

**Physische und funktionelle Interaktionen zwischen
dem HERV-K(HML-2) Protein Rec und den zellulären
Proteinen Testis Zinkfinger Protein (TZFP) und dem
humanen Androgenrezeptor (AR)**

Dissertation

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

von

Sabine Kaufmann

geboren am 24.07.1980 in Saarbrücken

Saarbrücken, April 2009

Meinen Eltern gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- Third European Meeting der Gesellschaft für Virologie 2007, Nürnberg, Deutschland
- Annual Meeting der deutschen Gesellschaft für Virologie 2008, Heidelberg, Deutschland
- Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses 2008, New York, USA
- Annual Meeting der deutschen Gesellschaft für Virologie 2009, Leipzig, Deutschland

Wesentliche Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht in:

Sabine Kaufmann*, Marlies Sauter*, Martina Schmitt*, Bianca Baumert*, Barbara Best*, Klaus Roemer* * and Nikolaus Mueller-Lantzsch *:

Human Endogenous Retrovirus Protein Rec interacts with the Testicular Zinc Finger Protein TZFP and Androgen Receptor AR, in press

Vorwort

Herrn Prof. Dr. Müller-Lantzsch möchte ich von ganzem Herzen für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für seine fortwährende Unterstützung bei der Entwicklung neuer Ideen und für die großartige Möglichkeit, Teile dieser Arbeit auf internationalen Kongressen vorzustellen, danken.

Ganz besonders herzlich danke ich Frau Dr. Marlies Sauter, für die hervorragende Betreuung, Ihre intensive Unterstützung und alle wertvollen Ratschläge.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Klaus Römer, für seine stete Hilfsbereitschaft und seine zahlreichen Ideen.

Besonders möchte ich meiner Kollegin Frau Diplom Biologin Madeleine Herrmann für die schöne Zeit im Labor, ihre Hilfsbereitschaft in jeder Situation und vor allem für ihre Freundschaft danken.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Frau Barbara Best für Ihre Herzlichkeit, Ihre Ehrlichkeit, Ihre Geduld und nicht zuletzt für Ihre zahlreichen praktischen Tipps und Ihre wertvolle Hilfe bedanken.

Frau Diplom Biologin Martina Schmitt und Frau Bianca Baumert danke ich für Ihre Unterstützung des Projekts, Ihr Engagement und das gute Arbeitsklima.

Den Mitarbeitern der Virologie danke ich für ihre Kooperationsbereitschaft und Ihre freundliche Kollegialität.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Stephan, der mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet hat, mir stets hilfreich zur Seite gestanden hat und immer für mich da ist.

Ein weiterer herzlicher Dank geht an meine besten Freundinnen (B.P.), die mich immer ermutigt und aufgemuntert haben.

Mein allergrößter Dank gilt den besten Eltern der Welt, die mich liebevoll unterstützt haben und immer an mich glauben.

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	V
III	VERZEICHNIS DER TABELLEN	VI
IV	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	VII
1	EINLEITUNG	1
1.1	Viren	1
1.2	Retroviren	2
1.2.1	Klassifikation der Retroviren	4
1.3	Humane endogene Retroviren (HERV`s)	6
1.3.1	Entstehung und Verbreitung im Genom	6
1.3.2	Klassifizierung	9
1.3.3	Biologische Relevanz endogener Retroviren	12
1.3.3.1	<i>Vorteile retroviraler Insertionen für den Wirtsorganismus</i>	12
1.3.3.2	<i>Nachteile retroviraler Insertionen für den Wirtsorganismus</i>	13
1.4	Die HERV-K(HML-2) Familie	16
1.4.1	Identifikation und Unterteilung	16
1.4.2	Expression in humanen Geweben	17
1.4.2.1	Expression von Partikeln	18
1.4.2.2	Expression von Transkripten	19
1.4.2.3	Expression von Proteinen	20
1.4.3	Die Genprodukte des HERV-K(HML-2)	21
1.4.4	Das akzessorische Protein Rec	23
1.4.5	Das HERV-K Gen <i>np9</i>	25
1.5	Die Interaktionspartner	27
1.5.1	Das Testis Zinkfinger Protein TZFP und seine Funktion als transkriptioneller Repressor	27
1.5.2	Der humane Androgenrezeptor AR	30
1.6	Ziele der Arbeit	35
2.	MATERIAL	36
2.1	Puffer	36
2.2	Enzyme und dNTP`s	37
2.3	Molekulargewichtsmarker	37

