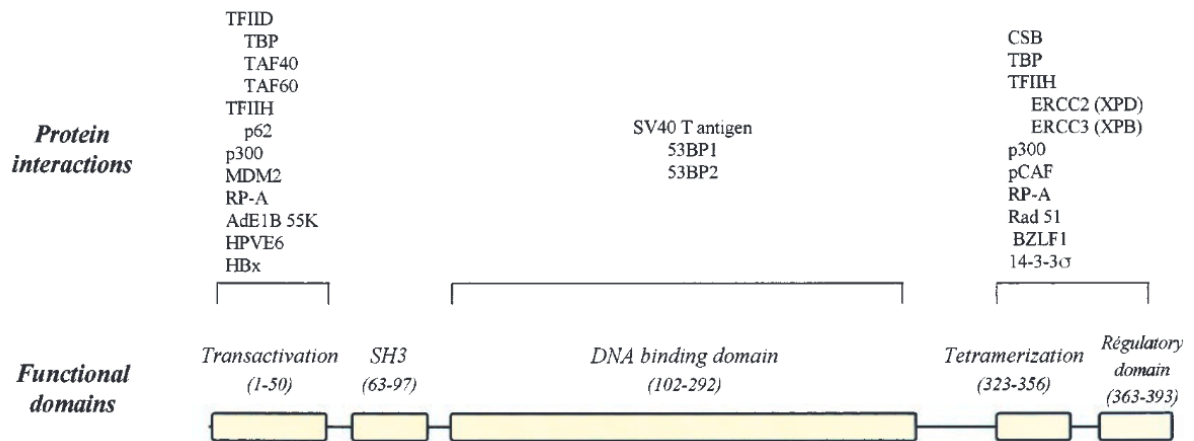


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur des p53-Proteins und seiner Interaktionspartner.

Der obere Teil der Abbildung zeigt die bislang bekannten Interaktionspartner von p53, virale und zelluläre Proteine, der untere die funktionalen Domänen an die sie innerhalb des Proteins binden (MAY und MAY 1999)

2.2 Das Kernprotein Np9

2.2.1 Retroviren

Retroviren besitzen eine reverse Transkriptase und z.T. Onkogene, daher leitet sich auch ihr Name ab: **Reverse Transkriptase Onkoviren**. Es handelt sich um behüllte Einzelstrang-RNA-Viren (MODROW *et al.*, 2002). Sie nutzen die Reverse Transkriptase um nach dem Eindringen in eine permissive Zelle ihr einzelsträngiges RNA-Genom durch reverse Transkription in doppelsträngige DNA umzuschreiben und dann als Provirus mit Hilfe der Integrase in das zelluläre Genom zu integrieren. Dieses wird daraufhin wie ein zelluläres Gen bei der Teilung der Wirtszelle vermehrt und an alle Tochterzellen weitergegeben (TEMIN, 1974). Damit wurde das bis dahin geltende zentrale Dogma der Molekularbiologie wiederlegt, welches besagt, dass der Informationsfluss immer von DNA über RNA in Protein erfolgt (CARTER und SAUNDERS 2007).

Die RNA-Polymerase der Wirtszelle transkribiert die Provirus-DNA in mRNA. Diese wird aus dem Nukleus ins Zytoplasma geschleust und dort translatiert. Die entstandenen Virusbestandteile formen mit Virus-ssRNA neue retrovirale Partikel und werden über die Zellmembran freigesetzt (CARTER und SAUNDERS 2007).

Die Retroviren werden innerhalb ihrer beiden Subfamilien Orthoretrovirinae und Spumaretrovirinae nach genetischen und morphologischen Aspekten sowie Besonderheiten während der Replikation und Infektion eingeteilt in die sieben Genera Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon-, Lenti-, und Spuma-Retroviren (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES 2004).

Retroviren haben einen Durchmesser von 80-100 nm und bestehen aus einem Kapsid, welches von einer Hüllmembran mit viralen Glycoproteinen umgeben ist. Das Kapsid enthält ein Dimer einer linearen einzelsträngigen RNA als Genom, sowie die essentiellen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease (MODROW *et al.* 2003). Das retrovirale Genom ist aufgebaut wie eukaryotische messenger-RNA (mRNA): am 3'-Ende findet sich ein Poly(A)-Schwanz und am 5'-Ende eine methylierte Kopfgruppe als Schutz vor enzymatischem

Abbau durch Endonukleasen. Proviren weisen am 5'- und am 3'-Ende long terminal repeats (LTRs) sowie 3 offene Leserahmen (open reading frames, ORFs) auf. Diese ORFs kodieren für gag (gruppenspezifisches Antigen), pol (Polymerase mit den 3 Enzymen Protease (prt), reverse Transkriptase (RT) mit RNase H/Integrase (IN)) und env (Hüllproteine) (MODROW *et al.* 2003). Aufgrund der Zugehörigkeit von HIV zu den Retroviren (BARRE-SINOUSI *et al.* 1983), gehören diese heute zu den am meisten erforschten Viren. Ein Beispiel für Retroviren aus der Veterinärmedizin ist das Gammaretrovirus FeLV, das feline Leukämievirus. Es handelt sich um ein ansteckendes Oncovirus, welches die Immunantwort des Wirtes unterdrückt (HOOVER und MULLINS, 1991; JARRETT, 1999).

2.2.2 Endogene Retroviren

Retroviren werden eingeteilt in endogene Retroviren, welche als Provirus im Wirtsgenom vorliegen und somit bei jeder Zellteilung vertikal weitergegeben werden und exogene Retroviren, die den Wirt über Viruspartikel infizieren und entsprechend auch horizontal weitergegeben werden. Vor 40 Millionen Jahren wurden retrovirale Elemente in das Genom menschlicher Vorfahren eingefügt und somit in der Population fixiert (BARBULESCU *et al.* 1999). Diese stellen die Grundlage der heutigen HERV-Sequenzen im menschlichen Genom dar. Vermutlich handelt es sich um endogene Varianten exogener Virusarten (LÖWER *et al.* 1996). Der größte Teil des Genoms endogener Retroviren ist nicht mehr replikationsfähig, weil Mutationen umso wahrscheinlicher sind, je länger deren Integration ins Genom zurückliegt. Meist sind einzig die long terminal repeats erhalten (LÖWER *et al.* 1996), welche ebenso wie bei Retroviren drei ORFs für gag, pol und env flankieren.

2.2.3 Humane endogene Retroviren

Kommt es zur Infektion einer Keimzelle durch ein Retrovirus, so wird dessen Genom entsprechend der Mendelschen Gesetze auf die Folgegeneration übertragen und ist in jeder Zelle dieses Organismus vorhanden (NELSON *et al.* 2003). Laut Daten des INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM von 2001 bestehen ca. 8% des menschlichen Genoms aus retroviralen Sequenzen. Hunde zeigen dagegen eine viel geringere Anzahl

retroviraler Transposons (26.000 erhaltene Kopien, beim Menschen sind es 183.000) (LINDBLAD-TOH *et al.* 2005).

Die meisten retroviralen Sequenzen innerhalb des menschlichen Genoms sind allerdings aufgrund zahlreicher Mutationen bereits defekt, nur eine kleine Anzahl ist noch in der Lage virale Produkte zu produzieren (NELSON *et al.* 2003). Laut zahlreicher Untersuchungen wiesen diese Partikel jedoch keine Infektiosität mehr auf (TÖNJES *et al.* 1997). Die einzige HERV-Familie welche noch in der Lage ist alle essentiellen proviralen Proteine zu kodieren ist HERV-K (HML2). Innerhalb dieser Familie findet sich das am besten erhaltene bisher bekannte Humane endogene Retrovirus, das HERV-K (HML-2.HOM). Dieses ist auf Chromosom 7 lokalisiert (MAYER *et al.* 1999). Die Einteilung humaner endogener Retroviren erfolgt innerhalb der Klassen I-III anhand ihrer tRNA-assoziierten Aminosäure, wobei das Kürzel des Ein-Buchstaben-Codes der AS hinzugefügt wird:

Klasse I besitzt eine tRNA mit Glutamat- (HERV-E), Arginin- (HERV-R), Histidin- (HERV-H) oder Tryptophan- (HERV-W) spezifischem Antikodon zur Initiation der reversen Transkription. Diese Viren zeigen eine Homologie zu den Gammaviren.

Klasse II nutzt eine Lysin-assoziierte tRNA (HERV-K). Diese HERVs werden weiter in die Gruppen HML (Human MMTV like) 1-6 unterteilt und sind homolog zum Genus Betaretrovirus.

Klasse III ist relativ heterogen und weist eine schwache Homologie zu den Spumaviren auf.

Alle bislang bekannten Humanen Endogenen Retroviren sind in der Datenbank „Human Endogenous Retroviruses Database“ (HERVd) gelistet (PACES *et al.* 2004).

Es ist inzwischen gelungen, einen Zusammenhang zwischen der Expression von HERV-K und der Entwicklung von Keimzelltumoren beim Menschen zu bestätigen (HERBST *et al.* 1996).

Keimzelltumorpatienten entwickeln Serumantikörper gegen die viralen Proteine Gag und Env, deren Gene ausschließlich in Keimzelltumoren exprimiert werden (SAUTER *et al.* 1996).

Kontrovers diskutiert wird in der Humanmedizin die Beteiligung von HERVs an der Genese von Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematosus (TALAL *et al.* 1992; BOLLER *et al.* 1993; NELSON 1995; NELSON *et al.* 1999) und psychischen Erkrankungen wie Schizophrenie (FRANK *et al.* 2005). Sie sind aber auch z.B. an der Plazentation beteiligt (PEROT *et al.* 2012).

Entsprechend den human endogenous retrovirus-like elements, den sogenannten HERV-L, finden sich auch bei anderen Säugetieren ERV-L, was vermuten lässt, dass solche bereits seit mehr als 70 Millionen Jahren existieren (siehe Abb. 3) (BÉNIT *et al.* 1999).

2.2.4 HERV-K

HERV-K bildet innerhalb der humanen endogenen Retroviren nicht nur die größte Gruppe, sondern auch die biologisch aktivste (TÖNJES *et al.* 1996). Sie findet sich nur bei Menschen und Primaten (MAYER und MEESE 2005) und ist das einzige bekannte ERV mit intaktem Leserahmen für *gag* und *env* (LÖWER *et al.* 1993; MUELLER-LANTZSCH *et al.* 1993). HERV-K besitzt eine enzymatisch aktive Protease, reverse Transkriptase und Integrase (MÜLLER-LANTZSCH *et al.* 1993). Scheinbar spielt es eine Rolle bei Entstehung von verschiedenen Tumoren des männlichen Reproduktionstraktes: beispielsweise haben Patienten mit Seminomen Antikörper gegen die Gag- und Env-Proteine von HERV-K(HML-2), welche nach erfolgreicher Therapie des Tumors jedoch wieder absinken (SAUTER *et al.* 1995, SAUTER *et al.* 1996). Ebenso werden HERV-K Transmembran- und Gag- Proteine in Melanomen und deren Metastasen exprimiert und es konnten im Serum der Patienten Antikörper gegen HERV-K nachgewiesen werden (BUESCHER *et al.* 2005). Die *env*-Region von HERV-K (HML-2.HOM) fördert möglicherweise die Entwicklung von Tumoren durch die Hemmung einer effektiven Immunantwort. HERV-K Proteine und gegen diese gerichtete Antikörper finden sich häufig bei Patienten mit Keimzelltumoren (HERBST *et al.* 1999; SAUTER *et al.* 1995), gelegentlich bei Brustkrebspatientinnen, sowie Patienten welche mit HIV- oder Zytomegalievirus infiziert sind (VOGETSEDER *et al.* 1993). Nicht oder sehr selten hingegen in gesunden Individuen.

Es werden 2 Typen von HERV-K differenziert: Typ 1 mit einer 292 bp langen Deletion im Grenzbereich zwischen *pol* und *env* und Typ 2 ohne Deletion, mit einer Gesamtlänge von etwa 9471 bp (LÖWER *et al.* 1993, 1995).

2.2.5 Das nukleäre Protein Np9

Zusätzlich zum 473 bp-Transkript, welches spezifisch für das *rec*-Transkript ist, fanden ARMBRUESTER *et al.* (2002) in drei von drei Seminomproben ein 256-bp Transkript. Genbankanalysen ergaben eine 100%ige Homologie dieses Transkriptes mit der HERV-K – *env*-Sequenz des HERV-K101, welches 1999 von BARBULESCU *et al.* veröffentlicht wurde. Dieses wurde als *np9* bezeichnet. Es kann aufgrund einer spezifischen Spleißdonorstelle

ausschließlich von HERV-K Typ 1-Proviren transkribiert werden, wie in Abbildung 2 dargestellt. Diese entsteht durch einen Nukleotidaustausch an Positionen 6495 und 6496 des HERV-K 101 von A und G in Typ 2- Viren zu T und A in Typ 1- Viren (MOUNT *et al.* 1982). Im Gegensatz dazu wird *rec* nur von Typ 2-Proviren exprimiert, da Typ 1-Proviren durch ihre 292 bp-Deletion nicht dazu in der Lage sind (LÖWER *et al.* 1993) . Bisher sind sieben HERV-K Typ 1-Sequenzen bekannt, die dem proviralen Typ 1 entsprechen und somit aufgrund ihrer 292 bp-Deletion die Möglichkeit haben, Np9 zu produzieren: HERV-K 101, 102, 103, 107/10, 105, 106 und HERV-K(II) (BARBULESCU *et al.* 1999; SUGIMOTO *et al.* 2001).

HERV-K101 type 1

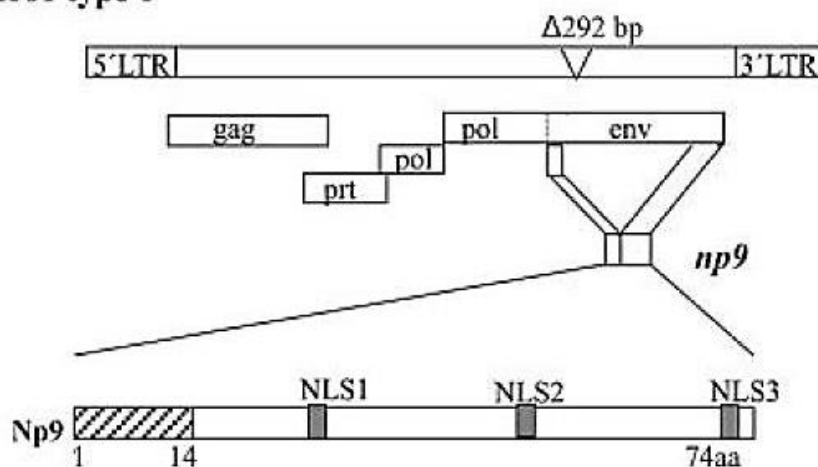


Abbildung 2: Entstehung von Np9 anhand der spezifischen Spleißdonorstelle von HERV-K 101 Typ 1.

Das *np9*-Transkript geht durch alternatives Spleißen aufgrund einer 292 bp-Deletion (Keil) innerhalb des *env*-Leserahmens von HERV-K Typ 1 hervor. Es besteht aus zwei Exons, von denen das zweite die 3 putativen Kernlokalisierungssignale NLS 1-3 beinhaltet. Die ersten 14 AS von *Rec* und *Np9* stimmen überein (gestrichelt dargestellt).

LTR: long terminal repeat; Gag: gruppenspezifisches Antigen; Prt: Protease; Pol: Polymerasen; *env*: envelope (Hüllprotein) NLS: nuclear localization signal (Kernlokalisierungssignal) (DENNE *et al.* 2007).

Aus späteren Studien ergaben sich 2 weitere Varianten der *np9*-Sequenz, welche sich von *np9 wt* in 4 Nukleotidpositionen und somit auf Proteinebene in 3 Aminosäureaustauschen unterscheiden. Diese Varianten zeigten eine 100%ige Homologie zu Proviren welche auf den Chromosomen 3q13 [HERV-KII (Chr.3q13)] (SUGIMOTO *et al.* 2001) und 22q11 [HERV-K (Chr.22q11)] lokalisiert sind. Die Translation zeigt, dass das 1. Exon von *Np9* mit den ersten 14 der 78 AS des ersten Exons von *Rec* übereinstimmt. Das zweite Exon beginnt bei Position

8118 der HERV-K101-Sequenz und enthält 178 Basenpaare kodierende Sequenz. Die COOH-terminalen 59 AS von Np9 leiten sich vom 3. Leserahmen ab, der weder für Env noch Rec kodiert. Das daraus abgeleitete Protein hat eine Größe von 74 AS und ein prädictiertes Molekulargewicht von 8,7 kDa (ARMBRUESTER *et al.* 2002). Durch Sequenzanalysen konnten innerhalb des 2. Exons 3 putative Kernlokalisierungssignale (NLS, Nuclear Localization Signal) identifiziert und Np9 durch Fluoreszenz-basierte Zelllokalisationsassays tatsächlich im Kern nachgewiesen werden. NLS1 ist verantwortlich für die nukleäre Lokalisation von Np9, während NLS3 es in subnukleäre Kompartimente dirigiert (ARMBRUESTER *et al.* 2004).

Anhand der Mutationsrate der nicht kodierenden LTR-Sequenzen können Altersbestimmungen endogener retroviraler Sequenzen vorgenommen werden. Dabei zeigt sich, dass sich HERV-K Typ 1 vor etwa 6 Millionen Jahren in das Genom von Altweltprimaten integrierten, als die Abspaltung von Schimpansen und Menschen stattfand. Folglich findet sich *np9* nur im Genom der Letztgenannten. Abbildung 3 zeigt die Insertionszeiten einiger HERV-Familien in das Genom der menschlichen Vorfahren, Primaten und Affen.

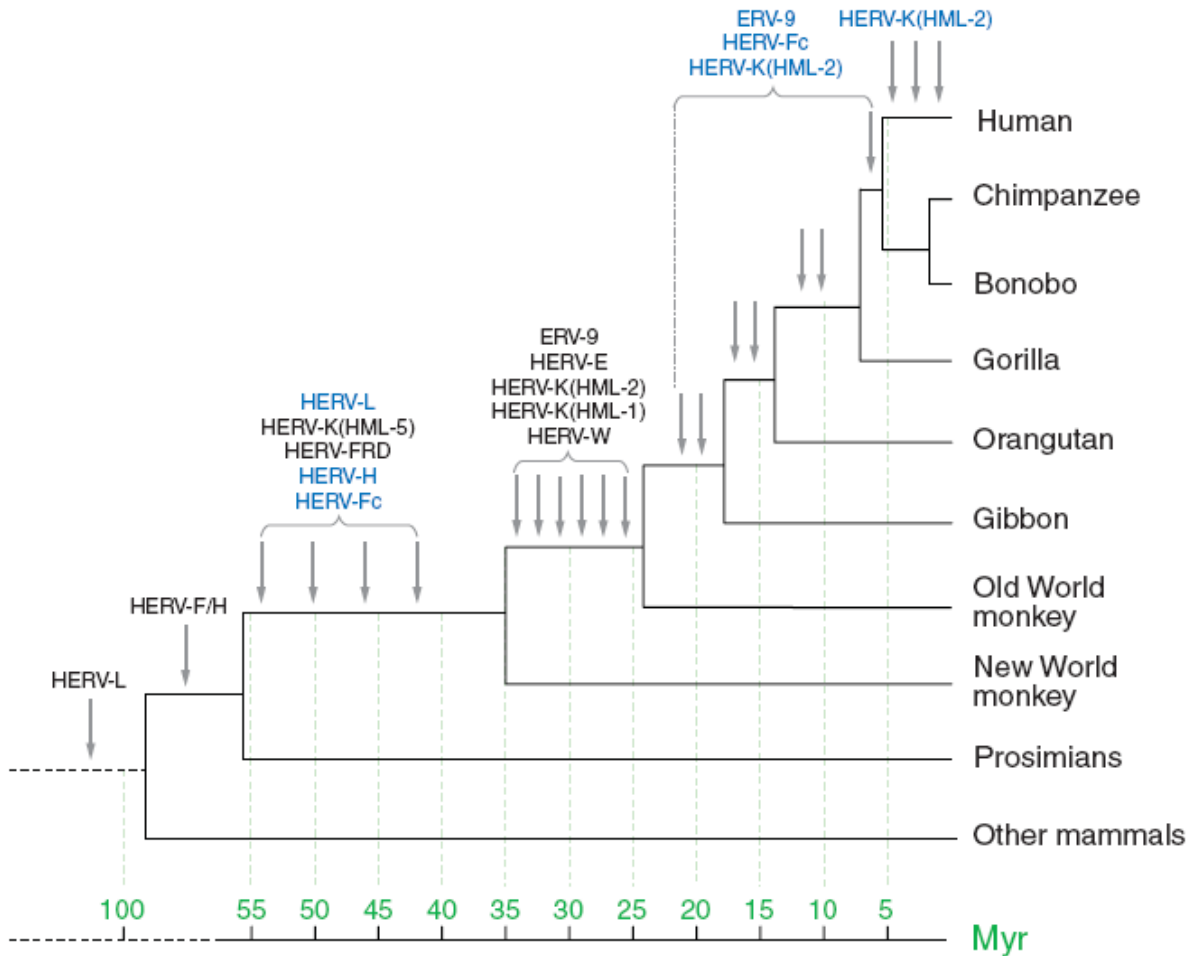


Abbildung 3: Insertionszeiten unterschiedlicher HERV-Familien in das Genom von menschlichen Vorfahren, Primaten und Affen.

