

**Identifizierung von LINE-1 kodierten Proteinen
und zellulärer Interaktionspartner
im humanen Gewebe**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

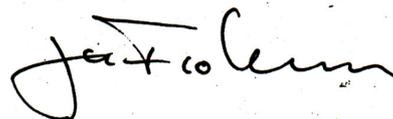
Christian Buschmann

aus Rostock

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. T. DOBNER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. G. G. SCHUMANN
Tag der Disputation: 25. Januar 2013

Hamburg, den 10. Januar 2013



Professor Dr. J. Fromm

Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	3
2	Abkürzungsverzeichnis.....	7
3	Einleitung	10
3.1	Transponierbare Elemente und ihr Einfluss auf Organisation und Struktur des Genoms ...	11
3.2	Transponierbare Elemente im menschlichen Genom.....	12
3.2.1	DNA-Transposons.....	13
3.2.2	LTR-Retrotransposons.....	13
3.2.3	Non-LTR-Retrotransposons	14
3.2.3.1	LINES.....	15
3.2.3.2	SINES.....	15
3.2.3.3	SVAs.....	16
3.2.3.4	Prozessierte Pseudogene.....	17
3.3	Das humane LINE-1 Retrotransposon	18
3.3.1	Aufbau und Organisation.....	18
3.3.2	Expression von LINE-1	21
3.3.2.1	Transkription	21
3.3.2.2	Translation.....	23
3.3.3	Replikationszyklus	24
3.3.4	Der Einfluss von L1 auf das Genom des Wirtsorganismus.....	30
3.4	Keimbahnentwicklung und Spermatogenese des Menschen	34
4	Ziele dieser Arbeit.....	37
5	Material	38
5.1	Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme	38
5.1.1	Zelllinien.....	38
5.1.2	Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i>).....	38
5.1.3	Hefestämme (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	38
5.2	Plasmide	39
5.2.1	<i>E. coli</i> -Klonierungs- und Expressionsvektoren.....	39
5.2.2	Hefe-Hybridvektoren	39
5.2.3	Expressionsvektoren für die Zellkultur.....	39
5.2.4	LINE-1 spezifische Oligonukleotide	40
5.2.5	CREME9 spezifische Oligonukleotide.....	40
5.2.6	Sonstige Oligonukleotide.....	40
5.3	Antikörper	41
5.3.1	Primäre Antikörper.....	41
5.3.2	Sekundäre Antikörper	41
5.4	Nährmedien.....	41
5.4.1	Nährmedien für die Zellkultur.....	41
5.4.2	Nährmedien für <i>E. coli</i>	42
5.4.3	Nährmedien für <i>S. cerevisiae</i>	42
5.5	Gebräuchliche Lösungen und Puffer.....	42
5.6	Chemikalien und Biochemikalien	43
5.7	Radiochemikalien	44
5.8	Standards.....	44
5.9	Enzyme.....	44

5.10	Kommerzielle Kits.....	44
5.11	Sonstige Verbrauchsmaterialien	45
5.12	Geräte	45
6	Methoden.....	47
6.1	Kultivierung von Zellen	47
6.1.1	Zellkulturen	47
6.1.1.1	Züchten menschlicher Zellen	47
6.1.1.2	Trypsinieren von Zellen	47
6.1.1.3	Einfrieren von Zellen.....	47
6.1.1.4	Zellzahlbestimmung.....	48
6.1.1.5	Klonierung durch Endpunktverdünnung.....	48
6.1.1.6	Herstellung transgener Viren für die Infektion von Zellen	48
6.1.1.7	Stabile Transduktion von Zellen	49
6.1.1.8	Etablieren einer Zelllinie für die Überexpression eines Proteins mittels des ARIAD-Systems 49	49
6.1.1.9	Induktion der Proteinexpression in HeLa-Zellen durch AP21967	52
6.1.1.10	Fluoreszenz-Markierung von Zellen für die Durchflusszytometrie	52
6.1.1.11	Durchflusszytometrische Analyse von fluoreszenzmarkierten Zellen	52
6.1.1.12	Sortieren von HeLa-Zellen.....	53
6.1.1.13	Der LINE-1 Retrotranspositionstest	53
6.1.1.14	Anlegen einer Übernachtskultur	55
6.1.1.15	Einfrieren von Bakterien	55
6.2	Präparation von Plasmid-DNA	55
6.2.1	Plasmid-Minipräparation	55
6.2.2	Plasmid-Midi- und Maxipräparation.....	56
6.3	Reinigung von Plasmid-DNA.....	56
6.3.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	56
6.3.2	Fällung von DNA	57
6.4	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	57
6.5	Klonierung rekombinanter DNA in <i>E. coli</i>	58
6.5.1	Erzeugung chemisch-kompetenter Bakterien.....	58
6.5.2	Transformation chemisch-kompetenter Bakterien	58
6.5.3	Selektion positiver Klone	59
6.6	Enzymatische Manipulation von DNA	60
6.6.1	Fragmentierung von Doppelstrang-DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	60
6.6.2	Auffüllen kohäsiver Enden mit dem Klenow-Fragment.....	61
6.6.3	Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA.....	61
6.6.4	Ligation von DNA.....	61
6.6.5	DNA-Sequenzierung	62
6.7	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel	63
6.7.1	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	64
6.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	64
6.8.1	Präparative PCR	65
6.8.2	Analytische PCR	65
6.9	Klonierung von PCR-Amplifikaten.....	66
6.10	Methoden zur Manipulation von RNA	66
6.10.1	Präparation von Gesamt-RNA.....	66
6.10.2	Reverse Transkription von RNA.....	66
6.11	Lyse von Zellen unter denaturierenden Bedingungen.....	67
6.12	Expression von Proteinen in Bakterien	67
6.12.1	Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i> mit IPTG	67