2.4	Bakterienstämme und Nährmedien	38
2.5	Zelllinien	38
2.6	Zellkulturmedien für Säugerzellen	39
2.7	Antikörper	39
2.7.1	Monoklonale Antikörper	39
2.7.2	Polyklonale Antikörper	39
2.7.3	Peroxidase(POX)- gekoppelte Zweitantikörper	40
2.8	Chemikalien und andere Reagenzien	40
2.8.1	Chemikalien	40
2.8.2	„Kits“ und Transfektionsreagenzien	40
2.8.3	Photochemikalien	41
2.8.4	Radiochemikalien	41
2.9	Membranen	41
2.10	Oligonukleotide	41
2.11	Vektoren, Reporterplasmide und Konstrukte	41
2.11.1	Parentale Vektoren	41
2.11.2	Reporterplasmide	46
2.11.3	Konstrukte	49
2.12	Mikroskope, Computersoftware und Internetseiten	53
3.	METHODEN	54
3.1	DNA-Techniken	54
3.1.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	54
3.1.2	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	55
3.1.3	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	55
3.1.4	Spaltung von DNA durch Restriktionendonukleasen	56
3.1.5	Phosphatasebehandlung von Vektoren	57
3.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	57
3.1.7	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	57
3.1.8	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	58
3.1.9	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	59
3.2	Protein-Techniken	59
3.2.1	Herstellung von Proteinextrakten	59
3.2.1.1	Zellaufschluss unter nativen Bedingungen	59
3.2.1.2	Zellaufschluss unter reduzierenden Bedingungen	60

3.2.1.3	Proteinsynthese durch <i>in vitro</i> Transkription und Translation	60
3.2.2	Techniken zum Nachweis von Proteinen	60
3.2.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	60
3.2.2.2	Westernblot	62
3.2.2.3	Nachweis von Proteinen im SDS-Gel	63
3.2.2.4	Nachweis radioaktiv- markierter Proteine durch Autoradiographie	63
3.2.3	Techniken zum Nachweis der subzellulären Proteinlokalisierung	64
3.2.3.1	Detektion autofluoreszierender Proteine durch Fluoreszenz- mikroskopie	64
3.2.3.2	Anfärben von zellulärer DNA mit dem DAPI- Reagenz	64
3.2.4	Methoden zur Detektion und Analyse von Protein-Protein Interaktionen	58
3.2.4.1	GST- Pulldown Analysen	58
3.2.4.2	Coimmunpräzipitation	66
3.2.4.3	Luciferase- Reporter- Assay	67
3.2.4.4	Kolokalisationsassay	68
3.2.5	Herstellung von Antikörpern im Kaninchen	68
3.2.5.1	Herstellung von Protein zur Immunisierung	68
3.2.5.2	Immunisierung der Kaninchen	69
3.3	Bakterien- und Zellkultur- Techniken	70
3.3.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> - Stämmen	70
3.3.2	Blue/White- Screening	70
3.3.3	Kultivierung und Lagerung von Säugerzelllinien	71
3.3.4	Zellzahlbestimmung durch Durchflusszytometrie	71
3.3.3	Zellwachstums-Assay	71
3.3.4	Luciferase-Reporteragen-Assay	71
3.3.5	Transformation von Zellen	72
3.3.5.1	Transformation von Bakterienzellen	72
3.3.5.2	Transformation von Säugerzellen	73
3.3.5.2.1	Transfektion mit <i>FuGENE-6</i>	73
3.3.5.2.2	Transfektion mit NanofectinI	73
4.	ERGEBNISSE	74

4.1	Interaktion von HERV-K-Rec und dem Testis Zink Finger Protein TZFP	74
4.1.1	Studien zur Bindung von HERV-K Rec und TZFP in Gluthation-S-Transferase (GST)- Pulldown Experimenten <i>in vitro</i>	74
4.1.2	Studien zur Bindung von HERV-K Rec und TZFP durch Coimmunpräzipitation <i>in vivo</i>	76
4.1.3	Studien zur Charakterisierung der Bindungsstelle TZFP und Rec <i>in vitro</i>	77
4.1.4	Studien zur Charakterisierung der Bindungsstelle TZFP und Rec <i>in vivo</i>	82
4.1.5	Amplifikation von Spleißvarianten des Testis Zink Finger Proteins aus einer Testis cDNA- Bank	84
4.1.6	Studien zur Bindung von Rec und den TZFP- Spleißvarianten in Gluthation-S-Transferase (GST)- Pulldown Experimenten <i>in vitro</i>	85
4.1.7	Studien zur Bindung zwischen Rec und den TZFP- Spleißvarianten <i>in vivo</i>	86
4.2	Interaktion von HERV-K(HML-2) Rec, TZFP und dem humanen Androgenrezeptor	88
4.2.1	Studien zur Bindung von TZFP und AR in Gluthation-S- Transferase (GST)- Pulldown Experimenten <i>in vitro</i>	88
4.2.2	Studien zur Bindung der HERV-K- Proteine Rec und Np9 mit dem Androgenrezeptor in Gluthation-S-Transferase (GST)- Pulldown Experimenten <i>in vitro</i>	89
4.2.3	Studien zur Bindung zwischen dem humane Testis Zink Finger Protein TZFP und dem humanen Androgenrezeptor <i>in vivo</i>	91
4.2.4	Studien zur Bindung zwischen dem humanen Testis Zinkfinger Protein TZFP, dem humanen Androgenrezeptor und HERV-K (HML-2) Rec <i>in vivo</i>	92
4.3	Funktionelle Analyse der Interaktionen von HERV- K(HML-2)- Rec, dem Testis Zink Finger Protein TZFP und dem humanen Androgenrezeptor	95