Grün auf der Zeitskala dargestellt ist der Zeitpunkt der Insertion vor Jahrillionen (BANNERT und KURTH 2006).

Durch RT-PCR-Analyse haben ARMBRUESTER *et al.* (2002) Zellen von Menschen und Primaten auf die Expression von *np9* sowie parallel *gag* und *rec* getestet. Dabei wurden außer gesunden Zellen auch transformierte Zellen und unterschiedliche Tumorgewebe untersucht. Daraus resultierte folgendes Ergebnis:

np9 wurde in 90% der transformierten Zelllinien nachgewiesen (ebenso wie *gag*, *rec* dagegen nur in 13%). Außerdem wurde *np9* in insgesamt 45% der Tumorgewebe entdeckt, darunter in 52% der Mammakarzinome, 37% der Keimzelltumore und 33% der leukämischen Lymphozyten. Hingegen war *np9* in keinem der beiden untersuchten Ovarialkarzinomen nachweisbar. Obwohl *rec* in Keimzelltumoren ebenso häufig gefunden wurde wie *np9*, war dieses in Mammakarzinomen deutlich gehäuft vertreten. Keines der gesunden Gewebe (Lymphozyten, Fibroblasten, Proben aus Darm, Plazenta und Magen) exprimierte *np9* oder

rec in nachweisbarer Menge, während *gag* dort in 80% der Proben nachgewiesen werden konnte. Daraus folgt, dass *np9* möglicherweise in engerem Zusammenhang mit der Transformation steht als *rec* und somit als Marker dafür dienen kann. Der Proteinnachweis von Np9 gelang hingegen vorerst in keiner der untersuchten Proben, er wurde erst unter Einwirkung des Proteasomenblockers MG132 möglich (ARMBRUESTER *et al.* 2004).

2004 zeigten ARMBRUESTER *et al.* eine Interaktion von Np9 mit der Ring-Typ E3-Ubiquitin-Ligase LNX (ligand of numb protein x), sowie die Regulation der Np9-Expression über LNX/Numb/Notch-Signalweg. Die Ubiquitinligase LNX markiert Np9 für den proteasomalen Abbau und reguliert somit dessen Proteinlevel in der Zelle. Np9 wiederum ist in der Lage LNX mit Hilfe seiner c-terminalen Domäne in die Nukleoli zu ziehen.

Obwohl sie nicht direkt miteinander interagieren können, kommt es durch eine Überexpression von Numb zu einer Stabilisierung von Np9 (ARMBRUESTER *et al.* 2004), was darauf schließen lässt, dass Np9 und Numb um die Bindung an den Liganden LNX konkurrieren.

Rec, das 15 kDa-Protein welches aus dem COOH-terminalen offenen Leserahmen innerhalb des *env*-Gens von HERV-K Typ 2 translatiert wird, kann mit seinen AS 21-87 mit dem promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF) interagieren (BOESE *et al.* 2000). PLZF seinerseits ist beteiligt an der Entstehung von Leukämie beim Menschen sowie der Spermatogenese von Mäusen. Eine Unterbrechung der Spermatogenese durch eine Funktionseinschränkung von PLZF mag die Entstehungsgrundlage von Keimzelltumoren sein (HEIMDAL *et al.* 1997). Np9 ist ebenfalls in der Lage, an PLZF zu binden. Dabei kommt es zu einer Assoziation der AS 23-29 von Np9 mit den letzten 4 Zinkfingern von PLZF (DENNE *et al.* 2007). GROSS *et al.* konnten 2011 zeigen, dass Np9 an das Epstein-Barr-Virus Nuclear Antigen 2 (EBNA-2) bindet und dessen Aktivität herunterreguliert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
³⁵ S	MP Biomedicals
³² P	MP Biomedicals
Acrylamid 30%	Roth
Agar	Becton, Dickinson and Company
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Ratiopharm
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Bisacrylamid 2% und 0,8%	Roth
Bromphenolblau	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Gluthation Sepharose	GE Healthcare
Glycerin	Roth
Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company
Immobilon-P Membran	Millipore
Isopropanol	Hedinger
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Klenow-Fragment	Thermo-Scientific

Material und Methoden

Magermilchpulver	Hochwald
Methanol	VWR
Nanofectin I	PAA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
Nukleotide (dNTP's)	Roche
Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Pierce ECL Westernblotting Substrate	Thermo-Scientific
Poly dl-dC	Thermo-Scientific
Serva Blue R (Coomassie)	Serva
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Tetraethylmethylen-diamin (TEMED)	Thermo-Scientific
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan 1,3-diol)	AppliChem
Tris Base	Roth
Trypton	Becton, Dickinson and Company
Yeast-Extrakt	Becton, Dickinson and Company
Whatman Zellulosefilter	Schleicher und Schuell
β -Mercaptoethanol	Merck

3.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer	Lösungen
Ampicillin	Ampicillin-Pulver in 10 ml sterilem H ₂ O dest lösen
Aprotinin	1mg/ml gelöst in H ₂ O dest
Blaumarker für SDS-Gelelektrophorese	Destilliertes Wasser Bromphenolblau
Coomassie- Entfärberlösung	10 % Isopropanol 10 % Essigsäure in H ₂ O dest
Coomassie-Färbelösung	25 % Isopropanol 10 % Essigsäure 0,02 % Coomassie in H ₂ O dest
Dithiothreitol (DTT)	1 M in H ₂ O dest
Ethidiumbromid- Färbelösung	100 µl der 10 mg/ml Ethidiumbromid Stammlösung ad 1000 ml H ₂ O dest
GST-Kopplungspuffer high salt	50 mM Tris 500 mM NaCl 0,8 mM EDTA 0,1 % NP40 in H ₂ O dest frisch zugeben: 1 mM PMSF (v/v) 10 µg / ml Aprotinin (w/v)

Material und Methoden

GST-Kopplungspuffer low salt	<p>50 mM Tris 200 mM NaCl 0,8 mM EDTA 0,1 % NP40 in H₂O dest</p> <p>frisch zugeben: 1 mM PMSF (v/v) 10 µg / ml Aprotinin (w/v)</p>
Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid (IPTG)	<p>1M IPTG ad 10 ml H₂O dest.</p>
10x Klenow-Puffer	<p>500 mM Tris-HCl (pH 8,0 at 25°C) 50 mM MgCl₂ 10 mM DTT</p>
Lysispuffer für GST-Pulldown	<p>20 mM Tris 200 mM NaCl 1 mM EDTA in H₂O dest</p> <p>frisch zugeben: 1 mM PMSF (v/v) 10 µg / ml Aprotinin (w/v) 1 mg / ml Lysozym (w/v)</p>
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	<p>0,5 M PMSF gelöst in Ethanol</p>
Stripping-Buffer	<p>62,5 mM Tris pH 6,6 100 mM β-Mercaptoethanol 2 % SDS</p>

Material und Methoden

TE Buffer	10 mM Tris mit HCl auf pH8,0 1 mM EDTA
10x TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA ad 1000 ml mit Aqua dest.
10x EMSA Binding Buffer	100 mM Tris 500 mM KCl 10 mM DTT pH 7,5 bei -20°C lagern
5x EMSA Loading Buffer	15 % Ficoll 400 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol ad 10 ml mit 1x TBE bei -20°C lagern
0,5 M EDTA	372,2 g EDTA in 1,5 l H ₂ O dest 40 g NaOH-Pellets
1 M Tris pH 6,8	121,4 g in 500 ml H ₂ O dest lösen auf pH 6,8 einstellen
1 M Tris pH 8,8	121,4 g in 500 ml H ₂ O dest lösen auf pH 8,8 einstellen
1x SDS-Ladepuffer für Proteinextrakte	50 % 2x SDS-Ladepuffer für Proteinextrakte 10 % DTT in H ₂ O dest immer frisch ansetzen
2x SDS-Ladepuffer für Proteinextrakte (Lämmli-Puffer)	20 % Glycerol 4 % SDS 100 mM Tris pH 6,8 ad 50 ml mit H ₂ O dest

Material und Methoden

5x Ladepuffer für DNA-Agarosegele	50 % Glycerin 0,05 M EDTA Bromphenolblau
10x SDS-Ladepuffer	0,025 M Tris 0,2 M Glycin 0,1 % SDS ad 1l mit H ₂ O dest
10x Western-Transferpuffer	0,025 M Tris 1,92 M Glycin 20 % Methanol
20x PBS	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O 3 M NaCl
50x TAE	2 M Tris pH 8,0 1 M Eisessig 0,05 M EDTA ad 1l H ₂ O dest

3.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper, deren Hersteller und die in den Experimenten eingesetzte Verdünnung

Primäre Antikörper		Verdünnung	Hersteller
Anti-Np9	Polyklonaler Antikörper, Kaninchenserum	1:100	Institut für Virologie, Universitätsklinikum Homburg
Anti-GST	Monoklonaler Antikörper, Maus IgG 2b, Klon GST-2	1:2.000	Sigma-Aldrich
Anti-p53, Klon DO-1	Monoklonaler Antikörper, Maus IgG	1:2.000	Calbiochem
PAb421	Monoklonaler p53-Antikörper, Maus, IgG	unbekannt	Institut für Biochemie, Universitätsklinikum Homburg, AG Montenarh

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper, deren Hersteller und die in den Experimenten eingesetzte Verdünnung

Sekundärantikörper		Verdünnung	Hersteller
Anti-Rabbit	IgG, peroxidasegekoppelt (ganzes Molekül)	1:2.000	Sigma-Aldrich
Anti-Mouse	IgG, peroxidasegekoppelt (Fc-spezifisch)	1:2.000	Sigma-Aldrich

3.1.4 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden anhand des Fermentas Double Digest Tool bestimmt

Tabelle 5: Verwendete Restriktionsendonukleasen

Enzym	Konzentration	Hersteller
<i>Bam</i> HI	10 U/μl	Fermentas
<i>Dra</i> II / <i>Eco</i> 0109i	10 U/μl	Fermentas
<i>Eco</i> R I	10 U/μl	Fermentas
<i>Eco</i> R V	10 U/μl	Fermentas
<i>Xho</i> I	10 U/μl	Fermentas

Tabelle 6: Weitere verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
CiAP	Promega
T4-DNA-Ligase	Fermentas
TNT RNA Polymerase	Promega

3.1.5 Reaktionskits

Tabelle 7: Verwendete Reaktionskits und deren Hersteller

Reaktionskit	Hersteller
Nucleospin Gel and PCR Clean Up	Macherey-Nagel
Nucleobond PC 100	Macherey-Nagel
Nanofectin Kit	PAA
TNT T7 SP6 coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
LightShift™ EMSA Optimization und Control Kit	Thermo scientific
Illustra MicroSpin G-50 Columns	GE Healthcare

3.1.6 Bakterienstämme

Es wurden 2 verschiedene *Escherichia Coli* Stämme verwendet:

- DH5α diente der Vermehrung der Plasmidkonstrukte, zur Selektion wurde die Ampicillinresistenz genutzt
- BL21 diente der induzierbaren Proteinsynthese

3.1.7 Kulturmedien

LB-Medium: 10g Trypton
 10g Natriumchlorid
 5g Hefeextrakt
 ad 1l destilliertes Wasser und autoklavieren
 vor dem Einsatz Zusatz von 1:1.000 Ampicillin

Zur Herstellung der LB-Agar-Platten wurden dem oben genannten Ansatz noch 15g Agar sowie ebenfalls 1:1.000 Ampicillin zugefügt.

3.1.8 Oligonukleotide für EMSA

p53-BS 1.1. 5' GATCCAGACATGCCTAGACATGCCTAG 3'
p53-BS 2 5' AATTCCTAGGCATGTCTAGGCATGTCTGGATC 3'

3.1.9 Größenstandards

3.1.9.1 Größenstandards für Agarosegele

Zur Größenbestimmung eines mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennten DNA-Stückes wurde der GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder der Firma Fermentas verwendet.

Dieser enthält folgende Fragmentgrößen: 75 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 700 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp, 4000 bp, 5000 bp, 7000 bp, 10.000 bp, 20.000 bp.

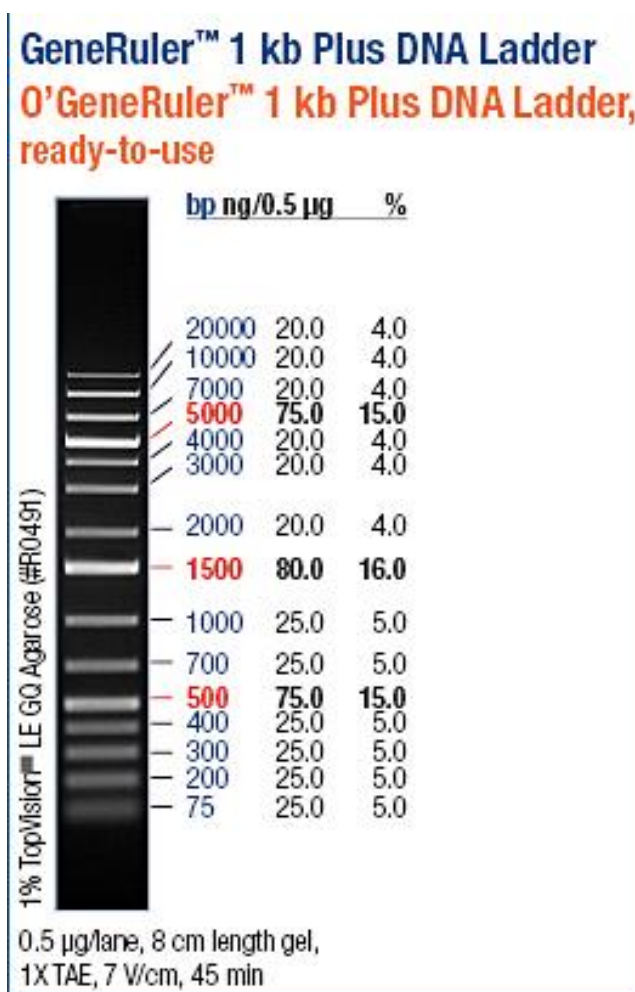


Abbildung 4: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder von Fermentas (Quelle: Thermo scientific)

3.1.9.2 Größenstandards für SDS-Gele und Westernblot

Zur Größenbestimmung von Proteinen wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas verwendet.

Dieser ist ein Mix aus zehn blau-, rot-, und grün-gefärbten rekombinanten prokaryontischen Proteinen. Er enthält folgende Fragmentgrößen: 10 kDa, 15 kDa, 25 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 55 kDa, 70 kDa, 100 kDa, 130 kDa, 170 kDa.

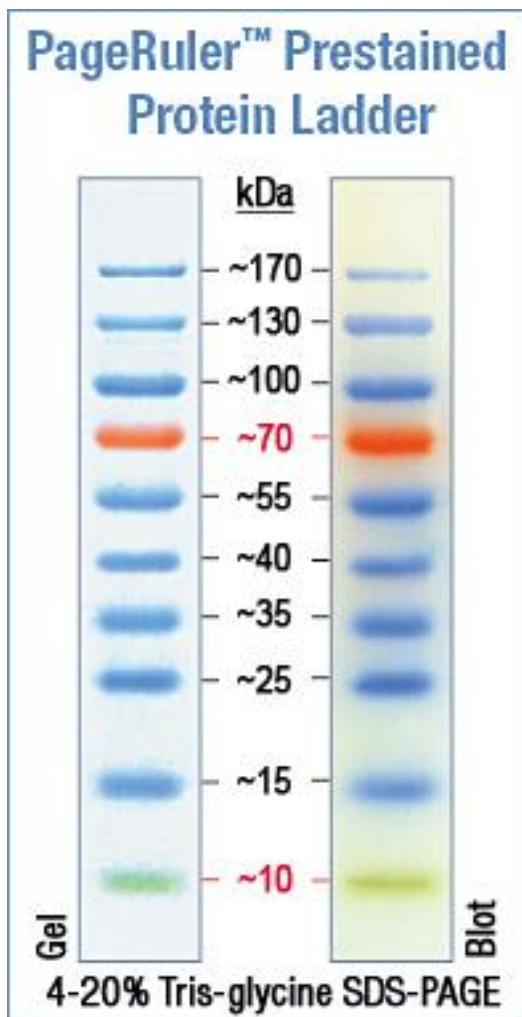


Abbildung 5: PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas (Quelle: Thermo scientific)

3.1.10 Plasmide

3.1.10.1 pGEX-4T1

Abbildung 6 zeigt den pGEX-4T1 Vektor. Er verfügt über einen prokaryotischen, durch IPTG induzierbaren Promotor und wurde zur Expression von GST-Fusionsproteinen genutzt.

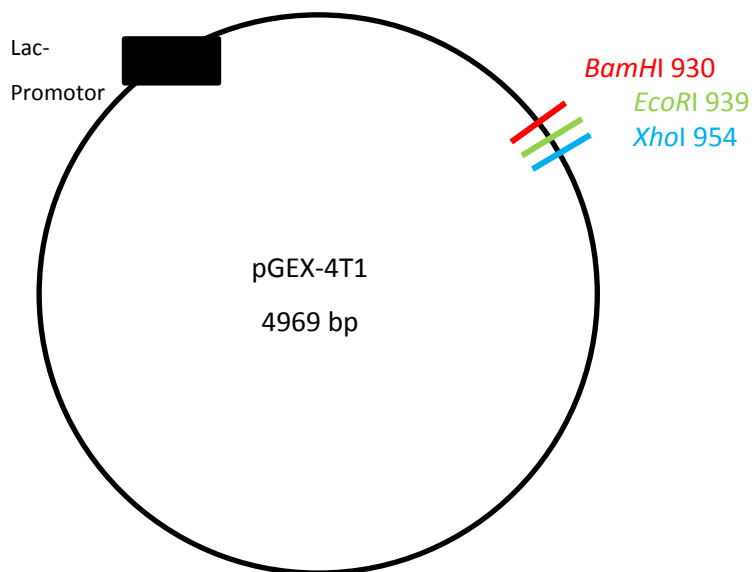


Abbildung 6: Vektor pGEX-4T1 von Amersham

Tabelle 8 zeigt die in den Vektor pGEX-4T1 einklonierten Fragmente (bereits vorhanden) und die für die Klonierung eingesetzten Restriktionsenzyme.

Tabelle 8: Einklonierte Fragmente in den Vektor pGEX-4T1

Fragment	Schnittstelle	Aminosäuren
pGEX p53 fl	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>	1-393
pGEX p53 1-101	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	1-101
pGEX p53 102-292	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	102-292
pGEX p53 293-393	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	293-393
pGEX Np9	<i>BamHI</i>	1-74
pGEX Np9 NΔS (N-Term)	<i>BamHI</i>	1-36
pGEX Np9 ΔC (N-Term und Zentrum)	<i>BamHI</i>	1-64
pGEX Np9 C-Term	<i>BamHI</i> / <i>XhoI</i>	36-74

3.1.10.2 pcDNA 3.1 (+) Neo

Abbildung 7 zeigt den Vektor pcDNA 3.1. (+) Neo. Es handelt sich um einen eukaryotischen Expressionsvektor, der über einen Cytomegalievirus-Promotor verfügt. Er wurde zur Klonierung genutzt. Dafür wurde mittels *Bam*HI Np9 einkloniert, um so den Vektor pcDNA 3.1. (+) Neo - Np9 zu erhalten.

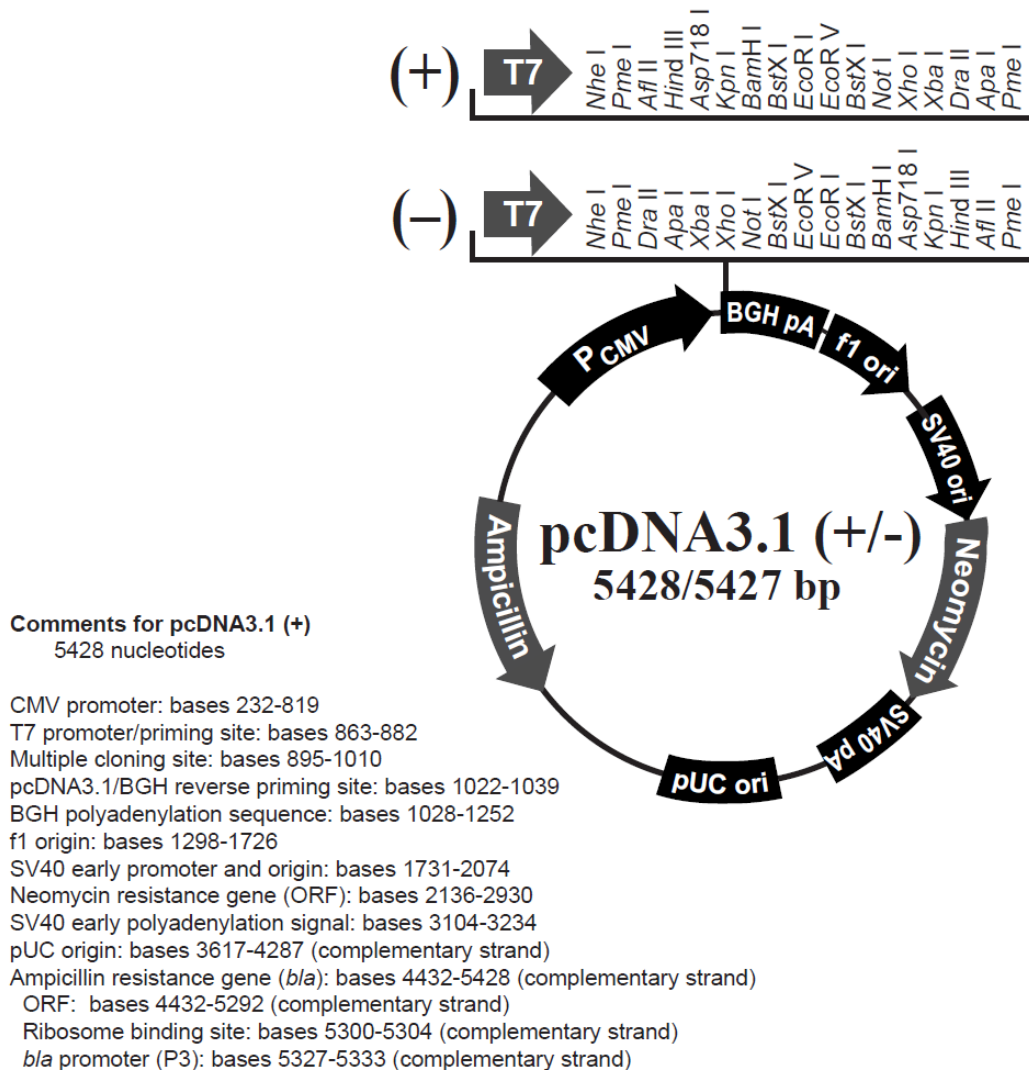


Abbildung 7: pcDNA 3.1 von Invitrogen (Quelle: invitrogen.com)

3.2 Methoden

3.2.1 Nukleinsäuretechniken

3.2.1.1 Plasmidpräparation

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wird das Kit Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi der Firma Macherey- Nagel verwendet.