6.12.2	Präparative Reinigung von Proteinen über Histidin-Cluster	68
6.12.3	Affinitätschromatographische Reinigung von GST-Fusionsproteinen	69
6.12.4	GST-Fällung von Proteinen.....	70
6.13	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	71
6.13.1	Aufkonzentrieren von L1-ORF1p durch Elektroelution.....	72
6.14	Methoden zur Färbung von Proteinen	72
6.14.1	Färben von Nitrozellulose-Membranen mit Ponceau-Rot.....	72
6.14.2	Färben von Proteingelen mit Coomassie-Blau.....	73
6.14.3	Silberfärbung von Proteingelen.....	73
6.15	Immunblot-Analysen.....	74
6.15.1	Proteintransfer	74
6.15.2	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen	75
6.16	Immunfluoreszenzfärbung	76
6.16.1	Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis zytoplasmatischer Proteine	77
6.16.2	Immunfluoreszenzfärbung nach Extraktion der Zellen	78
6.17	Immunhistochemie	79
6.17.1	Entnahme und Einbetten von Gewebeproben	79
6.17.2	Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten	79
6.18	Immunzytochemie	81
6.19	Isolierung und Reinigung von Immunglobulinen.....	81
6.19.1	Isolierung und Aufreinigung von Immunglobulinen aus Hühnereigelb.....	81
6.19.2	Kopplung von Peptiden/Proteinen an CnBr-aktivierte Sepharose.....	82
6.19.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antikörpern	83
6.20	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antigenen	84
6.21	Methoden zur Hefegenetik.....	84
6.21.1	Anlegen einer Übernachtskultur	84
6.21.2	Einfrieren von Hefezellen.....	84
6.21.3	Analytische Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	84
6.21.4	Transformation von Hefezellen nach der Lithiumazetat-Methode.....	85
6.21.5	Hefe 2-Hybrid Analyse.....	87
6.22	Isolierung von Proteinen aus Hefezellen	88
6.22.1	Nativer Zellaufschluss mit Glasperlen.....	88
6.22.2	Zellaufschluss durch alkalische Lyse.....	89
6.23	X-Gal Filtertest	89
7	Ergebnisse.....	91
7.1	Nachweis von LINE-1 kodierten Proteinen.....	91
7.1.1	Herstellung polyklonaler anti-ORF1p Antikörper	91
7.1.1.1	Nachweis der Spezifität der anti-ORF1p Antikörper	93
7.1.2	Herstellung polyklonaler anti-ORF2p Antikörper	97
7.1.2.1	Aufreinigung von anti-ORF2p Antikörpern.....	99
7.1.2.2	Spezifischer Nachweis von rekombinantem L1-ORF2p durch den anti-EN Antikörper....	101
7.1.2.3	Nachweis der Spezifität des anti-EN Antikörpers durch Immunpräzipitation und anschließende MALDI-ToF Analyse	106
7.1.2.4	Identifizierung der Peptidsequenzen von anti-EN Antikörper immunpräzipitierten, zellulären Proteinen durch MALDI-ToF Analysen	108
7.1.3	Expression von endogenen LINE-1 kodierten Proteinen in humanem Gewebe.....	110
7.1.3.1	Nachweis der Koexpression von ORF1p und ORF2p im menschlichen Keimbahngewebe mittels Immunhistochemie.....	110
7.1.3.2	Nachweis der Koexpression von ORF1p und ORF2p in somatischen fötalen Geweben ...	114
7.1.3.3	Nachweis der Koexpression von ORF1p und ORF2p in somatischem adulten Gewebe....	116
7.1.4	Intrazelluläre Lokalisation von ORF1p und ORF2p.....	117

7.2	Identifizierung von wirtskodierten Interaktionspartnern des LINE-1 Replikationsapparates	119
7.2.1	Herstellung von "bait"-Konstrukten für Hefe 2-Hybrid Analysen	119
7.2.2	Amplifizieren einer Hoden cDNA-Genbank.....	123
7.2.3	Isolierung möglicher Interaktionspartner im Hefe 2-Hybrid-System	126
7.2.4	Ausschluss falsch positiver L1-EN Interaktionspartner	127
7.2.4.1	Ausschluss potentieller Interaktionspartner aufgrund zu kurzer cDNA-Inserts	128
7.2.4.2	Ausschluss potentieller Interaktionspartner aufgrund intrinsischer Reporteragenaktivierung	128
7.2.5	Analyse der cDNA-Sequenzen identifizierter L1-EN Interaktionspartner.....	131
7.2.6	Bestätigung der L1-EN/CREME9-Interaktion durch GST-Fällung	134
7.2.7	Etablierung der induzierbaren Expression von CREME9	137
7.2.8	Einfluss von CREME9 auf die L1-Retrotranspositionsrate	141
8	Diskussion.....	145
8.1	Die Spezifität der Immunreaktionen gegen L1 kodierte Proteine	145
8.2	Die Expression von L1-Proteinen wird gewebe- und entwicklungspezifisch reguliert ...	148
8.3	Funktionelle Bedeutung von L1 kodierten Proteinen für den Wirtsorganismus	151
8.4	Einfluss des Zellzyklus auf die Expression und Lokalisation von L1-Proteinen	154
8.5	Beteiligung von zellulären Faktoren am L1-Retrotranspositions Vorgang	156
8.6	CREME9 als potentieller Repressor der L1 Retrotransposition.....	159
9	Zusammenfassung.....	163
10	Literatur	165
11	Anhang	183

2 Abkürzungsverzeichnis

AAA _n	3'-terminale poly(A)-Folge
Abb	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATCC	American tissue culture collection
α	anti (für Antikörper)
BD	DNA-Bindedomäne
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum-Albumin
C	Celsius
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CMV	Cytomegalievirus
CoIP	Coimmunpräzipitation
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DIC	Differential Interference Contrast
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	double strand DNA
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EN	Endonuklease
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
g	9,81 m/s ² (Fallbeschleunigung, Erdanziehungskraft)
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S Transferase
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HERV	humanes endogenes Retro-Virus
hL1	humanes L1
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
b	Basen
Da	Dalton
k	Kilo
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
KLS	Kernlokalisierungssignal
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
L1	LINE-1
LINE	Long Interspersed Nuclear Element
LTR	Long Terminal Repeat
m	Milli
M	Molar
Maldi	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MCS	multiple cloning site
MLV	murines Leukämie-Virus
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
μ	Mikro
n	Nano
Nt	Nukleotid
ORF1	erster offener Leserahmen
ORF1p	Genprodukt des ORF1
ORF2	zweiter offener Leserahmen
ORF2p	Genprodukt des ORF2
OD	Optische Dichte
p	p-Wert (Die Wahrscheinlichkeit, dass die gewonnenen Meßwerte nicht auf einen Zufall zurückzuführen sind, wird mit dem p-Wert ausgedrückt. Ist der p-Wert < 0,05, so kann man mit 95%iger Wahrscheinlichkeit

sagen, dass die Ergebnisse nicht auf einen Zufall zurückzuführen sind; die Ergebnisse werden auch als "statistisch signifikant" bezeichnet.)

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Privat Dozent
PE	Phytoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
rk	retrotranspositions-kompetent
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Reverse Transferase (Protein)
SA	Spleiß-Akzeptor
SD	Spleiß-Donor
SDS	Sodium Dodecyl-Sulfat
SINE	Short Interspersed Element
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STL	Stammlösung
SV 40	simianes Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
ToF	Time of Flight
tRNA	transfer RNA
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslated Region

Abkürzungen, die nur einmal verwendet werden, werden an Ort und Stelle erklärt. In den Fällen, in denen Aminosäuren abgekürzt werden, wird der Einbuchstabencode verwendet. Standardabkürzungen physikalischer Einheiten sind hier nicht aufgeführt, ebenso wenig wie gängige Abkürzungen der deutschen Sprache.