4.3.1	Der <i>c-myc</i> Promotor	95
4.3.1.1	<i>TZFP</i> reprimiert <i>c-myc</i>	95
4.3.1.2	Rec inhibiert die durch <i>TZFP</i> vermittelte Repression des <i>c-myc</i> - Promotors	99
4.3.2	Der MMTV- Luc- Promotor	101
4.3.2.1	Der Androgenrezeptor aktiviert das MMTV- Luc Reportergen- Repression der AR- vermittelten Transaktivierung durch <i>TZFP</i>	102
4.3.2.2	Einfluss von Rec auf die Wechselwirkung zwischen AR und <i>TZFP</i>	103
4.3.3	Der PSA- Promotor	105
4.3.3.1	Der Androgenrezeptor aktiviert das PSA- Luc- Reportergen - Repression des Androgenrezeptor durch <i>TZFP</i>	106
4.3.3.2	Einfluss von Rec auf die Wechselwirkung zwischen AR und <i>TZFP</i>	107
5.	DISKUSSION	110
5.1	<i>TZFP</i> - Deletionsmutanten und <i>TZFP</i> - Spleißvarianten	112
5.2	Interaktion von HERV-K Rec und dem Testis Zink Finger Protein <i>TZFP</i>	113
5.3	HERV-K Np9 interagiert mit dem Testis Zink Finger Protein	117
5.4	Der Androgenrezeptor interagiert mit Rec, Np9 und <i>TZFP</i>	117
5.5	<i>TZFP</i> reprimiert das Proto- Onkogen <i>c-myc</i>	118
5.6	Der Androgenrezeptor aktiviert das MMTV- Luc- Reportergen Repression der AR- vermittelten Transaktivierung durch <i>TZFP</i>	121
5.7	Rec hebt die reprimierende Wirkung von <i>TZFP</i> auf den Androgenrezeptor teilweise auf	122
5.8	Der Androgenrezeptor aktiviert das PSA- Luc- Reportergen Repression der AR- vermittelten Transaktivierung durch <i>TZFP</i>	123
5.9	Rec hebt die reprimierende Wirkung von <i>TZFP</i> auf den Androgenrezeptor teilweise auf	124
6.	ZUSAMMENFASSUNG	126

II VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1.1	Phylogenetik der Retroviren	6
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Proviren HERV-K101 und HERV-K(HML-2.HOM)	17
Abb. 1.3	Schematische Darstellung des codierenden Teils der TZFP- Sequenz	28
Abb. 1.4	Schematische Darstellung der Homologie zwischen TZFP und PLZF	30
Abb. 1.5	Schematische Darstellung des humanen Androgenrezeptors	33
Abb. 1.6	Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus der Androgene und ihres Androgenrezeptors	34
Abb. 2.1	Schematische Darstellung des MMTV- Luc- Plasmids	35
Abb. 4.1	Nachweis der Bindung zwischen Rec und TZFP <i>in vitro</i>	75
Abb. 4.2	Immunpräzipitation (IP) und Coimmunpräzipitation (CoIP) von TZFP durch Rec	76
Abb. 4.3	Schematische Darstellung des Gesamt- TZFP und der Deletionsmutanten und ihr Expressionsmuster	78
Abb. 4.4	Ergebnis der GST- Pulldown- Analyse von Rec/Np9 und Gesamt- TZFP sowie der TZFP- Deletionsmutanten	79
Abb. 4.5	Nachweis der Bindung zwischen TZFP und Rec und den Deletionsmutanten Rec-47/105, Rec 1.Exon und Rec-pes	81
Abb. 4.6	Immunpräzipitation (IP) und Coimmunpräzipitation (CoIP) von TZFP und den Deletionsmutanten durch Rec	83
Abb. 4.7	Schematische Darstellung der aus der Testis cDNA- Bank amplifizierten TZFP- Spleißvarianten	84
Abb. 4.8	Autoradiographie der GST- Pulldown- Analyse von Rec und den TZFP- Spleißvarianten α und β	85