Dafür wird eine 200 ml-Kultur plasmidhaltiger Bakterien 30 Minuten lang bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das erhaltene Bakterienpellet wird dann in 8 ml des Resuspensionspuffers resuspendiert. Dazu werden 8 ml des Lysispuffers gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen erfolgen der Aufbau und die Äquilibration von Säule und Filter über einem neuen Falkon. Dafür werden 12 ml des Äquilibrationpuffers kreisförmig über den Filter pipettiert. Dann werden 8 ml des gekühlten Neutralisationspuffers zu dem Plasmidgemisch gegeben und das entstandene Lysat nach dreimaligem, vorsichtigem Schwenken nach und nach in den Säulenfilter gefüllt. Nachdem die ganze Lösung durchgelaufen ist, wird der Filter mit 5 ml Äquilibrationpuffer gewaschen und dann entnommen. Dann wäscht man die Säule mit 8 ml des Waschpuffers. Der gesamte Durchfluss wird verworfen und die Säule auf ein frisches Falkon gestellt. Dann erfolgt die Elution mit 5 ml Elutionspuffer, wobei an die Säulenmatrix gebundene DNA herausgespült wird. Das Eluat wird mit 3,5 ml Isopropanol gefällt und 1 Stunde bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird verworfen und das Plasmidpellet getrocknet. Dann kann es in einer entsprechenden Menge destillierten Wassers resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt werden.

3.2.1.2 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop

Mit dem NanoDrop-Gerät können Konzentration und Reinheit der zuvor aufgereinigten DNA bestimmt werden. Dafür werden 2 µl Lösung bei Wellenlängen von 260 nm (Absorptionsmaximum der DNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren) untersucht und aus den Messergebnissen der Quotient ermittelt. Liegt dieser

unter 1,8 ist eine Verunreinigung mit Protein zu erwarten. Die DNA-Lösung wird nach dem Messen mit destilliertem Wasser auf einen Gehalt von 1 µg/µl eingestellt.

3.2.1.3 Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau werden die zuvor aufgereinigten Plasmide mit Hilfe von entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Hierbei wird überprüft, ob der Vektor das korrekte Insert enthält. Üblicherweise wird 1 µg der Plasmid-DNA beim Temperaturoptimum des Enzyms 1 h lang mit dem benötigten Enzym und einem passenden Puffer inkubiert und danach auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.2.1.4 Agarose- Gelelektrophorese

Bei dieser Form der Elektrophorese werden DNA-Stücke unterschiedlicher Länge entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die aufgrund der Phosphatgruppe im Rückgrat negativ geladene DNA wandert in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Das Agarosegel dient dabei als engmaschiger Filter, wodurch kleinere Fragmente schneller hindurchwandern als größere. Je kleiner die zu detektierende DNA-Fragmente, desto höher prozentig sollte das Agarosegel sein.

Die zu untersuchenden Nukleinsäureproben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem Probenpuffer versetzt. Dieser färbt sie an und führt durch das enthaltene Glycerin zu einem Absinken der DNA in die Geltaschen. Zudem wird auf jedes Gel ein Größenstandard aufgetragen, in unserem Fall der 1kb+ Plus Ladder von Fermentas. Dann wird die Probe bei 120 V aufgetrennt, die Dauer des Laufs richtet sich dabei nach der Fragmentlänge.

Zur Darstellung der DNA enthält das Gel Ethidiumbromid. Dieses interkaliert mit den Nukleinsäuren und fluoresziert bei Anregung durch ultraviolettes Licht. Somit kann die Position der DNA im Agarosegel mittels UV-Strahlung sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3.2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA kann das gesuchte Fragment auf einem UV-Tisch detektiert und aus dem Gel ausgeschnitten werden. Es wird in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Dann kann die DNA mit Hilfe des NucleoSpin-Kits der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerprotokoll isoliert werden.

3.2.1.6 Analytische Plasmid-DNA-Präparation nach der Tens-Methode

Die Präparation nach der Tens-Methode dient der Isolation von Plasmiden aus Bakterien. Es wird allerdings nur eine relativ geringe Menge nicht sehr reiner DNA gewonnen, die Methode wird also bevorzugt zur Überprüfung der Qualität der Klonierung genutzt.

Es werden 1,5 ml einer 12 h-Kultur 10 Minuten bei 5.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird im Restmedium resuspendiert. Dann werden erst 300 µl Tens-Puffer und anschließend 150 µl 3M Natriumacetat zugefügt und die Mischung mehrmals vorsichtig invertiert. Die Lösung wird erneut 4 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, wobei die DNA von den Zelltrümmern getrennt, und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wird. Zur Fällung der DNA werden 800 µl eiskaltes Ethanol zugegeben, invertiert und abschließend 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das gewonnene Plasmidpellet erst getrocknet und dann in 50 µl TE mit RNase aufgenommen.

3.2.1.7 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen werden zur Spaltung von DNA, beispielsweise für Klonierungen, eingesetzt. Sie erkennen palindromische Sequenzen und schneiden die DNA gezielt an diesen Stellen.

Die Puffer- und Temperaturbedingungen variieren dabei je nach Restriktionsenzym und die einzusetzende Enzymmenge je nach Enzymaktivität; beträgt jedoch aufgrund des hohen Glycerin-Gehaltes der Enzymlösung üblicherweise 1/10 des Reaktionsansatzes.

3.2.1.8 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Dephosphorylierung der DNA-Enden von zuvor mit Restriktionsendonukleasen linearisierter DNA dient dazu, die Religation der Doppelstränge zu verhindern.

Dafür wird die an den 5'-Ende befindliche Phosphatgruppe der DNA durch einstündige Inkubation mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm („calf intestinal phosphatase“ = CIP, von Roche) bei 37°C abgespalten. Nun könnte eine Rezirkularisierung nur noch mit einem phosphorylierten Insert erfolgen.

3.2.1.9 Ligation von DNA- Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten zu einer doppelsträngigen DNA erfolgt mit Hilfe der T4-DNA-Ligase.

Dafür müssen die beiden Enden der zu verknüpfenden DNA-Fragmente kompatibel sein. Dann werden die Enden der Nukleinsäuremoleküle verknüpft, indem Phosphodiesterbindungen zwischen einem 3'-Hydroxy- und einem 5'-Phosphatende ausgebildet werden.

Die Ligation des dephosphorylierten Vektors mit dem dreifachen Überschuss an Insert-DNA erfolgt durch zweistündige Inkubation mit Ligase bei Raumtemperatur. Es werden ebenfalls eine Positivkontrolle (nicht dephosphorylierter Vektor ohne Insert) und eine Negativkontrolle (dephosphorylierter Vektor ohne Insert) angesetzt. Mit der Hälfte von jedem Ligationsansatz können nun kompetente *E. coli* DH5α transformiert werden.

3.2.2 Protein-Methoden

3.2.2.1 Induktion der Proteinsynthese

Für die gezielte Induktion der Expression von Proteinen wird ein induzierbarer Promotor in Kombination mit IPTG verwendet. IPTG ist der Allolactose sehr ähnlich und kann somit an den lac-Repressor binden, der daraufhin den Promotor freigibt. Dann kann das Gen abgelesen und das Protein synthetisiert werden.

Dafür werden zunächst *E.coli* BL21 transformiert, in 20 ml LB-Medium mit Ampicillin überimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag werden

3 ml der gut gewachsenen Vorkultur in 100 ml vorgewärmtes LB-Amp-Medium überführt und erneut bei 37°C für 1,5 h inkubiert. Dann wird die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Liegt diese zwischen 0,6 und 0,8, werden 5 ml als t_0 -Wert entnommen und der restlichen Kultur IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben, um die Proteinsynthese zu induzieren. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 4 h bei 37°C wird erneut die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gemessen und 5ml der Kultur als t_4 -Probe entnommen. Nun werden die Restkultur sowie die t_0 - und t_4 -Probe bei 4°C 30 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets können bei -70°C gelagert werden. Die t_0 - und t_4 -Proben werden in aufgekochtem SDS-Ladepuffer resuspendiert und weitere 10 min bei 100°C gekocht. Dabei errechnet sich die Menge an benötigtem Puffer anhand der Formel:

$$V_{\text{Puffer}} \text{ in } \mu\text{l} = OD_{600} \cdot 20 \cdot 5 \cdot 2$$

Die Proben werden anschließend bei 4°C 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Nachweis der Induktion werden dann 15 μl von dem gewonnen Proteinextrakt zusammen mit 5 μl Blaumarker auf ein SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt.

3.2.2.2 SDS-Gele

SDS-Gele werden eingesetzt, um denaturierte Proteine entsprechend ihrer Masse aufzutrennen. Das im Gel enthaltene SDS überdeckt als anionisches Tensid die Eigenladung der Proteine, um so eine Auftrennung nach der Ladung zu verhindern.

SDS-Gele werden aus einem Acrylamid-/Bisacrylamid-Gemisch unterschiedlichen Verhältnisses hergestellt, wodurch Gele verschiedener Konzentration entstehen. Um die beiden Stoffe zu einem Polymer zu vernetzen, wird TEMED als Katalysator und APS als Radikalbildner zugegeben. Dann wird das noch flüssige Gel zwischen zwei gereinigte Glasplatten gegossen. Diese haben durch sogenannte „Spacer“ einen Abstand von 1 mm, was der Dicke des auspolymerisierten Gels entspricht. Es wird erst das Trenngel gegossen und mit destilliertem Wasser übergossen. Nachdem es erhärtet ist, wird das Wasser abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. In dieses wird dann ein Kamm gesteckt, um die Geltaschen zu bilden.

Tabelle 9: Rezepte zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel				Sammelgel
	8%	10%	12%	13%	5%
1M Tris pH 6,8	-	-	-	-	750 µl
1 M Tris pH 8,8	4,5 ml	6 ml	6 ml	12 ml	-
30% Acrylamid	3,2 ml	5,3 ml	7,4 ml	16 ml	1 ml
2% Bisacrylamid	1,28 ml	2,12 ml	2,96 ml	6,4 ml	400 µl
10% SDS	240 µl	320 µl	320 µl	640 µl	120 µl
H ₂ O dest	2,72 ml	2,26 ml	1,7 ml	-	3,67 ml
APS	50 µl	140 µl	140 µl	280 µl	50 µl
TEMED	10 µl	14 µl	14 µl	28 µl	10 µl

3.2.2.3 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis)

Mittels SDS-PAGE können Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die mit SDS-Ladepuffer behandelten Proteinproben sind durch das anionische Peptid SDS konstant negativ geladen und liegen durch das Aufkochen im Zuge der Proteinextraktion denaturiert vor. Somit werden sie nur ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Das SDS-Gel wird mit Hilfe von Klemmen in der Elektrophoresekammer fixiert und mit 1x SDS-Laufpuffer bedeckt. Dann werden am unteren Rand des Gels befindliche Luftblasen mit Hilfe einer Kanüle ausgespült, sowie mit einer Hamilton-Pipette die Geltaschen von eventuellen Gelresten und Luftblasen befreit, um einen gleichmäßigen Stromfluss zu ermöglichen. Die aufgekochten und mit Blaumarker versetzten Proteinproben werden nun vorsichtig mit einer Hamilton-Pipette in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wird in die erste Tasche ein Größenstandard pipettiert, in diesem Falle der PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas. Am oberen Ende des Gels wird die Anode und am unteren Ende die Kathode angeschlossen, wodurch die negativ geladenen Proteine durch das Gel nach unten wandern. Solange sie sich im Sammelgel befinden, wird eine Spannung von 120 V angelegt, diese wird dann, sobald die Proteine das Trenngel erreicht haben, auf 200 V erhöht. Die Lauffront der Proben kann anhand des Blaumarkers abgeschätzt werden.

3.2.2.4 Westernblot

Der Westernblot dient dazu, auf dem SDS-Gel befindliche, aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran zu übertragen und dort zu fixieren, um sie anschließend mittels spezifischer Antikörper nachweisen zu können. Verwendet wurde die Trägermembran Immobilon P von Millipore.

Die Membran wird auf die benötigte Größe zugeschnitten und für mindestens 10 Minuten in Methanol aktiviert. Das fertige SDS-Gel mit den Proteinen wird aus der Elektrophoresekammer genommen, die Membran daraufgelegt und mit 2 Blättern Whatman-Papier bedeckt. In ein Blotgitter wird nun ein angefeuchteter Schwamm gelegt, darauf 2 weitere Blätter Whatman-Papier, das Gel mit Membran und Papier sowie ein zweiter Schwamm. Dann wird das Gitter geschlossen und mit der Membran in Richtung Kathode in eine mit 1x Western-Transferpuffer gefüllte Blotkammer gestellt. An der Vorderseite der Kammer befindet sich die Kathode, an der Rückseite die Anode, d.h. die negativ geladenen Proteine wandern aus dem Gel in die Membran. Der Blottingvorgang erfolgt bei 380 mA. Die Dauer beträgt in der Regel 3-5 h, ist allerdings von der Konzentration des Gels und der Größe der Proteine abhängig: je höher konzentriert das SDS-Gel und je größer das Protein, desto länger wird geblottet. Die Membran wird dann entnommen und getrocknet. Anschließend wird sie für mindestens 10 Minuten in Methanol inkubiert und 3x für je 10 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Dann erfolgt das Blocken der Membran mit 10%iger Magermilch für 30 Minuten. Dabei werden nicht besetzte Bindungsstellen mit Protein gesättigt, um so unspezifische Signale durch Bindung der Antikörper auf der Membran zu vermeiden. Nun wird die Membran über Nacht mit dem gegen das gesuchte Protein gerichteten Primärantikörper (verdünnt in Magermilch) bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wird ungebundener Primärantikörper in 3 Waschschrritten mit PBS entfernt und die Membran mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper für weitere 2h bei 4°C inkubiert. An diesen ist eine Peroxidase gekoppelt. Nach abschließendem dreimaligem Waschen mit PBS kann nun der Protein-Antikörper-Komplex mittels ECL Substrate von Pierce detektiert werden.

3.2.2.5 Strippen der Membran

Das sogenannte „Strippen“ dient der Entfernung von gebundenen Antikörpern von der Membran, wenn diese mit einem weiteren Antikörper behandelt werden muss. Dabei wird die Membran für 30 Minuten bei 55°C mit Stripping-Puffer im Wasserbad inkubiert und anschließend 3x für je 10 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Dann wird sie wieder in 10%iger Magermilch geblockt und kann mit dem neuen Antikörper behandelt werden.

3.2.2.6 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung dient der Blaufärbung und damit Sichtbarmachung von Proteinen in SDS-Gelen. Der verwendete Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau lagert sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren an und färbt dadurch die Proteine blau.

Das Gel wird für 2 Stunden in der Coomassie-Färbelösung angefärbt und dann über Nacht mittels Entfärberlösung entfärbt. Am nächsten Tag sind die Proteinbanden sichtbar. Es wird dann zur Konservierung auf ein Whatman-Papier gelegt und 2 Stunden lang im Gelrockner getrocknet.

3.2.2.7 Co-Immunopräzipitation (erhaltene Dienstleistung)

Die Co-Immunopräzipitation (kurz: Co-IP) dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen.

Es wird die Tatsache genutzt, dass die konstanten Abschnitte von Antikörpern eine hohe Affinität zur Protein-G-Sepharose besitzen. Das Protein G der Sepharose stammt vom *Staphylococcus aureus* und bindet den Fc-Teil des Antikörpers. Dadurch ist es möglich, durch Zugabe der Protein-G-Sepharose, aus Zellextrakten welche mit entsprechenden spezifischen Antikörpern inkubiert wurden, entstandene Immunkomplexe zu präzipitieren. Somit können nicht nur die an den Antikörper gebundenen Proteine detektiert werden, sondern auch deren Interaktionspartner. 24 h nach der Transfektion werden die Zellen abgeschabt, kurz abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 800 µl mit Protease-Inhibitoren supplementierten RIPA-Puffer aufgenommen. Dann wird der Ansatz für 60 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert.

Zwischenzeitlich werden die Sepharosebeads 3-5x in mit einem Volumen 1x PBS gewaschen und dann 1:1 in PBS aufgenommen. Anschließend werden 100 µl-Aliquots der Beads je 4 µg des Antikörpers zugegeben und für 45 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert, damit eine Bindung des Antikörpers an die G Sepharose erfolgen kann. Danach werden die Beads erneut mehrfach mit PBS gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen.

Nun werden die gewaschenen Sepharosebeads mit dem Überstand aus der Zentrifugation der lysierten Zellen versetzt und für 5 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert.

Abschließend werden die Sepharosebeads ein letztes Mal mit kaltem PBS gewaschen, der Überstand komplett abgenommen und mit Zellstoff trocken getupft. Zu den Proben werden nun 30 µl 1x SDS-Ladepuffer mit DTT gegeben und diese bei 100°C aufgekocht. Sie können jetzt auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet werden.

3.2.2.8 GST-Pulldown

Der GST-Pulldown-Assay dient dem Nachweis von Protein-Protein-Bindungen, also auch einer Bindungskartierung. Dazu wird das sogenannte „Fängerprotein“ mit einer Gluthation-S-Transferase fusioniert und kann somit an kleine GST-Sepharose-Kügelchen, die Beads, binden. Das „Beuteprotein“ wird *in vitro* translatiert und dabei radioaktiv markiert. Es wird mit dem bereits an die Beads gebundenen Fängerprotein inkubiert und die Probe anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen. Mittels Autoradiographie kann eine stattgefundene Bindung anschließend auf einem Radioaktivfilm sichtbar gemacht werden. Es werden die bei -70°C gefrorenen Restpellets der t_4 -Kultur aus der Induktion der Proteinexpression verwendet. Diese werden zunächst aufgetaut und in GST-Lysispuffer resuspendiert. Dabei errechnet sich die Menge des verwendeten Puffers folgendermaßen:

$$V_{\text{Puffer}} \text{ in } \mu\text{l} = \text{OD}_{600} \cdot 20 \cdot V_{\text{Kultur vor Zentrifugation in ml}} \cdot 3$$

Dem Puffer werden noch je 10 µg/ml PMSF und Aprotinin sowie 1 mg/ml Lysozym frisch zugegeben. Nach Resuspension der Pellets werden diese eine halbe Stunde auf Eis inkubiert und anschließend für eine Stunde bei 4.300 rpm und 4°C abzentrifugiert, um die Bakterienzellreste abzutrennen. Währenddessen wird die benötigte Menge an GST-Sepharosebeads 3-5x in gekühltem 1x PBS gewaschen und dabei jeweils 1 Minute bei 3.000 rpm zentrifugiert. Die gewaschenen Beads werden in 1x PBS gelöst und je Ansatz

100 µl in ein Reaktionsgefäß überführt. Dazu werden jeweils 750 µl der lysierten Proteine pipettiert und die Proben bei 4°C über Nacht auf dem Drehrad inkubiert. Am Folgetag wird das „Beuteprotein“ mit Hilfe des TNT T7 SP6 coupled Reticulocyte Lysate System von Promega *in vitro* translatiert und in diesem Zuge auch radioaktiv markiert.

Tabelle 10: Pipettierschema *In vitro* Translation (2x Ansatz)

TNT-Reticulozyten-Lysat	50 µl
TNT-Reaktionspuffer	4 µl
TNT-RNA-Polymerase	2 µl
Aminosäure-Mix ohne Met und Cys	2 µl
³⁵ S [0,5 mCi/ml]	4 µl
RNasin	2 µl
DNA-Template (0,5 µg/µl)	2 µg
H ₂ O dest	ad 100 µl

Der fertige Translationsansatz wird 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Währenddessen werden die Beads vom Drehrad genommen und 5x mit GST-Kopplungspuffer low salt gewaschen. Dann werden jeder Probe 15 µl des *in vitro* Translatates zugegeben und der Rest bei -20°C eingefroren. Die Bindung der Proteine erfolgt über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad. Am nächsten Tag werden die Beads 5x mit GST-Kopplungspuffer high salt gewaschen und zuletzt die restliche überstehende Flüssigkeit mit Zellstoff aufgesaugt. Dann werden den Pellets 20 µl kochender 2x SDS-Ladepuffer für Proteinextrakte mit DTT, sowie 5 µl Blaumarker zugegeben und die Proben 15 Minuten bei 100°C gekocht. Von dem aufgetauten *In vitro*-Translatat werden 1,5 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ebenfalls mit Ladepuffer und Blaumarker versetzt und gekocht. Alle Proben werden abschließend bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Gel entnommen, 4 h bei 380 mA auf eine Immobilon-Membran geblottet, diese getrocknet und mit einer Verstärkerfolie auf einen Radioaktivfilm aufgelegt. Die verschlossene Kassette mit Blot, Film und Verstärkerfolie wird für mindestens 5 Tage bei -70°C inkubiert. Dann kann der Film entnommen und entwickelt werden. Die Protein-Protein-Bindungen sind anhand des radioaktiven Beuteproteins als Banden erkennbar.