3 Einleitung

Betrachtet man die bisherige Entwicklung in der Biologie, fällt auf, dass der Fortschritt in dieser Naturwissenschaft gewissen Zyklen unterworfen ist. Oft waren es einzelne, bahnbrechende Ideen oder Forschungsergebnisse, die eine ganze Generation von Wissenschaftlern geprägt haben und teilweise auch völlig neue Forschungsdisziplinen begründeten. So läuteten die Mendelschen Gesetze über die Grundlagen der Vererbungslehre am Ende des 19. Jahrhunderts die Geburtsstunde der klassischen Genetik ein (Correns, 1899; De Vries, 1900; von Tschermack, 1900).

Ein weiterer Meilenstein war die Identifikation der DNA im Zellkern als Träger der genetischen Information (Avery, 1944). Aber erst ein Jahrzehnt später gelang es James Watson und Francis Crick den molekularen Aufbau der DNA-Doppelhelix zu entschlüsseln (Watson and Crick, 1953a; Watson and Crick, 1953b). Mit dieser Entdeckung legten sie den Grundstein für die moderne Genetik und begründeten die Anfänge der heutigen Molekularbiologie. In der Folge expandierte dieses junge Forschungsgebiet sehr rasch, nicht zuletzt durch die Verwendung der rekombinanten DNA-Techniken. Mit der Sequenzierung der ersten Gene und wenig später von kompletten, einfachen Genomen begann das Zeitalter der sogenannten "Genomik". So waren zur Jahrtausendwende bereits die Genome von über 500 Viroiden und Viren, über 100 Organellen und mehr als 30 Bakterien bekannt und diese Entwicklung schreitet weiter zügig voran. Die Sternstunde der Genomik aber war sicherlich die Entschlüsselung des menschlichen Erbguts. Nach jahrelanger Arbeit veröffentlichte ein internationales Konsortium ein vorläufiges humanes Genom, das 8 Mal größer war als die Summe aller bis dahin bekannten Genome (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Ausgehend von den entschlüsselten Sequenzen versuchte man nun deren Bedeutung und Funktion auf Proteinebene zu erforschen. Betrachtet man z.B. das menschliche Genom, so zeigt sich, dass der Mensch mit ungefähr 30.000 bis 40.000 Genen über weit weniger kodierende Sequenzen verfügt, als anfangs angenommen (Lander *et al.*, 2001). Warum ist der menschliche Organismus trotzdem so komplex und einmalig? Die Antworten auf diese Fragen können zukünftig nur durch die Kenntnis um die Interaktion aller dem Organismus zugrunde liegenden Proteine, also des Proteoms, beantwortet werden. So kann ein Gen nicht immer nur in einer einzigen Proteinsequenz resultieren, sondern unter Umständen können mehrere, verschiedene Splicevarianten zu unterschiedlichen Proteinprodukten

umgeschrieben werden. Der Schwerpunkt der internationalen Forschungsbemühungen richtet sich deshalb zusehends auf die Herausforderungen der Proteomik, welche die zugrunde liegende Genomik an Komplexität weit übertrifft. Die Proteomforschung ("Proteomics") ist demnach zumindest für die nächste Dekade ein herausragender Zweig der Genomforschung.

3.1 Transponierbare Elemente und ihr Einfluss auf Organisation und Struktur des Genoms

Die Ursprünge der Forschung auf dem Gebiet der mobilen DNA gehen auf Barbara McClintock und ihre folgenreiche Entdeckung der transponierbaren Kontrollelemente in *Zea mays* zurück (McClintock, 1950). Sie demonstrierte ausschließlich mit genetischen Analysemethoden, dass es mobile genetische Elemente gibt, die zu neuen chromosomalen Loci "springen" und die Expression benachbarter Gene verändern sowie Chromosomenstrangbrüche hervorrufen können. Diese Ergebnisse leiteten die Entdeckung des Phagen Mu, der bakteriellen Insertionssequenzen und Resistenz-tragenden Transposons, sowie der mobilen Elemente der Eukaryonten ein. Seitdem ist das Interesse an diesem Forschungsgebiet stetig gewachsen. Wurden die transponierbaren Elemente (TEs) in der Anfangszeit noch als "evolutionärer Müll" oder "zelluläre Parasiten" abgetan (Ohno, 1972), sind sie doch spätestens mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms (Lander *et al.*, 2001) und den Erkenntnissen, die sich dadurch ergaben, endgültig in den Blickpunkt der wissenschaftlichen Öffentlichkeit geraten. Die wichtigste Neueinschätzung die sich aus der Analyse des sequenzierten menschlichen Genoms ergab, betraf die Anzahl der Gene in unserem Erbgut. Mit nur 1,5 % machten die kodierenden Sequenzen einen deutlich geringeren Teil des Genoms aus, als ursprünglich vermutet worden war. Dies bestätigte die Hypothese, dass die Komplexität und damit die Anzahl der Genprodukte nicht mit der Größe des zugrunde liegenden Genoms in Zusammenhang steht (C-Wert Paradoxon). Diese gravierenden Abweichungen wurden damit erklärt, dass ein Genom eine große Menge an repetitiven Sequenzen enthalten kann, die weitaus häufiger vorkommen können als Protein-kodierende Gene (Gregory and Hebert, 1999; Hartl, 2000).

Die zweite wichtige Erkenntnis betraf die Häufigkeit und Verteilung der TEs sowie die Rückschlüsse, welche daraus gezogen werden konnten. Vergleicht man nämlich die Genome verschiedener Spezies miteinander, unterscheiden sich diese nicht nur in ihrem relativen Gehalt an TEs voneinander. Ein Vergleich zwischen Mensch und Schimpanse,

dem nächsten Verwandten des Menschen im Tierreich ergab, dass deren Genome zu 99% identisch sind (Satta *et al.*, 2000). Der phänotypische Unterschied zwischen beiden Spezies wird unter Anderem auf Polymorphismen bei den mobilen genetischen Elementen zurückgeführt. Dadurch kommt es zu unterschiedlicher Expression nahezu identischer Gene (Varki, 2000). Zusätzlich treten die verschiedenen Klassen transponierbarer Elemente auch mit ganz unterschiedlicher Häufigkeit in den einzelnen Arten auf. Beispielsweise ist der Anteil an aktiven Elementen im Menschen auffallend niedrig. Während in Mäusen von den verschiedenen Klassen an TEs noch mehrere aktive Familien vorkommen (Guenet, 2005), sind die meisten dieser Elemente im Menschen durch Mutationen inaktiviert (Lander *et al.*, 2001). Diese Unterschiede zwischen dem Menschen und anderen Spezies, wie beispielsweise der Maus, sind für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. Sie machen nämlich deutlich, dass die vorhandenen Forschungsergebnisse aus der Maus nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind. Vielmehr ist es zwingend notwendig offene Fragen durch gezielte Untersuchungen des Sachverhaltes am Menschen zu klären.