Abb. 4.9	Immunpräzipitation (IP) und Coimmunpräzipitation (CoIP) von TZFP und den Spleißvarianten durch Rec	87
Abb. 4.10	Autoradiographie der GST- Pulldown- Analyse von TZFP und dem Androgenrezeptor	88
Abb. 4.11	Autoradiographie der GST- Pulldown- Analyse des humanen Androgenrezeptors und HERV-K Rec bzw. HERV-K Np9	90
Abb. 4.12	Immunpräzipitation (IP) und Coimmunpräzipitation (CoIP) von TZFP durch den Androgenrezeptor	91
Abb. 4.13	Immunpräzipitation (IP) und Coimmunpräzipitation (CoIP) von AR, TZFP und Rec	93
Abb. 4.14	TZFP reprimiert den <i>c-myc</i> - Promotor	97
Abb. 4.15	Bei Verwendung des <i>c-myc</i> 2.5 Δ PLZF- Promotors mit defekter PLZF- Bindungsstelle erfolgt keine durch TZFP vermittelte Repression	98
Abb. 4.16	Rec vermindert den reprimierenden Effekt von TZFP auf <i>c-myc</i>	100
Abb. 4.17	TZFP beeinflusst die Aktivierung des MMTV- Luc- Promotors durch den Androgenrezeptor	102
Abb. 4.18	Rec hebt die reprimierende Wirkung von TZFP auf den Androgenrezeptor auf	104
Abb. 4.19	TZFP beeinflusst die Aktivierung des PSA- Luc- Promotors durch den Androgenrezeptor	106
Abb. 4.20	Rec hebt die reprimierende Wirkung von TZFP auf den Androgenrezeptor auf	108
Abb. 5.1	Überblick der GST- Pulldown- Ergebnisse von Rec und den TZFP- Proteinen	114
Abb. 5.2	Überblick über die Ergebnisse der Coimmunpräzipitationen zwischen den TZFP- Proteinen und Rec	121
Abb. 5.3	Potenzielles Interaktionsmodell des <i>c-myc</i> - Pathways unter Einbeziehung von TZFP/PLZF und HERV-K Rec	124
Abb. 5.4	Potenzielles Interaktionsmodell AR-TZFP-HERV-K Rec	

III VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1	Charakteristische Vertreter der Retroviren	5
Tab. 2	Wichtigste Vertreter der humanen endogenen Retroviren	11
Tab. 3	Bezeichnung und Sequenzen der verwendeten Primer und Bezeichnung der entsprechenden klonierten Konstrukte	42/43

IV VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

α	alpha- oder anti- (z.B.: Antiserum)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS, aa	Aminosäure, <i>amino-acid</i>
APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AR	Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BLV	<i>bovine leukemia virus</i>
bp	Basenpaar
CA	Kapsidprotein
Chr.	Chromosom
CHX	Cycloheximid
CLSM	<i>confocale laserscanning- microscopy</i>
CMV	Cytomegalie-Virus
cORF	<i>central open reading frame</i>
C-term	Carboxyterminus
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP`s	Desoxynucleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
EBNA-2	<i>epstein- barr- nuclear- antigen 2</i>
EBV	Epstein Barr Virus

ECL	<i>enhanced- chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENV	<i>envelope protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERV	endogenes Retrovirus
FAZF	Fanconi Anämie Zink Finger
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
g	Gramm
Gag	gruppenspezifisches Antigen
GST	Glutathion-Sepharose-Transferase
h	Stunde
HERV-K	humanes endogenes Retrovirus K
HDAC2	Histondeacetylase 2
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HML	<i>human MMTV- like</i>
HTLV	humanes T-Zell Leukämie Virus
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo-
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
LNx	<i>ligand of Numb protein X</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	milli-
MA	Matrixprotein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Min	Minute
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
MoMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MPMV	<i>mason pfizer monkey virus</i>

μ	mycro-
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n	nano-
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NC	Nukleokapsid
Np9	<i>nuclear protein of 9 kDa</i>
N-term	Aminotermminus
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phospat buffer saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PLZF	<i>promyelocytic leukemia zinc finger</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
POZ	<i>Pox virus and Zinc finer</i>
Prt	Protease
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleasen
RSV	<i>rous sarcoma virus</i>
RT	reverse Transkriptase/reverse Transkription/ Raumtemperatur
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulfat</i>
siRNA	<i>small interference RNA</i>
ss	<i>single-strand</i>
Tab.	Tabelle
TE	Tris/EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylisothiocyanat
TZFP	Testis Zinkfinger Protein
U	<i>unites</i>