3.2.2.9 EMSA-Gel

EMSA-Gele werden eingesetzt um Protein-Oligonukleotid-Verbindungen gemäß ihrer Ladung, Größe und Konformation aufzutrennen, d.h. eine Laufweitenverschiebung vorzunehmen. Dabei wandern ungebundene Proteine am schnellsten durch das Gel, gefolgt von ungebundener DNA bzw. RNA. Langsamer bewegen sich die Protein-Oligonukleotid-Komplexe und am langsamsten solche, an die noch Antikörper gebunden sind.

EMSA-Gele bestehen aus einem Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisch, dem TEMED als Katalysator und APS als Radikalbildner zugegeben wird, um ein vernetztes Polymer zu bilden.

Tabelle 11: Rezept zur Herstellung eines 4%igen EMSA-Geles

10x TBE	500µl
H ₂ O Braun	16,67 ml
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Mix	2,67 ml
10% APS	180 µl
TEMED	14 µl

Zwei Glasscheiben werden gründlich mit Frekanol-Spray gereinigt und entfettet und mittels Plastikstreifen („Spacer“) und Klammern mit 1mm Abstand verbunden. Zwischen diese Scheiben wird das noch flüssige Gel gegossen und ein Kamm zur Bildung der Geltaschen hineingeschoben. Dann lässt man das Gel. 45 min lang aushärten. Es kann am Vortag gegossen und einen Tag im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.2.2.10 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Bei dem Electrophoretic Mobility Shift Assay oder auch Band Shift Assay handelt es sich um eine Affinitätselektrophorese. Dabei wird die Bindung von Proteinen an bekannte DNA- oder RNA-Sequenzen nachgewiesen. Es können auch zusätzlich gegen das Protein reagierende Antikörper eingesetzt werden, in dem Falle spricht man von einem Supershift Assay. Die DNA-Sequenz wird radioaktiv markiert, wodurch die stattfindende Bindung anschließend auf einem Radioaktivfilm sichtbar gemacht wird. Die Auftrennung der Protein-Oligonukleotid-Komplexe ist abhängig von ihrer Ladung, Größe und Konformation.

Zuerst werden die Sonden vorbereitet. Dazu werden je 5 µg der beiden Bindungssequenzen gemischt und in 50 µl [10 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl] gelöst. Diese werden dann 10 min lang bei 80°C im Wasserbad erhitzt und über Nacht im ausgeschalteten Wasserbad abkühlen gelassen. Am Folgetag erfolgt das sogenannte Labeln der Oligos nach dem Pipettierschema:

Tabelle 12: Pipettierschema zum labeln der Oligonukleotide

1 µl Oligos	(~ 200 ng)
5 µl ³² P-αATP	(5~µCi)
5 µl 10x Klenow-Puffer	
1,6 µl dCTP	
1,6 µl dTTP	
1,6 µl dGTP	
0,5 µl Klenow-Fragment ad 50 µl mit Aqua Braun	(~5U)

Die Oligonukleotide werden für 20 min bei 30°C im Heizblock inkubiert, dann ein Loch in den Deckel des Eppis gestochen und das Gemisch kurz auf 100°C erhitzt, um die Aktivität des Klenow-Fragmentes zu stoppen. Nach einer Abkühlungszeit können die gelabelten Nukleotide mittels Illustra MicroSpin G-50 Columns aufgereinigt und bei -20°C gelagert werden.

Zur Durchführung des EMSA werden die Reagenzien auf Eis aufgetaut und nach folgendem Schema auf Eis pipettiert:

Tabelle 13: Pipettierschema EMSA

H ₂ O Braun	Ad 20 µl
10x Binding Buffer	2 µl
Poly (dl-dc)	1 µl
IVT Protein	10 µl
Antikörper	3 µl

Der Ansatz wird 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Währenddessen wird das EMSA- Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit 0,5x TBE-Puffer bedeckt. Dann wird das Gel mit einer frischen Kanüle gespült, um Gelreste und Luftblasen zu entfernen. Es folgt eine Vorelektrophorese bei 120 V über 30-60 min.

Nun werden dem Versuchsansatz 2 µl der zuvor radioaktiv markierten Oligonukleotide zugegeben. Die erneute Inkubationszeit von weiteren 30 min bei Raumtemperatur wird durch Zugabe von 5 µl EMSA Loading Buffers beendet.

Die Vorelektrophorese des EMSA-Gels wird gestoppt und das Gel erneut gespült. Dann werden die Proben mittig aufgetragen und die Protein-DNA-Komplexe bei 120 V für 1-2 h elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Gel aus der Kammer entnommen, auf ein Whatman-Papier übertragen und mit Frischhaltefolie bedeckt für 2 h im Geltrockner getrocknet.

Anschließend kann es direkt mit einer Verstärkerfolie auf den Radioaktivfilm in einer Radioaktivkassette aufgelegt werden. Nach 1-4 Tagen Inkubation bei -70°C wird der Film entwickelt.

3.2.3 Prokaryonten

3.2.3.1 Transformation

Bei der Transformation wird gezielt DNA in kompetente Bakterien eingeschleust. Mit Hilfe der Bakterien können dann die Plasmide vermehrt oder Proteinexpression induziert werden. Die kompetenten Bakterien werden zunächst für 30 Minuten auf Eis aufgetaut. Dann werden pro Transformationsansatz 100 µl davon in ein Reaktionsgefäß pipettiert und dazu je 1 µg Plasmid-DNA gegeben. Nun erfolgt eine halbstündige Inkubation auf Eis. Anschließend werden die Bakterien für 90 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C im Wasserbad ausgesetzt und dann erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die transformierten Bakterien können nun auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen oder in ein LB-Ampicillin-Medium überimpft werden.

3.2.3.2 Bestimmung der Bakteriendichte

Die Dichte der Bakterienkultur wird mit Hilfe des Ultrospec 311 pro bestimmt. Dabei wird die Optische Dichte bei 600 nm ermittelt. Als Nullwert dient die Dichte von LB-Medium. Gemessen wird die Extinktion des Lichtes durch je 1 ml der Kultur in einer Messküvette.

4 Ergebnisse

4.1 Interaktion zwischen Np9 und dem Tumorsuppressorprotein p53

Wie bereits erwähnt, konnte unsere Arbeitsgruppe bereits im Vorfeld zu der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Co-Immünpräzipitationen (Co-IP) Hinweise darauf finden, dass das Kernprotein Np9 an den Tumorsuppressor p53 bindet (Abb.8)

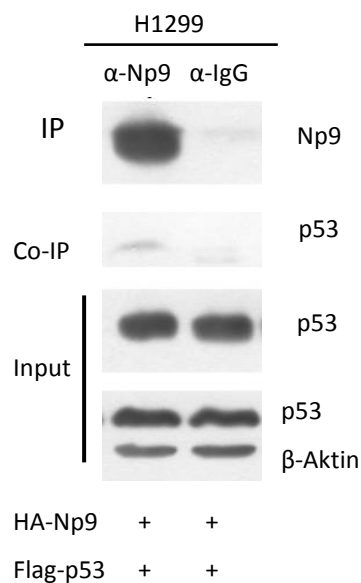


Abbildung 8: Co-Immünpräzipitation als Nachweis der Bindung zwischen Np9 und p53. Gezeigt wird der Westernblot einer Co-IP mit HA-*np9* und Flag-*p53* transfizierten H1299-Zellen (Heyne, 2012)

Bei dem Ansatz mit Np9-Antikörper ist eine p53-Bande zu erkennen, also eine Interaktion der beiden Proteine, nicht hingegen beim irrelevanten Antikörper. Dies ist ein Indiz dafür, dass es sich hierbei um eine spezifische Bindung handelt.

Die Inputbanden (Np9, p53, β-Aktin) zeigen auf, dass die beiden transfizierten Proteine auch wirklich exprimiert wurden. β-Aktin dient außerdem als Ladekontrolle. (HEYNE, 2012)

4.2 GST-Pulldown

4.2.1 Klonierung für die GST-Pulldown-Analysen

Co-IP Studien aus Zellen erlauben keine Aussage darüber, ob zwei interagierende Proteine direkt oder indirekt (über Brückenproteine) aneinander binden. Um eine direkte Bindung zu untersuchen, sind *in vitro* Interaktionsstudien wie GST-Pulldown Analysen hilfreich. Sie erlauben auch eine Kartierung der Bindung.

Für die vorgesehene Bindungsanalyse und Kartierung von p53 und Np9 wurden also GST-Pulldown-Analysen durchgeführt. Die dafür benötigten Proteine und Proteinfragmente-kodierenden Sequenzen im pGEX-Vektor standen größtenteils aus vorherigen Studien bereits zur Verfügung.

Einzig *np9*-Volllängenprotein ohne HA-tag musste noch in den pcDNA 3.1 (+) Neo – Vektor der Firma Invitrogen inkloniert werden (Abb. 9)

Dafür wurden zunächst jeweils 5 µg *pcnv-pa-np9* und 2 µg pcDNA 3.1 (+) Neo durch zweistündige Inkubation bei 37°C mit *Bam*HI verdaut und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Dann konnten die gesuchten Banden auf dem UV-Tisch dargestellt und aus dem Gel ausgeschnitten werden. Der Leervektor war auf einer Höhe von 5428 bp zu erkennen, das Insert *np9* bei 230 bp (Abb. 10). Mittels NucleoSpin Extract II wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert und anschließend der linearisierte Leervektor mittels CiAp dephosphoryliert um eine Religation zu verhindern. Er wurde dann erneut mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Nun erfolgte mit Hilfe von Ligase die Ligation des Vektors pcDNA 3.1 (+) Neo und dem dreifachen Überschuss an *np9*. Es wurden ebenfalls eine Positivkontrolle (nicht dephosphorylierter Vektor ohne Insert) und eine Negativkontrolle (dephosphorylierter Vektor ohne Insert) angesetzt. Mit der Hälfte von jedem Ligationsansatz wurden nun kompetente *E. coli* DH5α transformiert. Diese wurden auf einem LB-Ampicillin-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den erhaltenen Klonen wurden Mini-Plasmidpräparationen angeimpft und am Folgetag mittels Tens-Präparation deren DNA isoliert. Die gewonnene DNA wurde einem Kontrollverdau mit *Bam*HI unterzogen, woraufhin die geeigneten Klone ausgewählt werden konnten (Abb.11). Da das Insert nur von den

Schnittstellen eines einzigen Restriktionsenzymes flankiert ist, kann es in zwei verschiedenen Orientierungen eingebaut werden (3' zu 5' oder 5' zu 3'). Durch einen Orientierungsverdau mit *Dra* II konnten die Klone ausgewählt werden, bei denen die richtige Orientierung des Inserts vorlag (Abb.13). Aus diesen wurden dann 2 beliebige Klone ausgewählt und über Nacht in 200 ml LB-Medium angezüchtet. Abschließend konnte mittels NucleoBond Xtra Midi die DNA gewonnen werden.

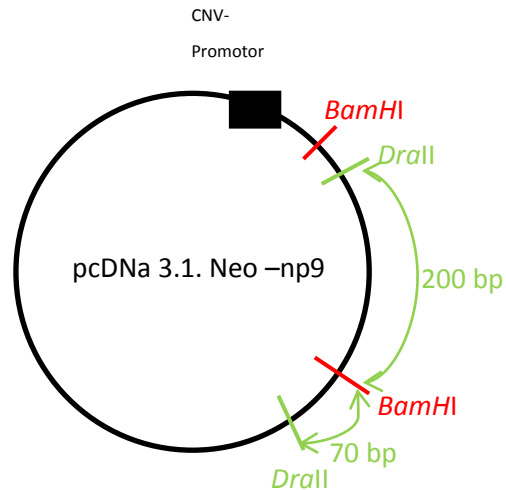


Abbildung 9: Schematische Darstellung der klonierten pcDNA 3.1. Neo-*np9*.
Der Vektor pcDNA 3.1 (+) Neo hat eine Größe von 5428 bp, das Insert *np9* von 230 bp.
Da das Insert nur von den Schnittstellen des Restriktionsenzymes BamHI flankiert ist, kann es in zwei verschiedenen Orientierungen eingebaut werden (3' zu 5' oder 5' zu 3').
Die Fragmentlängen (grün dargestellt) ergeben sich durch die Schnittstellen von *Drall* am Anfang der Sequenz und außerhalb des Inserts.
Durch einen Orientierungsverdau mit *Drall* konnten die Klone ausgewählt werden, bei denen die richtige Orientierung des Inserts vorlag, nämlich jene, die geschnitten Banden auf der Höhe von 270 bp und 5408 bp aufwiesen.

Ergebnisse

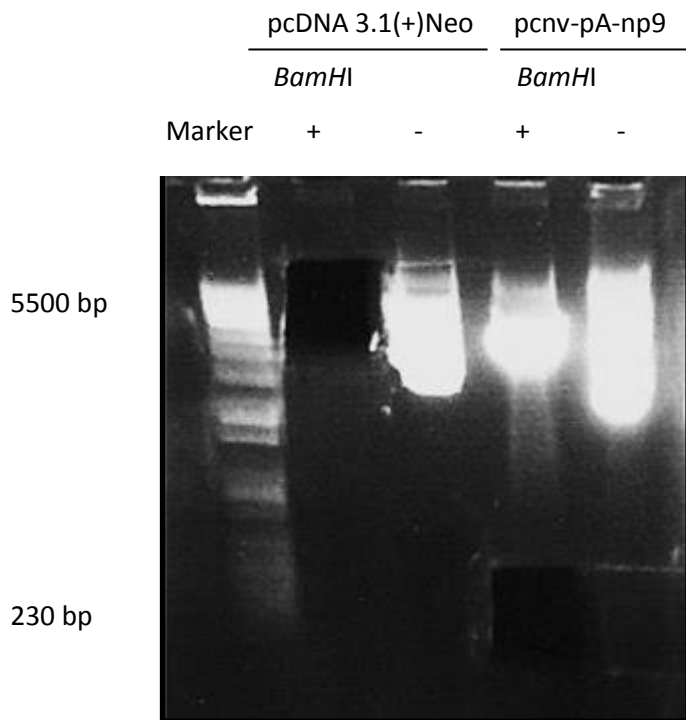


Abbildung 10: Gelelektrophorese des Leervektors pcDNA 3.1(+)*Neo* und des Inserts *np9*. Als Marker diente ein Größenstandard für Agarose-Gelelektrophorese. Aufgetragen wurde jeweils erst die mit *Bam*HI geschnittene, daneben die unverdaute Probe. Auf dem UV-Tisch stellen sich die Banden dar. Der Leervektor war auf einer Höhe von etwa 5500 bp zu erkennen, das Insert *np9* bei 230 bp. Das Foto wurde aufgenommen, nachdem die entsprechenden Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten wurden.

- : unverdaut, nicht mit *Bam*HI geschnitten, + : verdaut, mit *Bam*HI geschnitten

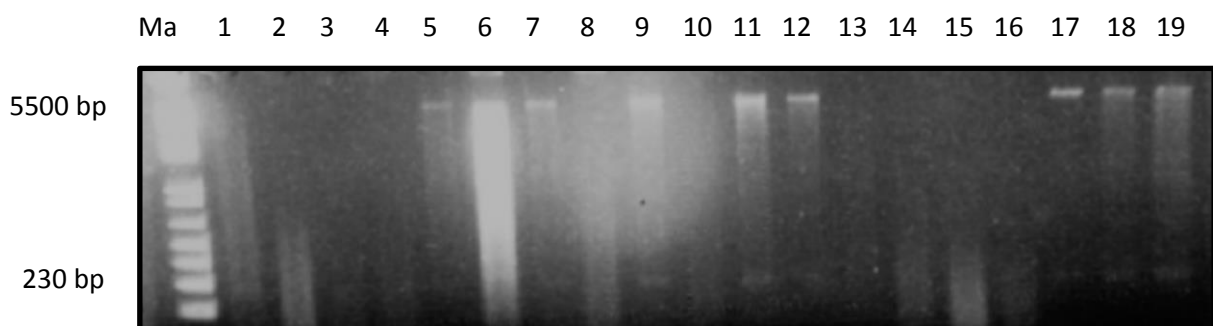


Abbildung 11: Kontrollverdau der Klone 1-19 mit *Bam*HI. Transformation zur Überprüfung der Insertion der Proteinsequenz in den Vektor. Die Proben wurden nach Verdau mit *Bam*HI aufgetragen. Das Fragment *np9* ist auf einer Höhe von 230 bp, der Leervektor bei etwa 5500 bp zu erkennen. Geeignet waren also die Klone 5, 7, 9, 11, 12, 17, 18 und 19.
Ma: Marker

Ergebnisse

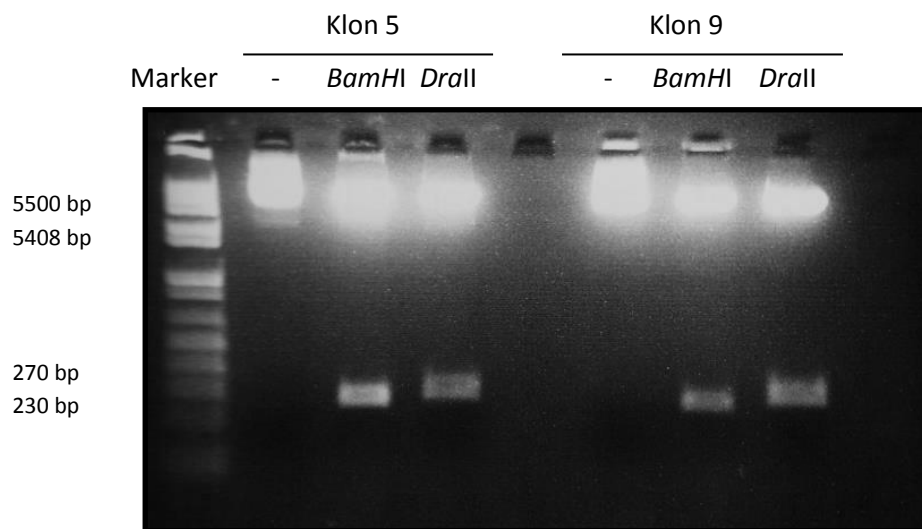
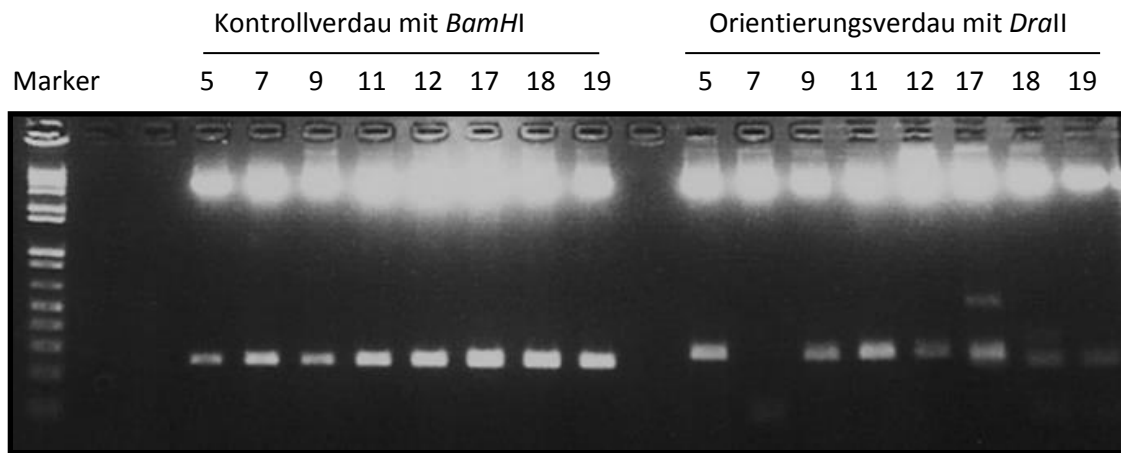


Abbildung 12: Kontroll- und Orientierungsverdau der zuvor in Abbildung 11 ausgewählten Klone. Der obere Teil der Abbildung zeigt den Kontrollverdau der geeigneten pcDNA 3.1 (+) Neo-np9-Klone 5, 7, 9, 11, 12, 17, 18 und 19 mit *Bam*HI sowie den Orientierungsverdau mit *Dr*all. Die Proben wurden nach dem Verdau mit den jeweiligen Restriktionsenzymen aufgetragen. Dabei zeigten die Klone 5 und 9 die richtige Orientierung nach Verdau mit *Dr*all durch deutliche Banden bei 270 bp und 5408 bp und wurden zu weiteren Experimenten herangezogen. Der untere Teil der Abbildung zeigt im Detail den Kontrollverdau und Orientierungsverdau der Klone 5 und 9.
 - : unverdaut, nicht geschnitten

4.2.2 Induktion der Proteinexpression

Die Induktion der Proteinsynthese erfolgte wie unter 2.2.2.1 im Methodenteil beschrieben. Die Proteine stellen sich dann als deutliche blaue Banden im getrockneten SDS-Gel dar (Abbildung 10).