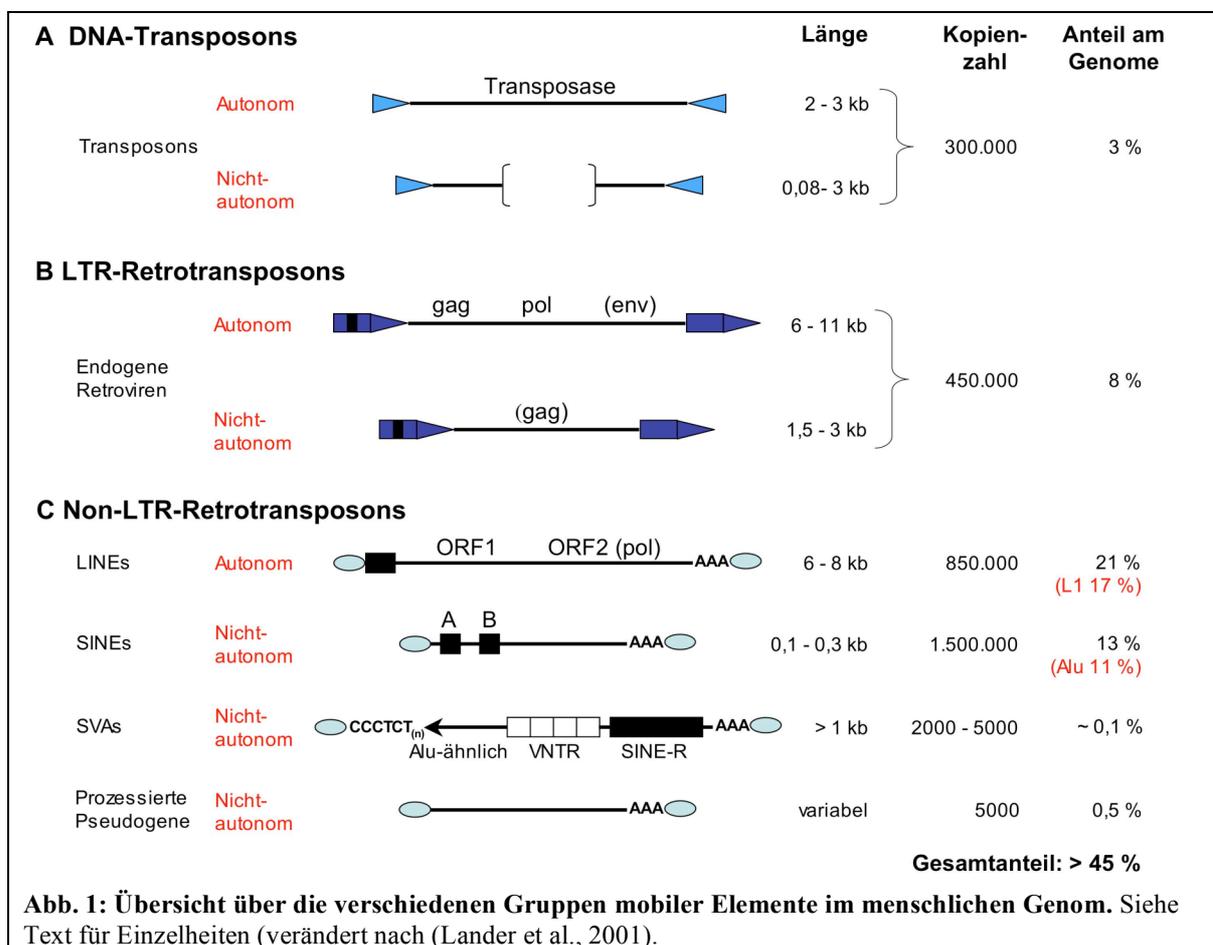
3.2 Transponierbare Elemente im menschlichen Genom

TEs machen mindestens 45 % des genetischen Materials des Menschen aus. Es wird jedoch vermutet, dass der tatsächliche Anteil von TEs im Genom noch höher ist, da sehr alte Insertionsereignisse im Laufe der Zeit soweit degeneriert sind, dass sie mit den heute verwendeten Suchalgorithmen wie dem "RepeatMasker" (<http://repeatmasker.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>), nicht mehr als solche erkannt werden können (Li *et al.*, 2001).

Non-LTR-Retrotransposons, LTR-Retrotransposons und DNA-Transposons bilden die drei Gruppen der transponierbaren Elemente in eukaryontischen Organismen. Abbildung 1 zeigt die Strukturen der unterschiedlichen Vertreter dieser Gruppen. Zusätzlich lassen sich TEs aufgrund ihrer unterschiedlichen Evolutionsgeschichte und der daraus resultierenden Replikationsmechanismen in Retrotransposons und DNA-Transposons unterteilen (Abb. 1).

3.2.1 DNA-Transposons

DNA-Transposons sind TEs, die von einem genomischen Ort zu einem anderen über einen "Cut-and-Paste"-Mechanismus springen, ohne sich dabei zu vervielfältigen. Im menschlichen Genom konnten bisher sieben Hauptklassen von DNA-Transposons identifiziert werden, die insgesamt etwa 3 % des Genoms umfassen (Abb. 1A), jedoch seit mindestens 50 Mio. Jahren nicht mehr aktiv sind (Lander *et al.*, 2001; Smit, 1996). Die weite Verbreitung dieser Transposons lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass sie häufig über horizontalen Gentransfer von einer Spezies zur Anderen übertragen wurden (Koga *et al.*, 2000; Simmons, 1992).



3.2.2 LTR-Retrotransposons

Retrotransposons unterscheiden sich von DNA-Transposons dadurch, dass sie sich mittels eines "Copy-and-Paste" Mechanismus ausbreiten und lassen sich in Long Terminal Repeat (LTR)-Retrotransposons und in Non-LTR-Retrotransposons gliedern.

LTR-Retrotransposons (Abb. 1B), zu denen auch die endogenen Retroviren gehören, umfassen etwa 8 % des menschlichen Genoms und erhielten ihre Bezeichnung aufgrund der langen terminalen Wiederholungssequenzen, von denen diese Elemente typischerweise flankiert werden (Boeke and Stoye, 1997). In Bezug auf ihre Verbreitung ist noch nicht abschließend geklärt, ob sie sich über horizontalen und/oder vertikalen Gentransfer verbreiten (Boeke and Stoye, 1997; Malik *et al.*, 1999). Die humanen endogenen Retroviren (HERV) sind wahrscheinlich durch Integration von retroviralen Proviren in das humane Genom vor ca. 40 Millionen Jahren entstanden (Lower *et al.*, 1996). Man vermutet, dass fehlender Selektionsdruck auf infektiöse Viruspartikel und eine Kumulation von Mutationen dazu geführt haben, dass ein Großteil dieser Viren nicht mehr transkribiert wird und somit nicht replikationskompetent ist. Nur wenige endogene Retroviren besitzen ein mit exogenen Retroviren vergleichbares, vollständiges Genom (Bannert and Kurth, 2004; Griffiths, 2001; Mayer *et al.*, 1999). Obwohl ein Großteil der endogenen Retroviren Deletionen und Mutationen aufweisen, konnte die Expression von HERV -Sequenzen (*human endogenous retrovirus*), wie z.B. HERV-K, die biologisch aktivste Familie der endogenen Retroviren, in menschlichem Gewebe nachgewiesen werden (Franklin *et al.*, 1988; Simpson *et al.*, 1996). Studien zu HERV-K ergaben eine Expression in Muskelgewebe, Haut, Gehirn, Keimzelltumoren sowie anderen Tumorgeweben (Stauffer *et al.*, 2004). Der entscheidende Unterschied zwischen endogenen und exogenen Retroviren besteht darin, dass die exogenen Retroviren durch Infektionsereignisse in somatischen Zellen eines Individuums erworben wurden, wohingegen die endogenen Retroviren über die Keimbahn an die Nachfolgeneration weiter gegeben werden. Folglich kann ein exogener Retrovirus zu einem endogenen Retrovirus werden, wenn er Keimzellen infiziert, und sich in das Genom integriert, wo er als Provirus über Generationen persistieren kann (Boeke and Stoye, 1997).

3.2.3 Non-LTR-Retrotransposons

Den Non-LTR-Retrotransposons, fehlen im Vergleich zu den LTR-Retrotransposons die typischen terminalen Wiederholungssequenzen (Abb. 1C). Zu den Non-LTR-Retrotransposons gehören Long Interspersed Nuclear Elements (LINEs), Short Interspersed Elements (SINEs), SVAs (SINE-R, VNTR, and *Alu*) und Pseudogene. Innerhalb der Non-LTR-Retrotransposons bilden SINEs, SVAs und Pseudogene wiederum die Gruppe der Retrotranskripte, die sich zu ihrer eigenen Replikation der

Retrotranspositionsmaschinerie der LINE-1 Elemente bedienen. Die Verbreitung von Non-LTR-Retrotransposons verläuft im Gegensatz zum horizontalen Gentransfer der DNA-Transposons durch vertikale Transmission (Malik *et al.*, 1999).

3.2.3.1 LINEs

LINEs decken ca. 21% des humanen Genoms ab, liegen in ca. 850.000 Kopien vor und gliedern sich in drei Familien, die als LINE-1 (L1), LINE-2 (L2) und LINE-3 (L3) bezeichnet werden. L2- und L3-Elemente haben durch Akkumulation von inaktivierenden Mutationen bereits vor etwa 80-100 Mio. Jahren ihre Fähigkeit zur Replikation verloren (Lander *et al.*, 2001). L1 Elemente hingegen machen über 80% aller LINE-Kopien aus und repräsentieren die einzige zur Zeit noch zur aktiven Retrotransposition befähigte LINE-Familie, von der bisher 80 - 100 aktive L1-Elemente im diploiden humanen Genom charakterisiert wurden (Brouha *et al.*, 2003). Innerhalb der L1 Familie existieren wiederum verschiedene Unterfamilien deren Aktivität im menschlichen Genom sehr unterschiedlich ist. Die bei weitem aktivste Gruppe sind die Ta-Elemente, die sich durch ein charakteristisches 3'-terminales Trinukleotid (ACA) auszeichnen (Dombroski *et al.*, 1991). Sie sind sehr polymorph und stellen mit einem durchschnittlichem Alter von nur 2 Mio. Jahren gleichzeitig auch die jüngste L1 Unterfamilie im menschlichen Genom (Boissinot and Furano, 2001).

3.2.3.2 SINEs

SINEs decken ca. 13 % des humanen Genoms ab und schließen ca. 1.5 Mio. Kopien ein (Lander *et al.*, 2001). SINEs sind 100 bis maximal 400bp lange, häufig wiederholte und relativ frei im Genom verteilte DNA-Sequenzen. Sie werden von der RNA-Polymerase III (interner Pol III-Promotor) transkribiert, stammen von der 7SL-RNA, tRNAs oder anderen RNA-Komponenten der Translationsmaschinerie ab und zeichnen sich durch einen typischen PolyA-Schwanz aus (Boeke, 1997; Quentin, 1992; Ullu and Tschudi, 1984). Diese transponierbaren Elemente besitzen zwar eine RNA als Zwischenstufe bei der Transposition, kodieren jedoch weder für eine eigene Transposase noch für eine reverse Transkriptase (RT) und besitzen somit keine intrinsische Fähigkeit zur Veränderung ihrer genomischen Position (Emerson *et al.*, 2004). Daher werden die SINEs auch als nicht-autonome Retroelemente bezeichnet, die in ihrer Verbreitung auf den Replikationsapparat