Auf Abbildung 10 und Abbildung 11 erkennt man bei allen Proben die Induktion des transformierten Proteins durch stärkere Banden als bei der Probe vor der Induktion, da die entsprechenden Fragmente durch die *E.coli* BL21 synthetisiert wurden. Entsprechend konnte der gewonnene Proteinextrakt für die Bindungskartierung genutzt werden.

Ergebnisse

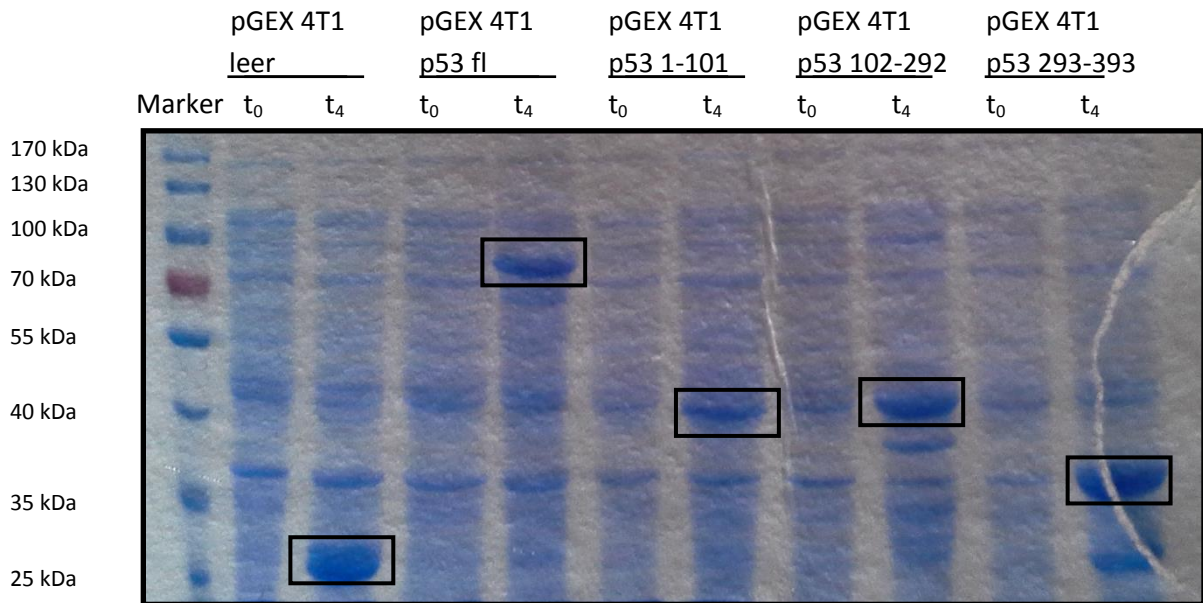


Abbildung 13: Induktion der Proteinexpression der pGEX 4T1 p53 – Fragmente.
Auf ein 10%iges SDS-Gel wurden jeweils zuerst die Proteinextrakte vor (t₀-Probe) und nach (t₄ –Probe) der Induktion mit IPTG aufgetragen. Als Marker diente ein Größenstandard für SDS-Gelelektrophorese.
Die Bande des pGEX 4T1 - Leervektors ist auf einer Höhe von ca. 26 kDa zu erkennen, p53 fl bei ca. 80 kDa, das Fragment p53 1-101 bei ungefähr 40 kDa, das Fragment p53 102-292 bei ca. 45 kDa und das Fragment p53 293-393 bei etwa 37 kDa.
t₀: Vorinduktionsprobe, t₄: Nachinduktionsprobe, fl: Volllänge

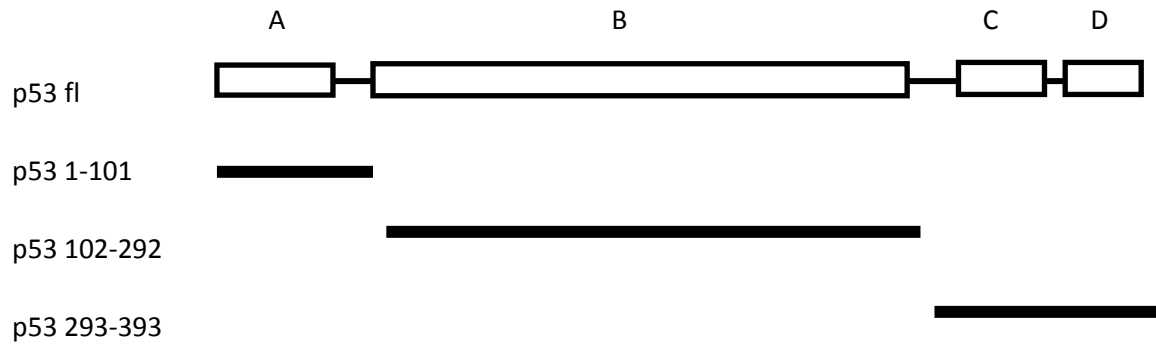


Abbildung 14: Proteinstruktur von p53 und deren Domänen:

A: Transaktivierungsdomäne (AS 1-42)

B: Bindedomäne (AS 102-292)

C: Oligomerisierungsdomäne (AS 323-356)

D: Regulationsdomäne (AS 360-393)

p53 fl: p53-Volllänge (AS 1-393)

(MAY und MAY, 1999)

Die in der Arbeit verwendeten Fragmente umfassen also die Transaktivierungsdomäne innerhalb der Aminosäuren 1-101, die Bindedomäne innerhalb der Aminosäuren 102-292 und die Oligomerisierungs- und Regulationsdomäne innerhalb der Aminosäuren 292-393.

Ergebnisse

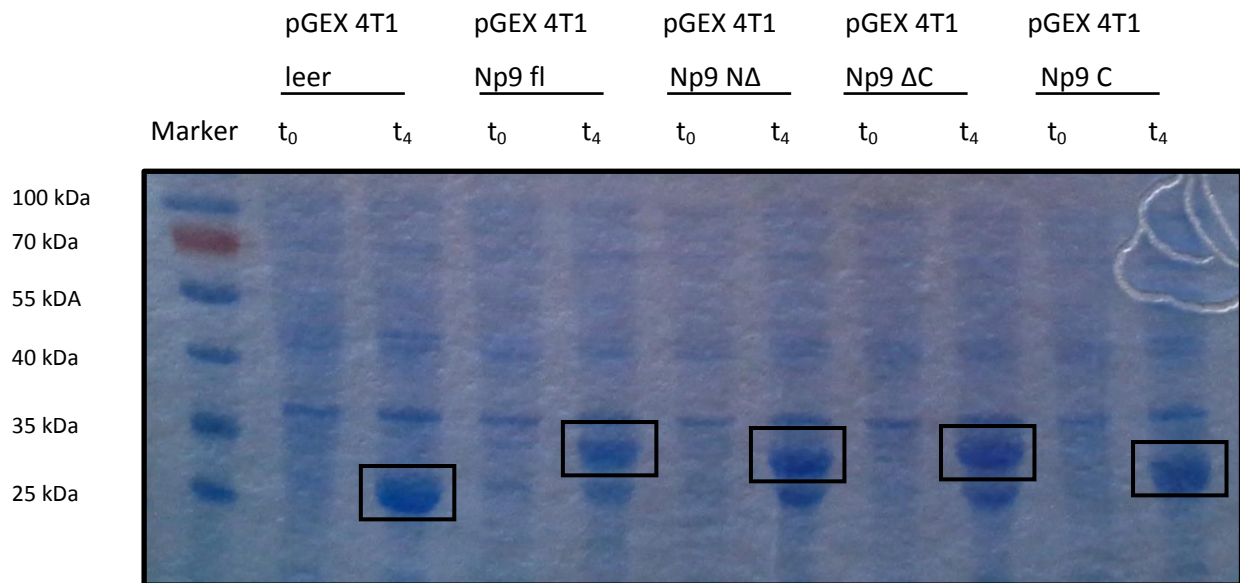


Abbildung 15: Induktion der Proteinexpression der pGEX 4T1 Np9-Fragmente.
Auf ein 10%iges SDS-Gel wurden jeweils zuerst die Proteinextrakte vor (t₀-Probe) und nach (t₄-Probe) der Induktion mit IPTG aufgetragen.
Als Marker diente ein Größenstandard für SDS-Gelelektrophorese.
Die Bande des pGEX 4T1-Leervektors ist auf einer Höhe von ca. 26 kDa zu erkennen, Np9 fl läuft auf einer Höhe von etwa 30 kDa, das Fragment Np9 NΔC bei ungefähr 28 kDa, das Fragment Np9 ΔC bei ca. 30 kDa und das Fragment Np9 C bei ca. 27 kDa.
t₀: Vorinduktionsprobe, t₄: Nachinduktionsprobe, fl: Volllänge

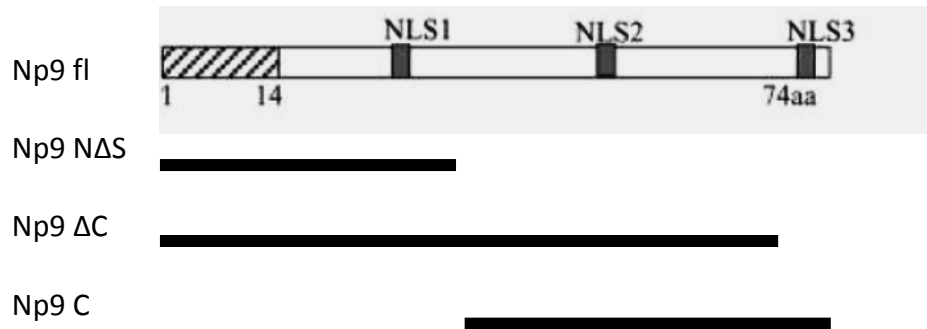


Abbildung 16: Gezeigt wird die Proteinstruktur von Np9
Np9 fl: Np9-Volllänge (AS 1-74),
Np9 NΔS: Np9 N-Term ohne Stopp (AS 1-36),
Np9 ΔC: Np9 AS 1-64,
Np9 C: Np9 C-Term (AS 36-74)
(adaptiert aus: DENNE et al. 2007)

4.2.3 GST-Pulldown-Experimente

Zur Bindungsbestätigung und -kartierung der Proteine p53 und Np9 wurden also nun GST-Pulldown-Experimente durchgeführt, wie in 3.4.2.8 im Methodenteil beschrieben. Mittels Autoradiographie wurden dann die Protein-Protein-Bindungen des radioaktiven Beuteproteins als Banden erkennbar.

Abschließend wurde der Blot erst mit GST-Antikörper, 24 h später mit Anti-mouse-Antikörper inkubiert. Mittels ECL Substrat von Pierce konnte nun die Bindung der GST-getaggteten Proteine an die Sepharosebeads nachgewiesen werden.

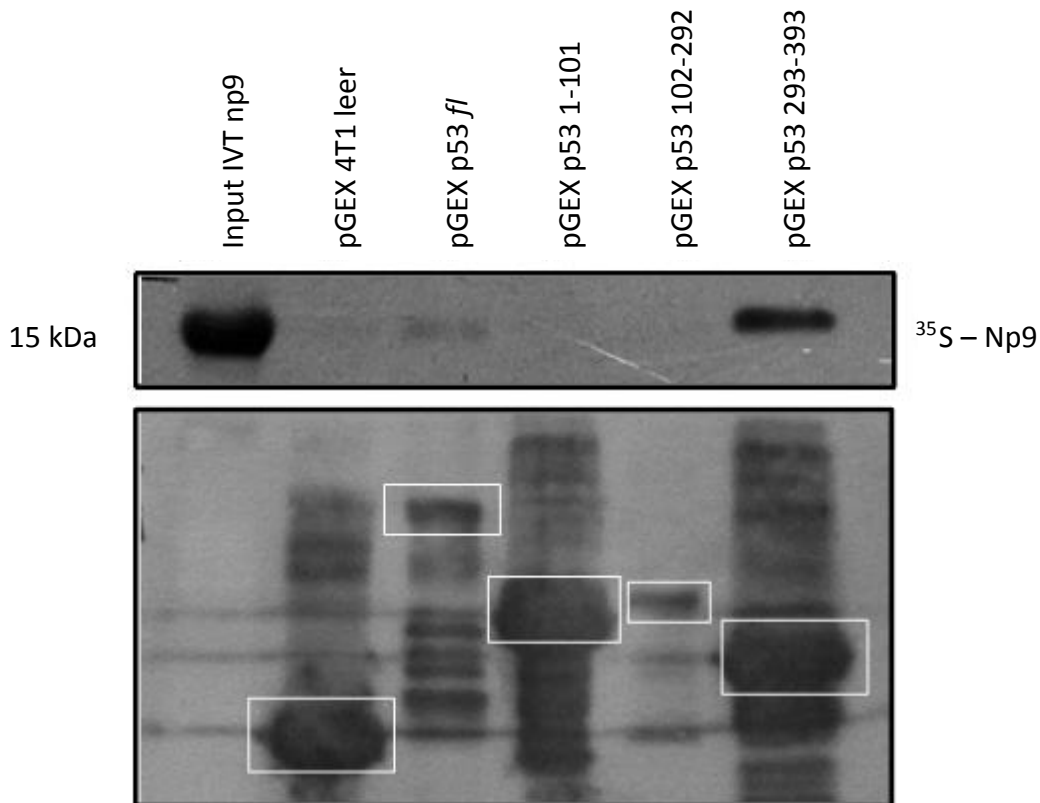


Abbildung 17: GST-Pulldown und Bindungsnachweis der p53-Fragmente.

Der obere Teil der Abbildung zeigt den GST-Pulldown mit Volllängen-p53 sowie den p53-Fragmenten als Fängerproteine, und radioaktiv markiertem Np9 als Beuteprotein. Es handelt sich um einen Radioaktivfilm, der das radioaktiv markierte ^{35}S -Np9 als dunkle Banden darstellt.

Als Input diente Np9 *in vitro*-Translatat, welches als deutliche Bande auf Höhe von 15 kDa zu erkennen ist. Das radioaktive Np9 bindet nicht an den GST-gebundenen pGEX 4T1-Leervektor, jedoch sowohl an GST-gebundenes Volllängen-p53, als auch an das GST-gebundene Fragment p53 293-393.

Der untere Teil der Abbildung dient als Nachweis der Bindung der GST-getaggten Proteine an die Sepharosekügelchen. Gezeigt wird ein Westernblot mit Anti-GST-Antikörper als Nachweis für die erfolgreiche Fällung der GST-Fragmente.

IVT: *in vitro*-Translatat, fl: Volllänge.

Der obere Bereich der Abbildung 17 zeigt, dass radioaktiv markiertes Np9 sowohl (schwächer) mit Volllängen-p53 als auch (stärker; siehe Diskussion) dem C-terminalen Fragment p53 293-393 eine Bindung eingehen konnte. Keine Bindung erfolgte mit dem Leervektor pGEX 4T1, dem N-Terminus und dem Zentrum von p53. Somit konnte auch eine

alleinige Bindung von radioaktivem Np9 an GST ausgeschlossen werden. Als Input diene Np9- *in vitro* -Translatat, welches als deutliche Bande auf Höhe von 15 kDa zu erkennen ist. Im unteren Bereich der Abbildung 17 ist die Bindung des GST-getaggtten Leervektors, Volllängen-p53 und der p53-Fragmente an die Sepharosekügelchen dargestellt (Vgl. Abbildung 13, Induktion der Proteinexpression). Wie zu erwarten, sah man keine Bande beim nicht GST-getaggtten Np9- *in vitro* -Translatat, dagegen deutliche Banden bei den GST-getaggtten Proteinen. Die Bande des pGEX 4T1-Leervektors ist auf einer Höhe von 26 kDa zu erkennen, p53 fl bei 80 kDa, das Fragment p53 1-101 bei 40 kDa, das Fragment p53 102-292 bei 45 kDa und das Fragment p53 293-393 bei 37 kDa.

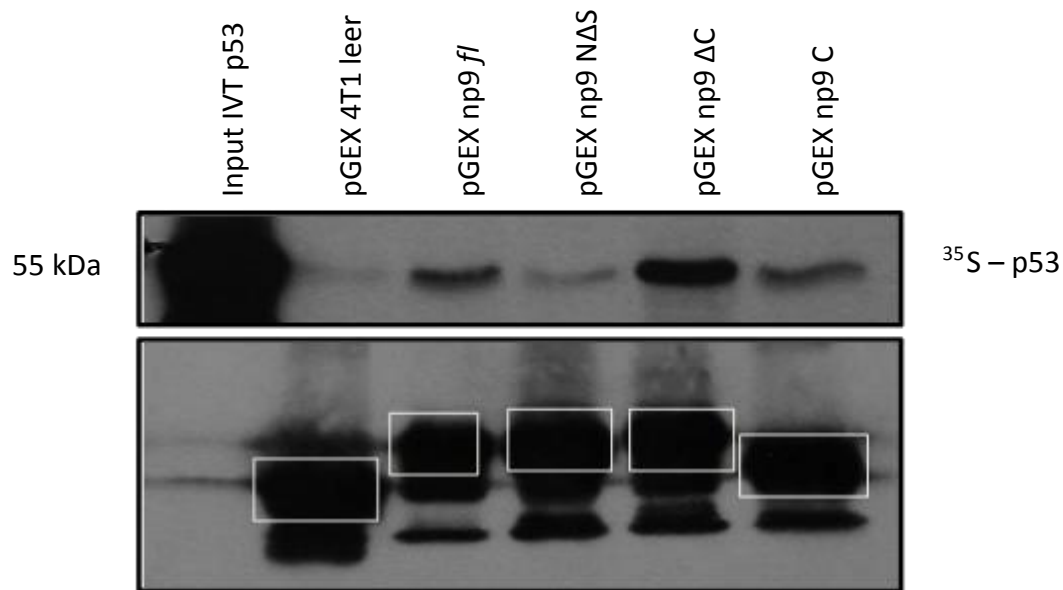


Abbildung 18: GST-Pulldown und Bindungsnachweis der Np9-Fragmente.

Der obere Teil der Abbildung zeigt den GST-Pulldown mit Vollängen-Np9 sowie den Np9-Fragmenten als Fängerproteine, und dem radioaktiv markierten p53 als Beuteprotein. Es handelt sich um einen Radioaktivfilm, der das radioaktiv markierte ^{35}S -p53 als dunkle Banden darstellt.

Als Input diente p53 als in vitro -Translatat, welches als prominente Bande auf Höhe von 55 kDa zu erkennen ist. Das radioaktive p53 bindet minimal an alle GST-getaggten Proteine, deutlich jedoch an Vollängen-Np9 und die Np9 Fragmente Np9 NΔC und Np9 C.

Der untere Teil der Abbildung dient als Nachweis der Bindung der GST-getaggten Proteine an die Sepharosekügelchen. Gezeigt wird ein Westernblot mit Anti-GST-Antikörper als Nachweis für die erfolgreiche Fällung der GST-Fragmente.

IVT: in-vitro-Translatat,

Np9 fl: Nnp9 – Volllänge (AS 1-74),

Np9 NΔS: Np9 N-Term ohne Stopp (AS 1-36),

Np9 ΔC: Np9 ohne C-Term (AS 1-64),

Np9 C: Np9 C-Term (AS 36-74)

Die obere Bereich der Abbildung 18 zeigt, dass radioaktiv markiertes p53 vornehmlich mit Vollängen-Np9 und nur leicht mit dem C-Terminus von Np9 interagiert. Dabei war die Bindung an Np9 Δ C am stärksten. p53 band hingegen kaum an den N-Terminus von Np9. Eine minimale Bindung war auch an den pGEX-Leervektor zu erkennen. Dies implizierte, dass das radioaktive p53 sehr schwach auch an GST oder den pGEX-Leervektor binden kann. Insgesamt gab es also eine schwache Bindung als Hintergrund. Als Input diente p53 als *in-vitro*-Translatat, welches als sehr prominente Bande auf Höhe von 55 kDa zu erkennen ist.

Im unteren Bereich der Abbildung 18 ist die Bindung des GST-getaggten Leervektors, Vollängen-Np9 und der Np9-Fragmente an die Sepharosebeads dargestellt (Vgl. Abbildung 15, Induktion der Proteinexpression). Wie zu erwarten, sah man keine Bande beim nicht GST-getaggten p53- *in-vitro* -Translatat, dagegen deutliche Banden bei den GST-getaggten Proteinen. Die Bande des pGEX 4T1-Leervektors ist auf einer Höhe von ca. 26 kDa zu erkennen, Np9 fl läuft auf einer Höhe von 30 kDa, das Fragment Np9 Δ C bei 28 kDa, das Fragment Np9 Δ C bei 30 kDa und das Fragment Np9 C bei 27 kDa. Es wurden also alle Fragmente gefällt.

4.3 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ist eine Form der Affinitätselektrophorese. Sie wurde eingesetzt, um die Bindung von p53 an eine bekannte DNA-Sequenz nachzuweisen, indem die Proteinbindung zu einem verzögerten Laufen der markierten DNA-Probe im nativen Gel führt. Gleichzeitig wurde durch den Einsatz des gegen p53 reagierenden Antikörpers DO-1 ein Supershift Assay als Nachweis der Anwesenheit von p53 im Komplex durchgeführt. Unsere DNA-Sequenz wurde hierfür mit ^{32}P radioaktiv markiert, wodurch die stattfindende Bindung anschließend auf einem Radioaktivfilm dargestellt werden konnte. Der zusätzliche Einsatz von Np9 sollte die Frage klären, ob dieses in der Lage ist, die Bindungsfähigkeit von p53 zu beeinflussen.