der LINEs angewiesen sind und von diesen *in trans* mobilisiert werden (Boeke and Stoye, 1997; Dewannieux *et al.*, 2003; Smit, 1996). Sie lassen sich in drei voneinander unabhängige Familien unterteilen. Die häufigste und auch die einzige noch verbliebene aktive Familie stellen mit über 1 Mio. Kopien (11 %) pro haploiden Genom die *Alu*-Elemente. Ein typisches *Alu*-Element liegt als Dimer vor und besitzt eine zentrale, A-reiche Region, die von zwei sich ähnelnden Sequenzelementen von ca. 130bp (linker und rechter Arm) flankiert werden. Die ersten *Alu*-Elemente sind vor ca. 55 Mio. Jahren durch eine Fusion der 5'- und 3'-Enden des 7SL RNA-Gens, welches für die RNA-Einheit des SRP (*signal recognition particle*) kodiert, entstanden (Hasler and Strub, 2006). Während der Evolution haben sich die *Alu*-Elemente im menschlichen Genom stark vermehrt und lassen sich ihrem Alter entsprechend in drei Hauptfamilien aufteilen: in die älteste *AluJ*-Familie, die *AluS*-Familie und die jüngste *AluY*-Familie. Untersuchungen zeigten, dass *Alu*-Konsensussequenzen mit Bindungsmotiven für Transkriptionsfaktoren angereichert sind. Dazu gehören z.B. Transkriptionsfaktoren zur Organismenentwicklung und der Stressantwort (Polak and Domany, 2006). Die Verteilung der *Alus* im Genom korreliert mit dem GC-Gehalt von DNA-Sequenzen. 12,5 % der *Alu*-Elemente liegen intragenisch vor und nur 9,6% in intergenischen Regionen (Grover *et al.*, 2004). Daher wird vermutet, dass die Transkription von Genen durch die Anwesenheit von *Alu*-Elementen verstärkt wird. Im Gegensatz dazu sind die einzelnen Vertreter aus den Familien der MIR- (*mammalian-wide interspersed repeat*) und Ther2/Mir3-Elemente seit etwa 80 - 100 Mio. Jahren nicht mehr aktiv (Lander *et al.*, 2001; Smit, 1996). MIRs existieren in ca. 500.000 Kopien im Genom und haben sich vermutlich aus tRNA entwickelt (Smit, 1996). Sie haben eine durchschnittliche Länge von ca. 70 Nukleotiden und wurden erstmalig im menschlichen Prothrombin-Gen beschrieben (Smit, 1996). Aufgrund der weiten Verteilung innerhalb der Säugetiere, wird vermutet, dass die MIR-Elemente zu dem Zeitpunkt vor ca. 130 Mio. Jahren entstanden sind, als sich die Linien der Säugetiere von denen der Vögeln getrennt hat (Jurka *et al.*, 1995).

3.2.3.3 SVAs

Im Jahre 1994 wurde von Shen *et al.* erstmals ein zusammengesetztes Retrotransposon beschrieben. Es bestand aus dem SINE-R-Element, abstammend von dem humanen endogenen Retrovirus HERV-K10, die mit einer *Alu*-ähnlichen Sequenz assoziiert waren (Ono *et al.*, 1987; Zhu *et al.*, 1992). In der Folge wurde diese Struktur SVA (SINE-R,

VNTR, and *Alu*) genannt, wobei VNTR für "variable-number-of-tandem-repeats" steht. SVA-Elemente werden von Zielstellen-Verdopplungen (*target site duplications* (TSDs)) flankiert, besitzen einen PolyA-Schwanz, können an ihrem 3'-Ende Sequenzen transduzieren und sie werden bei ihrer Replikation oft verkürzt oder invertiert. Diese Eigenschaften deuteten früh darauf hin, dass auch SVA-Elemente in *trans* durch aktive L1-Elemente mobilisiert werden (Ostertag *et al.*, 2003), was kürzlich in Zellkulturexperimenten bestätigt werden konnte (Raiz *et al.*, 2011). Aufgrund der hohen Sequenzhomologien innerhalb der Gruppe der SVAs wird vermutet, dass sie erst kürzlich entstanden sind (<15 Mio. Jahre). Im humanen, haploiden Genom gibt es ca. 3500-7500 SVAs. Aufgrund kürzlich beschriebener *de novo* Integrationen von SVA-Elementen wird vermutet, dass auch diese Elemente bis zum heutigen Tage aktiv sind (Kobayashi *et al.*, 1998).

3.2.3.4 Prozessierte Pseudogene

Gelegentlich benutzen zelluläre mRNAs die L1-kodierten Proteine, um sich im Genom zu vermehren und sogenannte prozessierte Pseudogene zu schaffen. Hierbei wird der poly(A)-Schwanz des Gens *in trans* durch die LINE-Transkriptionsmaschinerie erkannt, gebunden, *revers* transkribiert und wieder in das Genom integriert (Esnault *et al.*, 2000; Maestre *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass für die Entstehung von prozessierten Pseudogenen sowohl L1-ORF1p, als auch L1-ORF2p, notwendig sind, und dass endogene Retroviren nicht in der Lage sind, prozessierte Pseudogene zu generieren (Dewannieux and Heidmann, 2005; Esnault *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu regulären Genen besitzen prozessierte Pseudogene normalerweise keine Introns oder Promotoren, dafür jedoch den typischen PolyA-Schwanz und variable TSDs, welche bei der Retrotransposition entstehen.

Es wird vermutet, dass zwischen 8.000 bis etwa 15.000 Kopien von prozessierten Pseudogenen im menschlichen Genom existieren. Hauptsächlich stammen diese von Genen, die in der Keimbahn stark hochreguliert sind, sowie von ribosomalen Proteinen ab (Torrents *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass mRNAs von ribosomalen Proteinen gewisse Merkmale aufweisen, die ihnen gestatten L1-kodierte Proteine effektiver zu rekrutieren, als andere zellulären mRNAs (Zhang *et al.*, 2002). Dies würde die überdurchschnittlich hohe Zahl von prozessierten Pseudogenen erklären, welche von den Genen ribosomaler Proteine herrühren.

Die Mehrzahl der prozessierten Pseudogene sind bereits vom Augenblick ihrer Entstehung an nicht aktiv, da sie in der Regel nicht über einen funktionierenden Promoter verfügen (Vanin, 1985; Zhang *et al.*, 2002). Dadurch lassen sie sich jedoch sehr gut als Zeitmarker zur Bestimmung von Mutationsraten in der Entwicklung der Arten verwenden (Graur *et al.*, 1989). Nur eine sehr geringe Zahl an prozessierten Pseudogenen wird exprimiert. Einige von diesen könnten tatsächlich funktionelle Proteine kodieren oder als sogenannte *small interfering RNAs* (siRNAs) an der Regulation von Genen beteiligt sein (Harrison *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2008; Vanin, 1985). So führte beispielsweise in Mäusen (*Mus Musculus*) die gezielte Deletion des prozessierten Pseudogens *Makorin1-p1* zu einer 80%igen Mortalität innerhalb der ersten 2 Tage nach der Geburt. Es stellte sich heraus, dass die Pseudogen mRNA mit ihrer homologen *Makorin 1*-mRNA direkt um Destabilisierungsfaktoren, wie z.B. RNAsen, konkurriert und so die Halbwertszeit der *Makorin 1* mRNA signifikant erhöht (Hirotsume *et al.*, 2003).

Es existiert bis jetzt kein Nachweis für eine Krankheit, die durch eine *de novo* Integration eines prozessierten Pseudogens hervorgerufen wurde. Allerdings ist die Expression eines prozessierten Pseudogens (DUX4) am Entstehen einer speziellen Form der Muskeldystrophie beim Menschen entscheidend beteiligt (Lemmers *et al.*, 2010; Snider *et al.*, 2010).

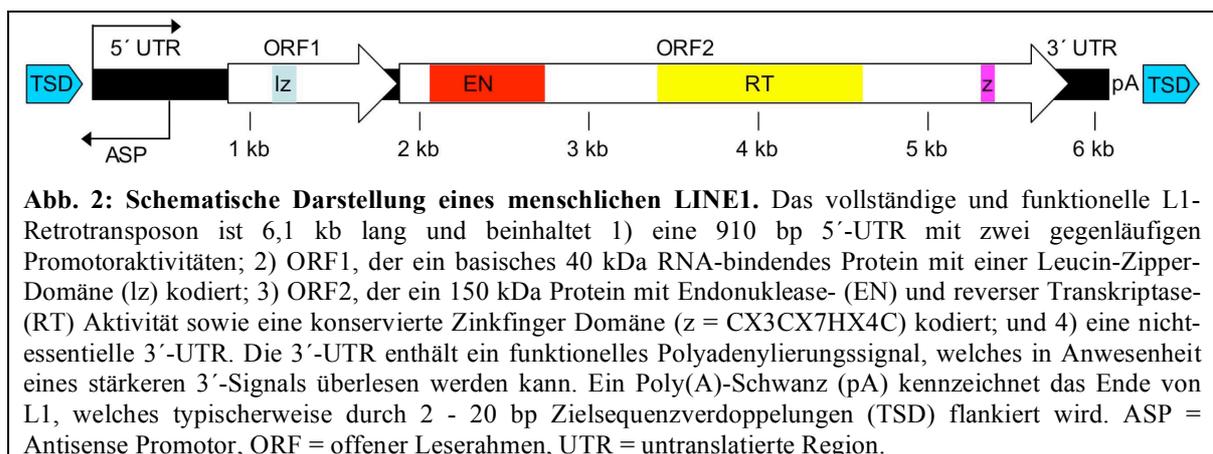
3.3 Das humane LINE-1 Retrotransposon

3.3.1 Aufbau und Organisation

Ein funktionelles, zur Retrotransposition befähigtes L1-Element (rk-L1) umfasst etwa 6,1 kb (Dombroski *et al.*, 1991; Moran *et al.*, 1996). Es besitzt eine 910 bp 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) mit einem internen, in somatischen Zellen stark methylierten CpG-reichen Promotor (Woodcock *et al.*, 1997).

Der 1017 Nukleotide umfassende erste offene Leserahmen (ORF1) kodiert für ein Protein von ca. 40 kDa (ORF1p), das durch eine konservierte "Leucin-Zipper" Domäne und eine C-terminale Domäne mit einem sehr hohen Anteil an basischen Aminosäuren gekennzeichnet ist (Hohjoh and Singer, 1996; Hohjoh and Singer, 1997; Holmes and Singer, 1992). Im ORF1p wurden folgende konservierte Blöcke von Aminosäuren gefunden die essentiell für die Retrotransposition sind: REKG (AS 235 - 238), ARR (AS 260 - 262) und YPAKLS (AS 282 - 287) (Moran *et al.*, 1996). "Cross linking"

Experimente lassen vermuten, dass die "Leucin-Zipper" Domäne das menschliche ORF1 Protein (ORF1p) die Bildung von Multimeren höherer Ordnung ermöglicht (Hohjoh and Singer, 1996). So weist ORF1p in Lösung eine trimere Struktur auf und es wird vermutet, dass die Assoziation von ORF1p-Monomeren über eine N-terminale *coiled-coil* Domäne erfolgt (Callahan *et al.*, ; Martin *et al.*, 2003). Die genaue Funktion des p40 ist noch unklar, allerdings konnte gezeigt werden, dass das Protein mindestens zwei spezifische Eigenschaften besitzt, nämlich Nukleinsäure-Bindeaktivität und ein Nukleinsäurechaperonaktivität. Es kann sowohl einzelsträngige DNA, als auch RNA binden und bildet mit der L1-RNA Ribonukleoproteinpartikel (RNPs) (Hohjoh and Singer, 1996; Hohjoh and Singer, 1997; Martin *et al.*, 2005). Außerdem ermöglicht es Rearrangements von Nukleinsäuren und zeigt dadurch spezifische Eigenschaften eines Nukleinsäurechaperons. Es verstärkt die Anlagerung von komplementären DNA Oligonukleotiden, die Trennung von fehlerhaften DNA-Duplices und katalysiert DNA-Strangwechsel für die Bildung von stabileren DNA-Duplices (Hohjoh and Singer, 1997). Daher wird das ORF1p einerseits für die Bildung des RNPs im Zytoplasma benötigt, wodurch es die Retrotranspositionsintermediate schützt und organisiert bis die Integration des Elementes in die Zielsequenz erfolgen kann. Andererseits spielt das ORF1p eine aktive Rolle in der L1-Retrotransposition und ermöglicht während der reversen Transkription sowohl den Primeraustausch als auch die Elongation (Martin and Bushman, 2001; Martin *et al.*, 2005).



ORF1 wird vom zweiten offenen Leserahmen (ORF2) durch eine nicht-kodierende 63 bp "Spacer"-Region getrennt. Die vollständige L1-mRNA stellt eine Ausnahme unter den eukaryontischen PolII-Transkriptionsprodukten dar, da sie bicystonisch ist, d.h. sie kodiert zwei voneinander unabhängige Proteine auf einem einzigen RNA-Transkript. Es ist

allerdings noch unklar, wie die Translation der beiden voneinander getrennten Leserahmen reguliert wird (Leibold et al., 1990; McMillan and Singer, 1993).