Das verwendete Np9 stammte aus baculovirusinfizierten Insektenzellen und wurde freundlicherweise vom Institut für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle diente reiner Baculovirusextrakt ohne Np9.

4.3.1 Radioaktive Markierung der Sonden

Zuerst wurden die Sonden als Bindungspartner des Tumorsuppressors p53 vorbereitet. Dazu wurden je 5 µg der beiden komplementären DNA-Einzelstränge

p53-BS 1.1. 5' GATCCAGACATGCCTAGACATGCCTAG 3'

und p53-BS 2.0 5'AATTCCTAGGCATGTCTAGGCATGTCTGGATC 3' gemischt und in

[10 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl] gelöst. Daraufhin erfolgte das tatsächliche „Labeln“ des Oligonukleotids wie in 3.4.2.10 des Methodikteils beschrieben.

4.3.2 EMSA-Experimente

Nachdem bereits von HEYNE 2012 mittels Co-IP in unserer AG Hinweise auf eine Bindung zwischen p53 und Np9 gefunden worden waren, und von mir diese Interaktion bestätigt und eine Bindungskartierung vorgenommen werden konnte, wurden noch EMSA-Assays durchgeführt um einen ersten Hinweis auf die mögliche Funktion der p53-Np9 Interaktion zu erhalten. Wir hatten ja gezeigt, dass Np9 vornehmlich an den C-Terminus von p53 bindet (siehe Abbildung 17). Es war bekannt, dass bakteriell oder in vitro hergestelltes p53 solange nicht spezifisch an seine DNA-Erkennungssequenz binden kann, wie die C-terminale hemmende regulatorische Domäne von p53 nicht durch Proteininteraktion (z. B. mit einem Antikörper) induziert worden ist. Wir stellten also die Hypothese auf, dass Np9 ähnlich wie bereits bekannte Interaktionspartner des p53-C-Terminus (z. B. p53-Antikörper PAb421) diese Aufgabe übernehmen kann und bindungsinaktives p53 zu aktivieren vermag. Es war also zu klären, ob und gegebenenfalls wie Np9 die Bindungsfähigkeit von p53 an eine bekannte DNA-Sequenz beeinflusst.

Für den Electrophoretic Mobility Shift Assay wurden verschiedene Versuchsansätze (Proteinkombinationen) pipettiert, welchen nach einer Inkubationszeit das zuvor mit ³²P radioaktiv markierte Oligonukleotid zugegeben wurde. Die erneute Inkubation der Ansätze wurde durch Zugabe von EMSA Loading Buffer beendet und die Proben auf das nicht-denaturierende EMSA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden die Protein-Oligonukleotid-Verbindungen gemäß ihrer Ladung, Größe und Konformation getrennt, d.h. ungebundenes Oligonukleotid wanderte am schnellsten durch das Gel, gefolgt

von Protein-Oligonukleotid-Komplexen, die sich träger bewegten, und am langsamsten solche, an die noch Antikörper gebunden war. Die Gele wurden im Geltrockner getrocknet und direkt mit einer Verstärkerfolie auf den Radioaktivfilm in einer Radioaktivkassette aufgelegt. Nach einigen Tagen Inkubation bei -70°C wurde der Film entwickelt. Die Durchführung eines EMSAs ist schematisch in Abbildung 19 dargestellt.

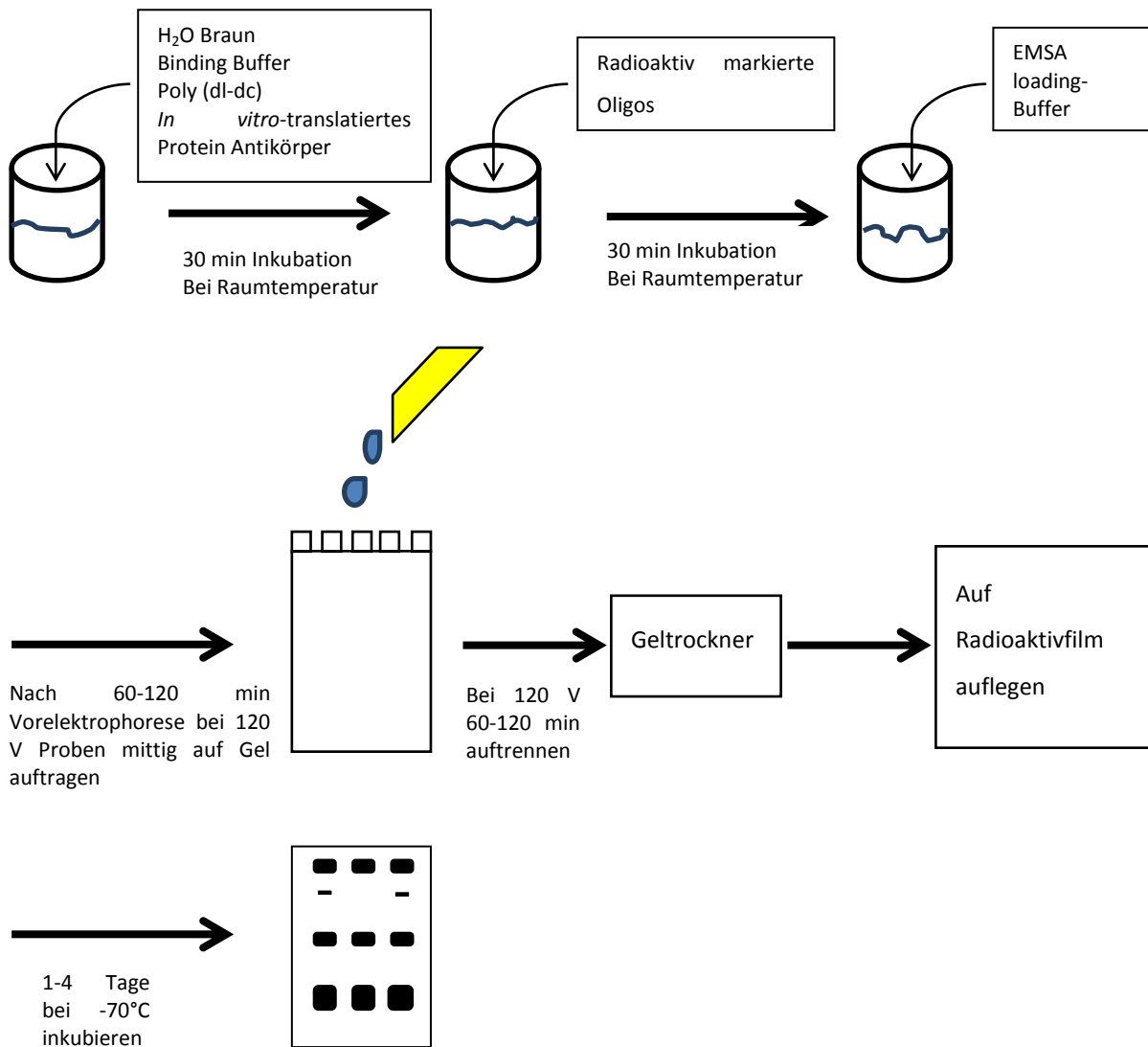


Abbildung 19: Schematische Darstellung eines EMSA-Experimentes

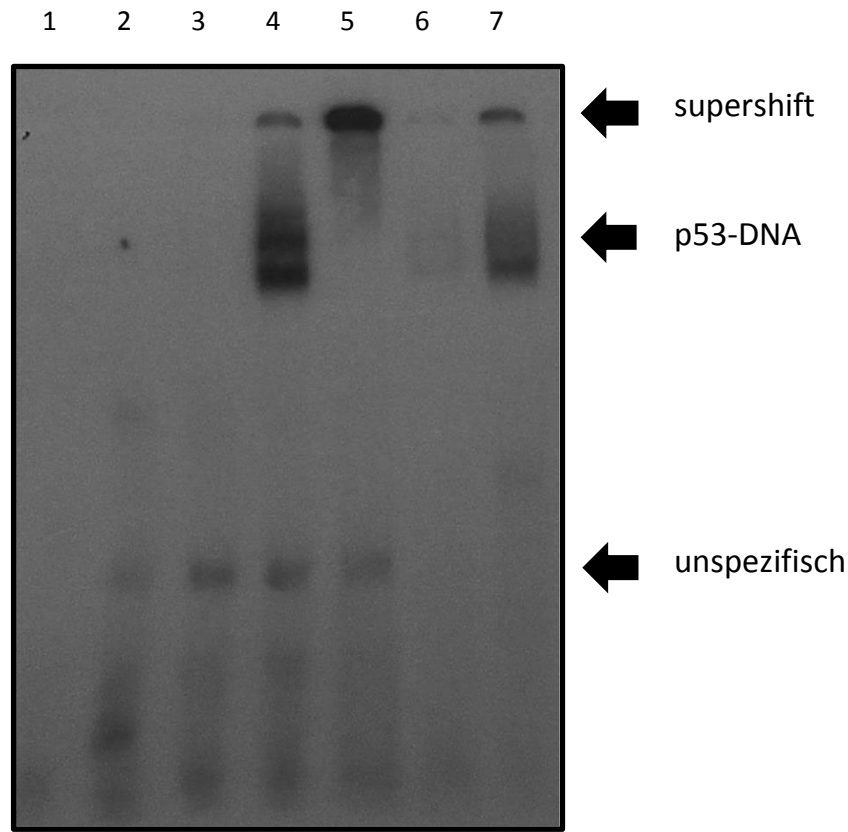


Abbildung 20: EMSA mit radioaktiv markierter Bindungssequenz für p53.
 Die Abbildung zeigt einen Radioaktivfilm, der das radioaktiv markierte Oligonukleotid als schwarze Banden darstellt.
 Die erste Probe besteht nur aus radioaktiv markierten Oligonukleotiden (unter dem Gelunterrand), der zweiten wurde zusätzlich reines Retikulozytenlysats hinzugegeben, der dritten in vitro-translatiertes p53. In keinem der Fälle ist eine Bande (Shift) erkennbar. Erst nach Zugabe des Antikörpers PAb421 bei der 4. Probe war p53 in der Lage, an die DNA-Sequenz zu binden, es ist ein deutlicher Shift zu erkennen. Durch zusätzlichen Einsatz des Antikörpers DO-1 in der 5. Probe kam es zu einem Supershift. Durch Hinzufügen von reinem Baculovirusextrakt zu der Mischung aus Oligonukleotiden, p53 und PAb421 in Probe 6 nahm die Intensität der Banden deutlich ab, wohingegen sie bei Beimischung von Np9-haltigem Baculovirusextrakt in der letzten Probe wieder deutlich hervortrat.

1 = nur Oligonukleotide
 2 = Oligonukleotide und Retikulozytenlysats
 3 = Oligonukleotide und In vitro-translatiertes p53 (ohne stimuliertem C-Terminus)
 4 = Oligonukleotide, p53 und PAb421
 5 = Oligonukleotide, p53, PAb421 und DO-1
 6 = Oligonukleotide, p53, PAb421 und Baculovirusextrakt ohne Np9
 7 = Oligonukleotide, p53, PAb421 und Baculovirusextrakt mit Np9

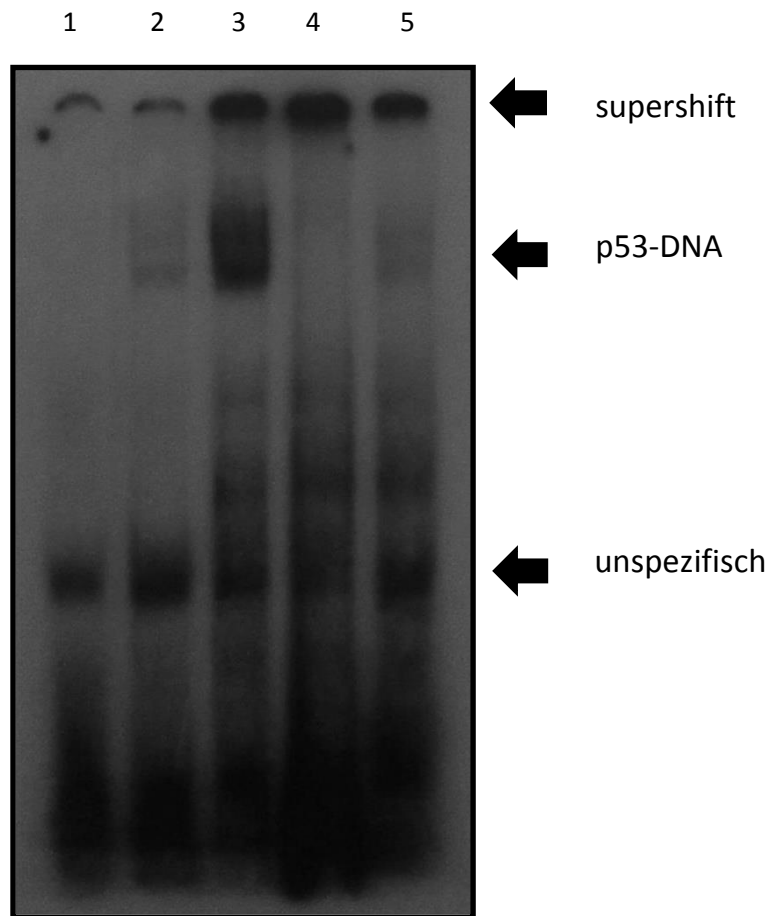


Abbildung 21: EMSA mit radioaktiv markierter Bindungssequenz für p53.
 Die Abbildung zeigt einen Radioaktivfilm, der das radioaktiv markierte Oligonukleotid als schwarze Banden darstellt.
 Alle Proben enthalten PAb421 und die radioaktiv markierten Oligonukleotide.
 Die erste Probe enthält als Negativkontrolle zusätzlich nur Retikulozytenlysat mit reinem Baculovirusextrakt. Es stellte sich keine Bande dar.
 In der zweiten Probe, welche *in vitro*-translatiertes p53 und reinen Baculovirusextrakt beinhaltet, war der Shift zwar erkennbar, aber deutlich schwächer als in Probe 3, welche Np9-haltigen Baculovirusextrakt beinhaltet (Vgl. Abb X a). In Probe 4 kam es durch die zusätzliche Beimengung des Antikörpers DO-1 zu einem Supershift (Vgl. Abb. X a). Der letzten Probe wurde stattdessen Np9-Antikörper zugegeben, woraufhin die Bande wieder schwächer ausgeprägt war als bei der 3. Probe, vergleichbar Probe 2.

1 = Oligonukleotide, Retikulozytenlysat, Baculoextrakt und PAb421
 2 = Oligonukleotide, *In vitro*-translatiertes p53, Baculoextrakt ohne Np9 und PAb421
 3 = Oligonukleotide, p53, Baculoextrakt mit Np9 und PAb421
 4 = Oligonukleotide, p53, Baculoextrakt mit Np9, DO-1 und PAb421
 5 = Oligonukleotide, p53, Baculoextrakt mit Np9, Np9 – AK und PAb421

Abbildung 20 zeigt, dass p53 nur in Anwesenheit des Antikörpers PAb421 in der Lage war, an die radioaktiv markierte DNA- Sequenz zu binden. Erst bei der vierten Probe zeigte sich ein deutlicher Shift. Dieser wurde durch zusätzlichen Einsatz des Antikörpers DO-1 zum Supershift, wodurch bewiesen wurde, dass der Komplex p53 enthält. Nach Beimischung von reinem Baculoextrakt zum Probenansatz aus radioaktiv markiertem Oligonukleotid, p53 und PAb421 nahm die Intensität der Bande deutlich ab, was vermutlich auf einen hemmenden Einfluss von Proteinen im Gesamtextrakt zurückzuführen ist. Interessanterweise wurde die Bindung von p53 unter Zugabe von Np9-haltigem Baculoextrakt jedoch wieder deutlich stärker. Dies ließ die vorläufige Vermutung zu, dass Np9 in der Lage ist, die Bindungsfähigkeit von p53 positiv zu beeinflussen. Diese Vermutung wurde auch durch einen weiteren Versuchsansatz, dargestellt in Abbildung 21 bestätigt: auch hier zeigte sich nur ein schwacher Shift in Probe 2, welche radioaktiv markiertes Oligonukleotid, p53, PAb421 und reinen Baculoextrakt enthielt, ein deutlicher dagegen beim Einsatz von Np9-haltigem Baculoextrakt in Probe 3. Beim zusätzlichen Einsatz von Np9-Antikörper in Probe 5 dagegen stellte sich die Bande wieder genauso schwach dar wie in Probe 2. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass es sich beim eingesetzten Np9-Antikörper um einen polyklonalen Antikörper handelt, welcher an mehreren Stellen des Np9-Proteins ansetzen kann und somit um die Bindung von Np9 an p53 konkurriert. Beim Einsatz des Antikörpers DO-1 in Probe 4 kam es wiederum zu einem Supershift.

Insgesamt indizieren die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Resultate also, dass Np9 sowohl in vivo als auch in vitro an den Tumorsuppressor p53 zu binden vermag. Die Bindung involviert die Aminosäurereste 36 bis 64 von Np9 und erfolgt über den regulatorischen C-Terminus von p53. Zumindest in vitro, in EMSA Studien, scheint Np9 die p53-DNA Interaktion zu fördern. Es könnte sich also bei Np9 um einen p53-unterstützenden Faktor handeln, der somit möglicherweise Tumorsuppressoreigenschaften besitzt. Diese Zusammenhänge müssen aber noch im Detail untersucht werden.

5 Diskussion

Während *np9*-Transkript relativ häufig vorliegt, findet sich in den meisten bisher analysierten Zellen Np9 Protein nur in geringen Mengen (ARMBRUESTER *et al.* 2002, 2004; GROSS *et al.* 2011). Werden die Zellen jedoch bestimmten Stressformen ausgesetzt, steigt das intrazelluläre Np9 Protein an (ARMBRUESTER *et al.* 2002). So gelang es HEYNE *et al.* 2015 durch Inhibition des 26S-Proteasoms mittels Epoxomicin, einem natürlich von Actinomyceten produzierten hoch wirksamen Hemmer des Proteasoms, gleichzeitig das Level an intrazellulärem Np9, p53 und MDM2 in menschlichen Tera-1 Teratokarzinom-Zellen zu steigern. Dies war jedoch in nicht-transformierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Probanden nicht möglich.

Unsere Arbeitsgruppe hatte unlängst mittels Co-Immünpräzipitationen (Co-IP) Hinweise darauf finden können, dass das Kernprotein Np9 an den Tumorsuppressor p53 bindet. Es ist jedoch nicht möglich, mittels Co-IP Studien aus Zellen eine Aussage darüber zu treffen, ob zwei interagierende Proteine direkt oder aber indirekt, d.h. über Brückenproteine, eine Bindung eingehen. Um direkte Bindungen darzustellen, sind *in vitro* Interaktionsstudien wie GST-Pulldown Analysen hilfreich, welche gleichzeitig auch eine Kartierung der Bindung ermöglichen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GST-Pulldown Analysen mit radioaktiv markiertem Np9 als Beuteprotein, sowie bakteriell exprimiertem p53 als Fängerprotein zeigten, dass Np9 sowohl eine Bindung mit Vollängen-p53 als auch eine sogar noch stärkere Bindung mit dem isolierten C-Terminus von p53 eingehen kann. Keine Bindung erfolgte dagegen mit dem Leervektor pGEX 4T1, dem isolierten N-Terminus und dem Zentrum von p53. Somit konnten Hinweise auf eine Interaktion zwischen dem C-Terminus des Tumorsuppressors p53 und Np9 gefunden werden.

Auch der GST-Pulldown, der umgekehrt mit radioaktiv markiertem p53 als Beuteprotein und bakteriell exprimiertem Np9 als Fängerprotein durchgeführt wurde, zeigte eine Bindung der beiden Proteine, hier von p53 an Vollängen-Np9 sowie eine leichte Interaktion mit der C-terminalen Aminosäuresequenz 36-74 von Np9. Am stärksten war jedoch die Bindung an Np9 Δ C, also an ein Np9 mit den Aminosäureresten 1-64. Dies kann auf eine die Bindungsfähigkeit inhibierende Sequenz innerhalb der Aminosäureresten 65-74 hinweisen,

da die Bindung von p53 an Np9 ohne C-Terminus stärker war als an das Np9 Vollängenprotein. p53 band hingegen kaum an die N-terminalen Aminosäurereste 1-36 von Np9. Insgesamt findet also die stärkste Bindung zwischen den Aminosäureresten 36 und 64 von Np9 statt. p53 band nur minimal unspezifisch an den pGEX-Leervektor.

Im Gegensatz zu der ausgiebig untersuchten sequenzspezifischen DNA-Bindedomäne im Zentrum des Tumorsuppressors p53, ist die Funktion der C-terminal gelegenen Regulationsdomäne noch nicht vollständig verstanden. Sie verfügt über zahlreiche Lysinreste, welche es ihr ermöglichen, unspezifisch an DNA und RNA zu binden (LAPTENKO und PRIVES, 2006). Laut unterschiedlicher Studien ist die C-terminale Bindedomäne sowohl an der DNA-Bindung beteiligt (ANDERSEN *et al.*, 1997; GU und ROEDER, 1997; LUO *et al.* 2004; MCKINNEY *et al.* 2004), als auch an der Stabilisierung von p53 (LI *et al.* 2002; NAKAMURA *et al.* 2000; RODRIGUEZ *et al.* 2000) und dessen zellulärer Lokalisation (STOMMEL *et al.* 1999; GU *et al.* 2001; LOHRUM *et al.* 2001; NIE *et al.* 2007). Außerdem ist sie für die Rekrutierung von Co-Faktoren verantwortlich (AN *et al.* 2004; BARLEV *et al.* 2001; CHUIKOV *et al.* 2004; LEE *et al.* 2000; MUJTABA *et al.* 2004).

Im Laufe der letzten Jahre gab es zahlreiche Studien zur Beteiligung des C-Terminus von p53 an der sequenzspezifischen DNA-Bindfähigkeit des Proteins. Während anfangs noch angenommen wurde, dass er als Negativregulator fungiert (ANDERSEN *et al.* 1997, AYED *et al.* 2001; HUPP *et al.* 1992; HUPP und LANE, 1994; JAYARAMAN und PRIVES, 1995), wurde ihm später die Funktion eines Positivregulators zugeschrieben, welcher die Bindung an Chromatin und lange DNA-Moleküle erleichtert (ESPINOSA und EMERSON, 2001). Diese Fähigkeit beruht möglicherweise auf einer gering affinen elektrostatischen Interaktion zwischen den zahlreichen C-terminal gelegenen Lysinresten und dem phosphathaltigen Rückgrat der DNA (FRIEDLER *et al.* 2005). Laut LAPTENKO *et al.* 2015 ist der C-Term ein entscheidender Faktor für die sequenzspezifische Bindung, welche im Zentrum von p53 stattfindet, da mutierte Formen von p53 mit verändertem C-Terminus weniger DNA-Moleküle erkennen und fest binden konnten als Wildtyp-p53. Die Autoren zeigten, dass der C-Terminus in der Lage ist, strukturelle Veränderungen innerhalb der zentralen DNA-Bindedomäne zu verursachen, welche wichtig für eine stabile DNA-Bindung sind.

Da zahlreiche Proteine wie etwa der Coaktivator p300 oder der Antikörper PAb421 an den C-Terminus des Tumorsuppressors p53 binden und diesen beeinflussen können, lag es auf der Hand zu untersuchen, ob auch das c-terminal bindende Np9 in dieser Hinsicht wirksam ist. Allgemein scheinen c-terminal interagierende Proteine die DNA-Bindungsfähigkeit von zuvor bindungsunfähigem, bakteriell produziertem p53 im Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) aktivieren zu können (HUPP *et al.* 1992; GU und ROEDER, 1997). Der EMSA ist eine Form der Affinitätsselektrophorese, welche hier eingesetzt wurde, um die *in vitro*-Bindung von p53 an eine bekannte DNA-Sequenz nachzuweisen. Dabei führt die Proteinbindung zu einem verzögerten Laufen der markierten DNA-Probe im nativen Gel. Anders als die Bindung von PAb421 an p53 oder dessen Acetylierung durch p300, war Np9 allein nicht in der Lage, die sequenzspezifische Bindungsfähigkeit von p53 zu reaktivieren und somit seine Funktion als Transkriptionsfaktor zu starten. Nur bei zusätzlicher Anwesenheit von PAb421 kam es zur erwünschten Bindung des Tumorsuppressors an seine DNA-Erkennungssequenz, die durch Np9-haltiges Baculovirus-Extrakt geringfügig gesteigert werden konnte. In einem weiteren Experiment bestätigte sich der positive Effekt von Np9: bei zusätzlicher Inkubation mit Np9-Antikörper nahm die Bindungskapazität des Tumorsuppressors in Anwesenheit von Np9 wieder ab. Es handelte sich um einen polyklonalen Antikörper, der an verschiedenen Stellen von Np9 ansetzen und somit die Bindung von Np9 an den Tumorsuppressor p53 hemmen konnte. Insgesamt lässt sich schließen, dass auch Np9, zumindest *in vitro*, durchaus in der Lage ist, durch Bindung an die regulatorische Domäne im Bereich des C-Terminus von p53 dessen spezifische Bindungsfähigkeit zu unterstützen und seine Funktion als Transkriptionsfaktor zu starten. Np9 könnte somit Tumorsuppressoreigenschaften haben.

Während Np9 rein hominidenspezifisch ist, finden sich andere endogenen retrovirale Sequenzen auch innerhalb der DNA von Haustieren, so beispielsweise zahlreiche, jedoch größtenteils nur noch fragmentiert erhaltene, gamma- und betavirale endogene Elemente beim Pferd. Einzig EqERV-beta1 ist bisher als vollständig erhaltenes equines Provirus bekannt. Es hat phylogenetische Ähnlichkeit mit retroviralen Sequenzen, welche sich bei Rindern finden, sowie mit dem bei Mäusen bekannten murinen Beta-Retrovirus MMTV (ANTOINETTE und VAN DER KUYL, 2011). p53-Knockout-Mäuse, welche MMTV tragen, entwickeln schneller Mammatumore, als solche, welche zwar MMTV, jedoch auch den Tumorsuppressor p53 exprimieren (HUNDLEY *et al.* 1997).

Somit könnte die Methodik dieser Arbeit möglicherweise auch als Forschungsgrundlage zu endogenen Retrovirusproteinen beim Pferd dienen.

Entsprechend der Resultate dieser Arbeit erhöhte die Co-Expression von Np9 und p53 die Transaktivierungsaktivität von p53 in signifikantem Maße. Dies galt interessanterweise auch bei gleichzeitiger Expression von MDM2, einem Inhibitor von p53. In der Zwischenzeit konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass Np9 auch in der Lage ist, den Tumorsuppressor p53 indirekt zu fördern, indem es an dessen Antagonisten MDM2 bindet und diesen hemmt (HEYNE *et al.* 2015).

MDM2 ubiquitinyliert p53 und andere Proteine und markiert sie somit für den proteasomalen Abbau. So zeigten RIVERA-CALDERÓN *et al.* 2016 eine deutlich stärkere MDM2-Expression und folglich verringerte Expression von p53 in caninen Prostatakarzinomen im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe.

Np9 hemmte die Ubiquitinylierung von p53 durch MDM2 im Zellkern, wo sich neben p53 und MDM2 ja auch Np9 überwiegend befand (HEYNE *et al.* 2015). HEYNE *et al.* zeigten außerdem, dass Np9 an das Zentrum von MDM2 mit seiner zentralen azidischen Domäne, sowie in geringerem Maße auch an die c-terminal gelegene RING-Domäne von MDM2 bindet.

Neben Np9 binden auch z. B. die ribosomalen Proteine L5, L11 und L23 an die zentrale Domäne von MDM2. Letztere tun dies, um den Tumorsuppressor p53 im Falle von ribosomalem oder nukleolärem Stress zu aktivieren (ZHANG und LU, 2009). Möglicherweise ist Np9 also ein hominiden-spezifisches Mitglied der Gruppe der nukleolären p53-regulierenden Proteine (HEYNE *et al.* 2015).

Np9 wird von bestimmten humanen endogenen retroviralen Sequenzen (HERVs) exprimiert. HERV-K (HML-2)-Sequenzen werden in zahlreichen normalen Geweben transkribiert. Die stärkste Proteinexpression, Bildung retroviraler Partikel und entsprechende Immunantwort findet sich allerdings in Stammzellen und stammzellähnlichen Vorläuferzellen, sowie verschiedenen Krebszellen, darunter Keimzelltumoren (RUPRECHT *et al.* 2008, SCHMITT *et al.* 2015). Erhöhte *np9*-Transkriptionsraten und Transkriptionsraten anderer HERV-Gene dienen als Marker für unterschiedliche pluripotente Stammzellen, da die Transkriptionsraten

nach deren Differenzierung schlagartig abnehmen (FUCHS *et al.* 2013). Nicht zuletzt ist Np9 auch ein bekannter Bindungspartner des Promyelocytic Leukemia Zink Finger Proteins (PLZF) sowie des Testikular Zink Finger Proteins (DENNE *et al.* 2007; KAUFMANN *et al.* 2010), welche an der Selbsterneuerung von spermatogonischen Stammzellen beteiligt sind (BUAAS *et al.* 2004; COSTOYA *et al.* 2004). Auch die Bedeutung des Tumorsuppressors p53 für die Regulation der Erhaltung der genetischen Stabilität nach genotoxischen Einflüssen von Stammzellen, sowie deren Proliferation und Differenzierung wird immer deutlicher (SOLOZOBOVA *et al.* 2009). Die p53-MDM2-Interaktion ist bereits in embryonalen Stammzellen funktionsfähig (VASSILEV *et al.* 2004) und scheint ein wichtiger Regulator des Stammzellkompartments zu sein (SPIKE und WAHL, 2011). Möglicherweise spielt Np9 also über die PLZF/TZF- und p53/MDM2-Signalwege eine Hominiden-spezifische Rolle bei der Stammzellregulation (HEYNE *et al.* 2015), womöglich in dem es p53 als Transkriptionsfaktor unterstützt.

6 Zusammenfassung

Anne Himber

Molekularbiologische Untersuchungen zur Interaktion des humanen endogenen Retrovirus K - Proteins Np9 mit dem Tumorsuppressor p53

Medizinische Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und

José Carreras Zentrum für Immun- und Gentherapie der Universität des Saarlandes

Eingereicht im September 2016

71 Seiten, 21 Abbildungen, 13 Tabellen, 127 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Tumorsuppressor, humanes endogenes Retrovirus, p53, Np9, Hominiden

Einleitung: Der seit über 30 Jahren ausgiebig erforschte Transkriptionsfaktor p53 besitzt offenbar Funktionen, die über seine bekannte und gut untersuchte Aktivität als Tumorsuppressor hinausgehen. So scheint er auch an der Regulation der menschlichen Lebenserwartung - über die Vermittlung einer allgemeinen physischen Robustheit - sowie der weiblichen Fertilität beteiligt zu sein. Insbesondere Primaten zeichnen sich durch eine vergleichsweise lange Lebenserwartung und eine lange reproduktive Phase aus. Ob p53 hier eine Rolle spielen könnte, ist unbekannt. Unsere Arbeitsgruppe entdeckte vor einigen Jahren das humane endogene Retrovirus-K (HERV-K) Protein Np9, dessen Gen sich in mehreren Kopien nur bei Menschen, Schimpansen und Gorillas findet. Weitere Untersuchungen wiesen außerdem darauf hin, dass Np9 an den Tumorsuppressor p53 zu binden vermag.

Ziele der Untersuchungen: Es stellte sich also die Frage, ob die Funktion von p53 durch die Bindung an Np9 moduliert werden kann. Eine derartige Modulation des multifunktionellen Transkriptionsfaktors wäre natürlich auf Hominiden beschränkt. In der vorliegenden Arbeit sollten einige Teilaspekte der Interaktion von p53 und Np9 näher untersucht werden.

Material und Methoden: Für die Bindungskartierung von p53 und Np9 wurden GST-Pulldown-Analysen durchgeführt. Die GST-Protein-Plasmide wurden in *E.coli* BL21 transformiert und nach Induktion mit IPTG exprimiert. Sie dienten als „Fängerproteine“ und waren dank ihres Glutathion-S-Transferase-tags in der Lage an GST-Sepharose-Kügelchen zu binden. Der putative Interaktionspartner als „Beuteprotein“ wurde in vitro translatiert und in diesem Zuge auch mit ³⁵S radioaktiv markiert. Dann wurde er mit den an die Beads

gebundenen GST-Proteinen inkubiert und anschließend die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf eine Membran übertragen und der Blot auf einen Radioaktivfilm aufgelegt, woraufhin die Protein-Protein-Bindungen anhand des radioaktiven Beuteproteins als Banden erkennbar waren. Abschließend wurde der Blot mit GST-Antikörper inkubiert, dann am Folgetag mit Anti-Mouse-Antikörper. Mittels ECL Substrat konnte nun die Bindung der GST-getaggten Proteine an die Sepharosebeads nachgewiesen werden.

Für den Electrophoretic Mobility Shift Assay wurden verschiedene Versuchsansätze pipettiert, welchen nach einer Inkubationszeit das zuvor mit ^{32}P radioaktiv markierte Oligonukleotid zugegeben wurde. Nach erneuter Inkubation wurden die Proben auf das nicht-denaturierende EMSA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden die Protein-Oligonukleotid-Verbindungen gemäß ihrer Ladung, Größe und Konformation getrennt. Die Gele wurden im Gelrockner getrocknet und direkt mit einer Verstärkerfolie auf den Radioaktivfilm in einer Radioaktivkassette aufgelegt.

Ergebnisse: Zunächst war es notwendig, die Bindung der beiden Partner biochemisch zu kartieren. Dies geschah mittels der GST-Pulldown-Analyse, in der Fragmente der Proteine exprimiert, miteinander inkubiert und schließlich kopräzipitiert wurden. Es stellte sich heraus, dass p53 mit seinem C-Terminus an Np9 bindet. Np9 hingegen band mit seinen Aminosäureresten (aa) 1-64 (ohne den C-terminus mit den aa 65-74) an p53. Das Np9-Fragment 36-74 zeigte nur eine schwache Bindung an p53. Interessanterweise band das Np9-Fragment 36-64 stärker an p53 als Volllängen-Np9 (1-74), was auf eine die Interaktion hemmende Domäne im C-Terminus von Np9 hinweisen könnte.

Um zu untersuchen, ob die Bindung von Np9 an den C-Terminus von p53 die p53-DNA-Interaktion beeinflusst, wurden Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Np9-zumindest *in vitro*-durch Bindung an die regulatorische Domäne von p53 und in Anwesenheit des p53-aktivierenden Antikörpers PAb421 in der Lage war, die spezifische Bindungsfähigkeit von p53 an DNA zu erhöhen und somit seine Funktion als Transkriptionsfaktor zu unterstützen.

Schlussfolgerungen: Die Resultate weisen also erstmals darauf hin, dass das nukleäre HERV-K Protein Np9 spezifisch in Hominiden eine p53-abhängige Tumorsuppressoreigenschaft aufweisen könnte. Weitere Untersuchungen-insbesondere *in vivo*-sind nun notwendig. Dies könnte auch als Forschungsgrundlage zu endogenen Retrovirusproteinen beim Pferd dienen.

7 Summary

Molecular-biological studies of the interaction between the Np9 protein of human endogenous retrovirus K and the tumor suppressor p53

Large Animal Clinic for Internal Medicine of the University of Leipzig

and

José Carreras Center for Immuno- and Gene-Therapy of the University of Saarland

Submitted in September, 2016

71 pages, 21 figures, 13 tables, 127 references

Keywords: tumor suppressor, human endogenous retrovirus, p53, Np9, hominid

Introduction: The transcription factor p53, extensively investigated for over 30 years, apparently has functions which exceeds his known and well examined activity as a tumor suppressor. It seems to be involved in the regulation of the human life expectancy – by providing a general physical robustness - as well as of the female fecundity. Primates too are characterized by a comparatively long life expectancy and long reproductive phases, yet the possible influence of p53 is unknown.

Our research group has discovered some years ago the Np9 protein of human endogenous retrovirus K (HERV K), which is found in several copies only with humans, chimpanzees and gorillas.

Other investigations by our group suggested that Np9 might be able to interact with the tumor suppressor p53.

Objective of the investigations: To study whether the function of p53 can be modulated by the interaction with Np9. Such a modulation of the multifunctional transcription factor would of course be limited to hominids. In the present work some aspects of the interaction between p53 and Np9 were analysed.

Materials and methods: For the mapping of the interaction of p53 and Np9, GST pulldown assays were carried out. The GST protein plasmids were transformed in *E. coli* BL21 and expressed after IPTG induction. They served as bait proteins and bound to GST sepharose beads because of their Glutathione S-transferase-tags. The putative interaction partner as a prey protein was translated *in vitro* and radioactively marked with ³⁵S. After being incubated with the GST-proteins bound to the beads, the samples were transferred on a SDS gel and

separated. The gel was transferred to a membrane and the blot was exposed to an X-ray film. Thus, the radioactively labelled prey protein forms bands that identify the protein-protein interaction.

Finally the blot was incubated with GST antibody, then on the following day with anti-mouse antibody. Using ECL-substrate it was now possible to demonstrate that the GST-tagged proteins bound to the sepharose beads.

For the Electrophoretic Mobility Shift Assay different samples were prepared and, after an incubation time, the oligonucleotide radioactively marked with ^{32}P was added. After additional incubation it was transferred on non-denaturing EMSA gel and separated by electrophoresis. Thus the protein oligonucleotide conjugates were separated according to charge, size and conformation. The gels were dried in the gel dryer, transferred to a membrane and placed against an X-ray film in a cassette.

Results: Initially a biochemical mapping of the binding of the two partners had to be carried out. This was done by means of the GST pulldown assay, in which fragments of the proteins were extruded, incubated together and finally co-precipitated. It turned out that the C-terminus of p53 bound to Np9. However, Np9 bound to p53 with his amino acid residues (aa) 1-64 (lacking the C-terminal aa 65-74). The Np9 fragment 36-74 showed only a weak binding to p53. Interestingly the Np9 fragment 36-64 was binding stronger to p53 than a full length Np9 (1-74), which could point to a C-terminal domain in Np 9 inhibiting the interaction.

In order to examine whether the binding of Np9 to the C-terminal of p53 affects the interaction of p53 with DNA, Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) were carried out. It could be shown that Np9 was able to raise the specific binding ability of p53 with DNA and to support therefore its function as a transcription factor, by binding to the regulatory domain of p53 in presence of the activating p53 antibody PAB421.

Conclusions: The results show for the first time that, specifically in hominids, the nuclear HERV-K protein Np9 could have a tumor suppressing quality that is dependent on p53. Further investigations, in particular *in vivo*, are necessary. This could be the starting point for research on equine endogenous retrovirusproteins in horses.

8 Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molekularbiologie der Zelle. 4.Aufl. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.

An W, Kim J, Roeder RG. Ordered Cooperative Functions of PRMT1, p300, and CARM1 in Transcriptional Activation by p53. *Cell*. 2004;117:735-748.

Anderson ME, Woelker B, Reed M, Wang P, Tegtmeyer P. Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation. *Molecular and Biology*. 1997;17:6255-6264.

Armbruester V, Sauter M, Krautkraemer E, Meese E, Kleiman A, Best B, Roemer K, Mueller-Lantzsch N. A Novel Gene from the Human Endogenous Retrovirus K Expressed in Transformed Cells. *Clinical Cancer Research*. 2002;8:1800-1807.

Armbruester V, Sauter M, Roemer K, Best B, Hahn S, Nty A, Schmid A, Philipp S, Mueller A, Mueller-Lantzsch N. Np9 Protein of Human Endogenous Retrovirus K Interacts with Ligand of Numb Protein X. *Journal of Virology*. 2004;78:10310-10319.

Ayed A, Mulder FAA, Yi G-S, Lu Y, Kay LE, Arrowsmith CH. Latent and active p53 are identical in conformation. *Nature Structural Biology*. 2001;8:756-760.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*. 1989;244:217-221.

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer research*. 1990;50:7717-7722.

Banerji S, Kanjilal N. Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *American Journal of Veterinary Research*. 2006;67:1766-1772.

Bannert N, Kurth R. The Evolutionary Dynamics of Human Endogenous Retroviral Families. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2006;7:149-173.

Barbulescu M, Turner G, Seaman MI, Deinard AS, Kidd KK, Lenz J. Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Current Biology*. 1999;9:861-868.

Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, Berger SL. Acetylation of p53 Activates Transcription through Recruitment of Coactivators/Histone Acetyltransferases. *Molecular Cell*. 2001;8:1243-1254.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220:868-871.

Beaudry GA, Bertelsen AH, Sherman MI. Therapeutic targeting of the p53 tumor suppressor gene. *Current Opinion in Biotechnology*. 1996;7:592-600.

Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Sheer D, Shows TB, Bruns GAP, Peacock J. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 1985;11:505-510.

Bénit L, Lallemand JB, Casella JF, Philippe H, Heidmann T. ERV-L Elements: a Family of Endogenous Retrovirus-Like Elements Active throughout the Evolution of Mammals. *Journal of Virology*. April 1999;73:3301-3308.

Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4:793-805.

Boese A, Sauter M, Galli U, Best B, Herbst H, Mayer J, Kremmer E, Roemer K, Mueller-Lantzsch N. Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Oncogene*. 2000;19:4328-4336.

Boller K, König H, Sauter M, Mueller-Lantzsch N, Löwer R, Löwer J, Kurth R. Evidence That HERV-K Is the Endogenous Retrovirus Sequence That Codes for the Human Teratocarcinoma-Derived Retrovirus HTDV. *Virology*. 1993;196:349-353.

Bouck N, Stellmach V, Hsu S. *Advances in Cancer Research*. Academic Press. 1996;69:135-172.

Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nature Genetics*. 2004;36:647-652.

Büscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J. Expression of Human Endogenous Retrovirus K in Melanomas and Melanoma Cell Lines. *Cancer Research*. 2005;65:4172.

Caron de Fromental C, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 1992;4:1-15.

Carter J, Saunders V. *Virology: Principles and Applications*. 1. Aufl. New Jersey: John Wiley & Sons; 2007.

Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes and Development*. 1996;10:2438-2451.

Chuikov S, Kurash JK, Wilson JR, Xiao B, Justin N, Ivanov GS, McKinney K, Tempst P, Prives C, Gambelin SJ, Barlev NA, Reinberg D. Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature*. 2004;432:353-360.

Clore GM, Ernst J, Clubb R, Omichinski JG, Kennedy WMP, Sakaguchi K, Appella E, Gronenborn AM. Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumor suppressor p53. *Nature*. 1995;2:321-333.

Clore GM, Omichinski JG, Sakaguchi K, Zambrano N, Sakamoto H, Appella E, Gronenborn AM. High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science*. 1994;265:386-391.

Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature Genetics*. 2004;36:653-659.

DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubios GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. PNAS. 1979;76:2420-2424.

Denne M, Sauter M, Armbruester V, Licht JD, Roemer K, Mueller-Lantzsch N. Physical and Functional Interactions of Human Endogenous Retrovirus Proteins Np9 and Rec with the Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein. Journal of Virology. 2007;81:5607-5616.

Espinosa JM, Emerson BM. Transcriptional Regulation by p53 through Intrinsic DNA/Chromatin Binding and Site-Directed Cofactor Recruitment. Molecular Cell. 2001;8:57-69.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. International Committee on Taxonomy of Viruses, Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.; 2004.

Feng Z, Hu W, Rajagopal G, Levine AJ. The tumor suppressor p53: Cancer and aging. Cell Cycle. 2008;7:842-847.

Frank O, Giehl M, Zheng C, Hehlmann R, Leib-Mösch C, Seifarth W. Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders. Journal of Virology. 2005;79:10890-10901.

Friedler A, Veprintsev DB, Freund SM, von Glos KI, Fersht AR. Modulation of binding of DNA to the C-terminal domain of p53 by acetylation. Structure. 2005;13:629-636.

Fuchs NV, Loewer S, Daley GD, Izsvák Z, Löwer J, Löwer R. Human endogenous retrovirus K (HML-2) RNA and protein expression is a marker for human embryonic and induced pluripotent stem cells. Retrovirology. 2015;10:1-6.

Gross H, Barth S, Pfuhl T, Willnecker V, Spurk A, Gurtsevitch V, Sauter M, Hu B, Noessner E, Mueller-Lantzsch N, Kremmer E, Grässer FA. The NP9 protein encoded by the human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) negatively regulates gene activation of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2). International Journal of Cancer. 2011;129:1105-1115.

Gu J, Nie L, Wiederschain D, Yuan Z-M. Identification of p53 Sequence Elements That Are Required for MDM2-Mediated Nuclear Export. *Molecular and Cellular Biology*. 2001;21:8533-8546.

Gu W, Roeder RG. Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell*. 1997;90:595-606.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387:269-299.

Heimdal K, Olsson H, Tretli S, Fossa SD, Borresen AL, Bishop DT. A segregation analysis of testicular cancer based on Norwegian and Swedish families. *British Journal of Cancer*. 1997;75:1084-1087.

Herbst H, Kühler-Obbarius C, Lauke H, Sauter M, Mueller-Lantsch N, Harms D, Löning T. Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in gonadoblastomas and gonadoblastoma-derived germ cell tumours. *Virchows Archiv*. 1999;443:11-15.

Herbst H, Sauter M, Mueller-Lantsch N. Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. *The American Journal of Pathology*. 1996;149:1727-1735.

Hershay AE, Dubielzig RR, Padilla ML, Helfand SC. Aberrant p53 Expression in Feline Vaccine-associated Sarcomas and Correlation with Prognosis. *Veterinary Pathology*. November 2005;6:805-811.

Heyne K, Kölsch K, Bruand M, Kremmer E, Grässer FA, Mayer J, Klaus Roemer K. Np9, a cellular protein of retroviral ancestry restricted to human, chimpanzee and gorilla, binds and regulates ubiquitin ligase MDM2. *Cell Cycle*. 2015;14:2619-2633

Heyne K, Kölsch K, Bruand M, Kremmer E, Grässer FA, Mayer J, Roemer K. Np9, a cellular protein of retroviral ancestry restricted to human, chimpanzee and gorilla, binds and regulates ubiquitin ligase MDM2. *Cell Cycle*. 2015;14:2119-2137.

Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sørliie T, Hovig E, Smith-Sørensen B, Montesano R, Harris CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Research*. 1994;22:3551-3555.

Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Research*. 1996;24:141-146.

Hoover EA, Mullins JI. Feline leukemia virus infection and diseases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1991;199:1287-1297.

Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*. 2007;450:721-724.

Hundley JE, Koester SK, Troyer DA, Hilsenbeck SG, Subler MA, Windle JJ. Increased tumor proliferation and genomic instability without decreased apoptosis in MMTV-ras mice deficient in p53. *Molecular and Cellular Biology*. Februar 1997;17:723-731.

Hupp TR, Lane DP. Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Current Biology*. 1994;4:865-875.

Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell*. 1992;71:875-886.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM . Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 1986;320:84-85.

Jarrett, Oswald. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Veterinary Microbiology*. 1999;69:99-107.

Jasienska, G. Reproduction and lifespan: Trade-offs, overall energy budgets, intergenerational costs and costs neglected by research. *American Journal of Human Biology*. 2009;21:524-532.

Jayaraman L, Prives C. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus. *Cell*. 1995;81:1021-1029.

Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ, Hu W. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *PNAS*. 2009;106:9761-9766.

Kaufmann S, Sauter M, Schmitt M, Baumert B, Best B, Boese A, Roemer K, Mueller-Lantsch N. Human endogenous retrovirus protein Rec interacts with the testicular zinc-finger protein and androgen receptor. *Journal of General Virology*. 2010;91:1494-1502.

Koshino A, Goto-Koshino Y, Setoguchi A, Ohno K., Tsujimoto H. Mutation of p53 Gene and Its Correlation with the Clinical Outcome in Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2016;30:223-229.

Kraiss S, Quaiser A, Oren M, Montenarh M. Oligomerization of oncoprotein p53. *Journal of Virology*. 1988;62:4737-4744.

Kress M, May E, Cassingena R, May P. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *Journal of Virology*. 1979;90:472-483.

Kubbutat MHG, Ludwig RL, Ashcroft M, Vousden KH. Regulation of Mdm2-Directed Degradation by the C Terminus of p53. *Molecular and Cellular Biology*, 1998;18:5690-5698.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature*. 1979;278:261-263.

Lane, DP. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358:15-16.

Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death & Differentiation*. 2006;13:951-961.

Laptenko O, Shiff I, Freed-Pastor W, Zupnick A, Mattia M, Freulich E, Shamir I, Kadouri N, Kahan T, Manfredi J, Simon I, Prives C. The p53 C Terminus Controls Site-Specific DNA Binding and Promotes Structural Changes within the Central DNA Binding Domain. *Molecular Cell*. 2015;57:1034-1046.

Lavigne A, Maltby V, Mock D, Rossant J, Pawson T, Bernstein A. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Molecular and Cellular Biology*. 1989;9:3982-3991.

Lee H, Mok KH, Muhandiram R, Park KH, Suk JE, Kim DH, Chang J, Sung YC, Choi KY, Han KH. Local structural elements in the mostly unstructured transcriptional activation domain of human p53. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:29426-29433.

Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9:749-758.

Levine, AJ. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*. 1997;88:323-331.

Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:50607-50611.

Lindblad-To K, und zahlreiche weitere. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 2005;438:803-819.

Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell Press*. 1979;17:43-52.

Lohrum MAE, Woods DB, Ludwig RL, Bálint É, Vousden KH. C-Terminal Ubiquitination of p53 Contributes to Nuclear Export. *Molecular and Cellular Biology*. 2001;21:8521-8532.

Löwer R, Boller B, Hasenmaier B, Korbmacher C, Müller-Lantzsch N, Löwer J, Kurth R. Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *PNAS*. 1993;90:4480-4484.

Löwer R, Löwer J, Kurt R. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *PNAS*. 1996;93:5177-5184.

Löwer R, Tönjes RR, Korbmacher C, Kurth R, Löwer, J. Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *Journal of Virology*. 1995;69:141-149.

Lozano G, Iwakuma T. MDM2, An Introduction. *Molecular Cancer Research*. 2003;1:993.

Lu H, Levine AJ. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *PNAS*. 1995;92:5154-5158.

Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG, Gu W. Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *PNAS*. 2004;101:2259–2264.

Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Guise T, Sutherland A, Thorner M, Scrable H. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes & Development*. 2004;18:306-319.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni Jr JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, al. et.. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990;290:1233-1238.

Marshall, CJ. Tumor suppressor genes. *Cell*. 1991;64:313-326.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999;18:7621-7636.

Mayer J, Meese E. Human endogenous retroviruses in the primate lineage and their influence on host genomes. *Cytogenetic and Genome Research*. 2005;110:448-456.

Mayer J, Sauter M, Rácz A, Scherer D, Mueller-Lantzsch N, Meese E. An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nature genetics*. 1999;21:257-258.

McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *PNAS*. 1986;83:130-134.

McKinney K, Mattia M, Gottifredi V, Prives C. p53 Linear Diffusion along DNA Requires Its C Terminus. *Molecular Cell*. 2004;16:413-424.

Midgley CA, Carol A, Lane DP, David P. p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene*. 1997;15:1179-1190.

Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature*. 1986;319:783-784.

Modrow S, Falke D, Truyen U. Molekulare Virologie. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2002.

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 1992;69:1237-1245.

Mount, SM. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Research*. 1982;10:459-472.

Mueller-Lantzsch N, Sauter M, Weißkircher A, Kramer K, Best B, Buck M, Grässer F. Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2009;9:343-350.

Mujtaba S, He Y, Zeng L, Yan S, Plotnikova O, Sachchidanand, Sanchez R, Zeleznik-Le NJ, Ronai Z, Zhou M-M. Structural Mechanism of the Bromodomain of the Coactivator CBP in p53 Transcriptional Activation. *Molecular Cell*. 2004;13:251-263.

Nakamura S, Roth JA, Mukhopadhyay T. Multiple Lysine Mutations in the C-Terminal Domain of p53 Interfere with MDM2-Dependent Protein Degradation and Ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20:9391-9398.

Nelson PN, Carnegie PR, Martin J, Ejtehadi HD, Hooley P, Roden D, Rowland-Jones S, Warren P, Astley J, Murray PG. Demystified ...Human endogenous retroviruses. *Journal of Clinical Pathology*. 2003;56:11-18.

Nelson PN, Lever AML, Smith S, Pitman R, Murray P, Perera SA, Westwood OMR, Hay FC, Ejtehadi HD, Booth JC. Molecular Investigations Implicate Human Endogenous Retroviruses as Mediators of Anti-Retroviral Antibodies in Autoimmune Rheumatic Disease. *Immunological Investigations: A Journal of Molecular and Cellular Immunology*. 1999;28:277-289.

Nelson, P N. Retroviruses in rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1995;54:441-442.

Nie L, Sasaki M, Maki CG. Regulation of p53 nuclear export through sequential changes in conformation and ubiquitination. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:14616-14625.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*. 1989;342:705-708.

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification Of A Gene Encoding A P53-associated Protein In Human Sarcomas. *Nature*. 1992;358:80-83.

Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler JW, Vogelstein B. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*. 1993;362:857-860.

Oren M, Reich NC, Levine AJ. Regulation of the cellular p53 tumor antigen in teratocarcinoma cells and their differentiated progeny. *Molecular and Cellular Biology*. 1982;2:443-449.

Oren, M. The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer*. 1985;823:67-78.

Pačes J, Pavlíček A, Zika R, Kapitonov VV, Jurka J, Pačes V. HERVd: the Human Endogenous RetroViruses Database: update. *Nucleic Acids Research*. 2004;32:1.

Pérot P, Mugnier N, Montgiraud C, Gimenez J, Jaillard M, Bonnaud B, Mallet F. Microarray-based sketches of the HERV transcriptome landscape. *Plos one*. 2012;7:1-16.

Pietenpol JA, Tokino T, Thiagalingam S, el-Deiry WS, Kinzler KW, Vogelstein B. Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *PNAS*. 1994;91:1998-2002.

Rivera-Calderón LG, Fonseca-Alves CE, Kobayashib PE, Carvalho M, Drigo SA, de Oliveira Vasconcelos R, Laufer-Amorim R. Alterations in PTEN, MDM2, TP53 and AR protein and gene expression are associated with canine prostate carcinogenesis. *Research in Veterinary Science*. 2016;106:56-61.

Rodriguez MS, Desterro JMP, Lain S, Lane DP, Hay RT. Multiple C-Terminal Lysine Residues Target p53 for Ubiquitin-Proteasome-Mediated Degradation. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20:8458-8467.

Rotter V, Aloni-Grinstein R, Schwartz D, Elkind NB, Simons A, Wolkowicz R, Lavigne M, Beserman P, Kapon A, Goldfinger N. Does wild-type p53 play a role in normal cell differentiation? *Seminars in Cancer Biology*. 1994;5:229-236.

Rotter V, Witte ON, Coffman R, Baltimore D. Abelson murine leukemia virus-induced -tumors elicit antibodies against a host cell protein, P50. *Journal of Virology*. 1980;36:547-555.

Ruprecht K, Ferreira H, Flockerzi A, Wahl S, Sauter M, Mayer J, Mueller-Lantzsch N. Human Endogenous Retrovirus Family HERV-K(HML-2) RNA Transcripts Are Selectively Packaged into Retroviral Particles Produced by the Human Germ Cell Tumor Line Tera-1 and Originate Mainly from a Provirus on Chromosome 22q11.21. *Journal of Virology*. 2008;82:10008-10016.

Sauter M, Schommer S, Kremmer E, Remberger K, Dölken G, Lemm I, Buck M, Best B, Neumann-Haefelin D, Mueller-Lantzsch N. Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *Journal of Virology*. 1995;69:414-421.

Sauter S, Roemer K, Best B, Afting M, Schommer S, Seitz G, Hartmann M, Mueller-Lantzsch N. Specificity of Antibodies Directed against Env Protein of Human Endogenous Retroviruses in Patients with Germ Cell Tumors. *Cancer Research*. 1996;56:4362.

Schmitt K, Heyne K, Roemer K, Meese E, Mayer J. HERV-K(HML-2) rec and np9 transcripts not restricted to disease but present in many normal human tissues. *Mobile DNA*. 2015;6:1-13.

Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, Kozlowski JM. The p53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer. *The Journal of Urology*. 2003;169:1219-1228.

Sohr S, Engeland K. The tumor suppressor p53 induces expression of the pregnancy-supporting human chorionic gonadotropin (hCG) CGB7 gene. *Cell Cycle*. 2011;10:3758-3767.

Solozobova V, Rolletschek A, Blattner C. Nuclear accumulation and activation of p53 in embryonic stem cells after DNA damage. *BMC Cell Biology*. 2009;10:1-11.

Spike BT, Wahl GM. p53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome. *Genes Cancer*. 2011;2:404-419.

Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *The EMBO Journal*. 1999;18:1660-1672.

Sugimoto J, Matsuura N, Kinjo Y, Takasu N, Oda T, Jinno Y. Transcriptionally Active HERV-K Genes: Identification, Isolation, and Chromosomal Mapping. *Genomics*. 2001;72:137-144.

Talal N, Flescher E, Dang H. Are endogenous retroviruses involved in human autoimmune disease? *Journal of Autoimmunity*. 1992;5:61-66.

Temin, HM. On the Origin of RNA Tumor Viruses. *Annual Review of Genetics*. 1974;8:155-177.

Thut CJ, Chen JL, Klemm R, Tjian R. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*. 1995;267:100-104.

Tönjes RR, Boller K, Limbach C, Lugert R, Kurth R. Characterization of Human Endogenous Retrovirus Type K Virus-like Particles Generated from Recombinant. *Virology*. 1997;233:280-291.

Tönjes RR, Limbach C, Löwer R, Kurth R. Characterization of human endogenous retrovirus type K virus-like particles generated from recombinant baculoviruses. *Virology*. 1997;233:280-291.

Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Gheranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Park SH, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 2001;415:45-53.

Van der Kuyl, AC. Characterization of a Full-Length Endogenous Beta-Retrovirus, EqERV-Beta1, in the Genome of the Horse (*Equus caballus*). *Viruses*. 2011;3:620-628.

Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science*. 2004;303:844-848.

Vogetseder W, Dumfahrt A, Mayersbach P, Schönitzer D, Dierich MP. Antibodies in human sera recognizing a recombinant outer membrane protein encoded by the envelope gene of the human endogenous retrovirus K. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1993;9:687-694.

Vojta PJ, Barrett JC. Genetic analysis of cellular senescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1995;1242:29-41.

Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes and Development*. 1993;7:1126-1132.

Wynford-Thomas, D. Cellular senescence and cancer. *The Journal of Pathology*. 1999;187:100-111.

Zhang J, Cho SJ, Shu L, Yan W, Guerrero T, Kent M, Skorupski K, Chen H, Chen X. Translational repression of p53 by RNPC1, a p53 target overexpressed in lymphomas. *Genes and Development*. 2011;25:1528-1543.

Zhang Y, Lu H. Signaling to p53: Ribosomal Proteins Find Their Way. *Cancer Cell*. 2009;16:369-377.

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Schusser dafür, mir den Anstoß dazu gegeben zu haben, eine Dissertation anzugehen und sich als Doktorvater zur Verfügung zu stellen. Darüber hinaus für die geduldige Ermunterung und die zahlreichen Emails, gerade in der Schlussphase der Arbeit.

Herrn Professor Römer danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Anleitung und Motivation, die erstklassige Betreuung und die zahllosen Ratschläge!

Ein besonderer Dank gilt auch Fr. Dr. Kristina Heyne für die Einweisung in die Laborarbeit, die vielen Tipps und Anregungen und die lustige Laboratmosphäre.

Chrissi und Tini, ihr seid die besten, ohne euch hätte ich nicht so viel gelacht und für eure Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und eure Geduld mit dem Laborneuling, der versucht Streichhölzer durch Scheiben auszupusten und nach Notdiensten mit dem Kopf auf dem Tisch einschläft, kann ich euch einfach nicht genug danken. Es hat unheimlich viel Spaß gemacht mit euch!

Ganz herzlich danke ich natürlich meiner Familie: meinem Vater, der meine Arbeit Korrektur gelesen und mir bei der Übersetzung geholfen hat; meinem Ehemann, der mich maßgeblich bei der Formatierung unterstützt hat, sowie meiner lieben Tante Usch für die finanzielle Unterstützung. Und nicht zuletzt meiner Mutter, die mir eine ständige moralische Stütze und mein größter Ansporn war. Danke Mama, auch für die regelmäßige Nervennahrung, ohne dich hätte ich es nicht durchgezogen!

Auch meinem Arbeitgeber Guido Arz und meinen Kolleginnen möchte ich herzlich dafür danken, dass sie mir die Flexibilität ermöglicht haben, meine Laborarbeit und die Tätigkeit in der Klinik unter einen Hut zu bekommen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Struktur des p53-Proteins und seiner Interaktionspartner.	6
Abbildung 2:	Entstehung von Np9 anhand der spezifischen Spleißdonorstelle von HERV-K 101 Typ 1.	11
Abbildung 3:	Insertionszeiten unterschiedlicher HERV-Familien in das Genom von menschlichen Vorfahren, Primaten und Affen.	13
Abbildung 4:	GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder von Fermentas (Quelle: Thermo scientific)	24
Abbildung 5:	PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas (Quelle: Thermo scientific)	25
Abbildung 6:	Vektor pGEX-4T1 von Amersham	26
Abbildung 7:	pcDNA 3.1 von Invitrogen (Quelle: invitrogen.com)	27
Abbildung 8:	Co-Immunpräzipitation als Nachweis der Bindung zwischen Np9 und p53. .	42
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der klonierten pcDNA 3.1. Neo-np9.....	45
Abbildung 10:	Gelelektrophorese des Leervektors pcDNA 3.1(+)-Neo und des Inserts <i>np9</i>	46
Abbildung 11:	Kontrollverdau der Klone 1-19 mit <i>Bam</i> HI.	46
Abbildung 12:	Kontroll- und Orientierungsverdau der zuvor in Abbildung 11 ausgewählten Klone.	47
Abbildung 13:	Induktion der Proteinexpression der pGEX 4T1 p53 – Fragmente.	49
Abbildung 14:	Proteinstruktur von p53 und deren Domänen:	50
Abbildung 15:	Induktion der Proteinexpression der pGEX 4T1 Np9-Fragmente.	51
Abbildung 16:	Gezeigt wird die Proteinstruktur von Np9.....	52
Abbildung 17:	GST-Pulldown und Bindungsnachweis der p53-Fragmente.	54
Abbildung 18:	GST-Pulldown und Bindungsnachweis der Np9-Fragmente.....	56
Abbildung 19:	Schematische Darstellung eines EMSA-Experimentes	59
Abbildung 20:	EMSA mit radioaktiv markierter Bindungssequenz für p53.	60
Abbildung 21:	EMSA mit radioaktiv markierter Bindungssequenz für p53.	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	15
Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen.....	17
Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper, deren Hersteller und die in den Experimenten eingesetzte Verdünnung	21
Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper, deren Hersteller und die in den Experimenten eingesetzte Verdünnung	21
Tabelle 5: Verwendete Restriktionsendonukleasen	22
Tabelle 6: Weitere verwendete Enzyme	22
Tabelle 7: Verwendete Reaktionskits und deren Hersteller	22
Tabelle 8: Einklonierte Fragmente in den Vektor pGEX-4T1	26
Tabelle 9: Rezepte zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel	33
Tabelle 10: Pipettierschema <i>In vitro</i> Translation (2x Ansatz)	37
Tabelle 11: Rezept zur Herstellung eines 4%igen EMSA-Geles.....	38
Tabelle 12: Pipettierschema zum labeln der Oligonukleotide	39
Tabelle 13: Pipettierschema EMSA	39