ORF2 hat eine Länge von 3828 bp und kodiert ein Protein (ORF2p) mit einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa (Scott *et al.*, 1987). ORF2p ist ein Polyprotein, das sowohl Endonuklease (EN)- als auch Reverse Transkriptase (RT)-Aktivität besitzt und an seinem C-terminalen Ende ein Cystein-Histidin-reiches (z) Zinkfinger-Motiv einschließt (Abb. 2) (Fanning and Singer, 1987; Malik *et al.*, 1999; Xiong and Eickbush, 1990). Die L1-EN (AS 1 - 239) gehört zur Familie der AP-Endonukleasen, besitzt aber im Gegensatz zu den typischen Vertretern dieser Familie weder eine RNaseH- oder 3'-5'-Exonukleaseaktivität, noch schneidet sie DNA an Stellen mit fehlenden Basen (Cost and Boeke, 1998; Feng *et al.*, 1996). EN hat für die Retrotransposition von L1 eine zentrale Bedeutung, da sie für Erkennung und Spaltung der genomischen Ziel-DNA-Sequenz verantwortlich ist. Da aber die EN selbst *in-vivo*, nur eine geringe Sequenzspezifität für die Zweitstrangspaltung besitzt, ist dieses Enzym entweder sehr ungewöhnlich, da es nur einen der beiden DNA-Stränge sequenzspezifisch schneidet, oder ein bis jetzt unbekanntes Enzym ist für die Katalyse der Zweitstrangspaltung verantwortlich (Gilbert *et al.*, 2002). In der zentral auf dem ORF2p gelegenen RT-Domäne (AS 497 - 787) konnten 7 konservierte Sequenzblöcke identifiziert werden, die in allen bekannten RTs vorkommen (Xiong and Eickbush, 1990). Phylogentische Analysen haben gezeigt, dass sich die RT von non-LTR Retrotransposons einen anderen Ursprung zu haben scheinen als die RTs von LTR-Retrotransposons und Retroviren (Malik *et al.*, 1999; Xiong and Eickbush, 1990). Sequenzvergleiche zeigten eine große Übereinstimmung zwischen der L1-RT Domäne und der katalytischen Untereinheit der Telomerase und sprechen dafür, dass die L1-RT von RTs der Gruppe II-Introns abstammen könnten (Nakamura *et al.*, 1997; Xiong and Eickbush, 1990). Jüngste Versuche zeigten eine mechanistische Verwandtschaft zwischen L1-Retrotransposition und Telomerasen (Kopera *et al.*, 2011). Die C-terminale Region des ORF2p (Abb. 2) scheint ebenfalls eine wichtige, bisher noch unbekannt Funktion zu haben. Mutationsanalysen in den konservierten Bereichen dieser Region ergaben eine um zwei Zehnerpotenzen reduzierte Retrotranspositionsfrequenz ohne jedoch eine messbare Reduktion der RT-Aktivität zu verursachen (Moran, 2002). Es wird vermutet, dass diese Region eine Rolle bei der Protein-Nukleinsäure-Interaktion spielt und bei der Interaktion von ORF2p mit der L1-RNA während der Bildung von Retrotranspositionsintermediaten von Bedeutung ist (Ostertag and Kazazian, 2001a).

Am 3'-Ende des L1-Elements befindet sich eine kurze 3'-UTR (205 bp), die eine konservierte Guanosin-reiche Polypurinfolge sowie ein Polyadenylierungssignal enthält und durch einen Poly(A)-Schwanz (pA) abgeschlossen wird (Grimaldi *et al.*, 1984; Ostertag and Kazazian, 2001a). Innerhalb des ORF2p gehören die Aminosäurereste 12(N), 43(E), 115(Y), 145(D), 147(N), 192(T), 205(D) und 228-230 (SDH) zu den Schlüsselpositionen für die EN-Aktivität (Feng *et al.*, 1996). Zusätzlich führen Mutationen in der konservierten Z-Box (AS 472 und 474), der katalytischen FADD-Box der RT-Domäne (AS 700 - 703), sowie in der C-Region (AS 1143, 1147, 1160, 1155 - 1156, 1091 - 1094 und 1096 - 1098) zu einer deutlichen Reduktion der L1 Retrotranspositionsaktivität (Clements and Singer, 1998; Moran *et al.*, 1996).

Ein weiteres Merkmal vieler L1 Kopien im Genom sind die variablen Zielsequenzverdoppelungen (TSD) mit einer Länge von bis zu 60 bp von denen diese Elemente typischerweise flankiert werden (Szak *et al.*, 2002). Diese Strukturen resultieren aus dem Mechanismus der L1-Replikation.

3.3.2 Expression von LINE-1

L1-Retrotranspositionereignisse konnten sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimzellen nachgewiesen werden, wobei der Prozessierung der L1-RNA eine wichtige Rolle als Regulator der L1 Aktivität zukommt (Belancio *et al.*, 2010; Ostertag and Kazazian, 2001a). Wenn L1-Retrotranspositionereignisse in diesen Zelltypen stattfinden, müssen sowohl die vollständige L1-RNA als auch die von ORF1 und ORF2 kodierten Proteine dort zu finden sein, weil die Anwesenheit dieser drei Komponenten für die Retrotransposition absolut essentiell ist (Moran *et al.*, 1996).

3.3.2.1 Transkription

Innerhalb der 5'-UTR von L1 liegt der interne L1-Promotor, wobei sich die Promotoraktivität auf die ersten 670 bp konzentriert (Swergold, 1990). Die Transkription von L1 wird an Position +1 initiiert und gilt als der geschwindigkeits-bestimmende Schritt des Retrotranspositionereignisses (Minakami *et al.*, 1992; Skowronski *et al.*, 1988; Swergold, 1990). Ein wichtiger Regulator des L1-Promotors ist der ubiquitäre Transkriptionsfaktor TFL1-A (YY1), dessen Bindungsstelle zwischen den Positionen +13 und +21 der 5'-UTR liegt (Becker *et al.*, 1993; Kurose *et al.*, 1995; Minakami *et al.*, 1992). TFL1-A dient dabei vermutlich der Positionierung des initialen Transkriptionskomplexes

(Weis, L und Reinberg, D 1997). Allerdings ist nicht nur YY1 für die Regulation der L1-Transkription verantwortlich (Holmes *et al.*, 1994). SOX11 (*SRY-related HMG-box*) aus der Gruppe der SRY (*sex determining region Y*)-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, welches an den Positionen +472 und +572 der L1-Consensus Sequenz bindet, gilt als Aktivator der endogenen L1 Expression. Auch Steroidhormone können die L1-Promotoraktivität beeinflussen (Morales *et al.*, 2002; Tchénio *et al.*, 2000). Zusätzlich haben Deletions- und Mutationsanalysen das Vorhandensein eines Enhancers offenbart, der etwa bei Position +500 in der 5'-UTR des L1 lokalisiert ist und in dessen Aktivierung Ets (*erythroblastosis virus E26 oncogene homolog*) involviert ist (Yang *et al.*, 1998). RUNX3 (*runt-domain transcription factor 3*) ist ebenfalls ein Aktivator der L1-Retrotransposition und seine Bindestelle liegt zwischen den Nukleotidpositionen +83 bis +101 der 5'-UTR von L1 (Yang *et al.*, 2003). Im Menschen spielt RUNX3 für die Wachstumsregulation von gastroepithelialen Zellen, Entwicklung und Verknüpfung verschiedener neuronaler Zelltypen, sowie T-Zell Entwicklung eine wichtige Rolle (Inoue *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2002; Levanon *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Taniuchi *et al.*, 2002). Die ersten Studien zur Expression von L1 wurden an embryonalen Karzinomzelllinien durchgeführt, von denen man vermutet, dass sie die Situation der L1-Expression in Zellen des frühen Stadiums der Embryonalentwicklung widerspiegeln. So wurde in pluripotenten Teratokarzinom-Zellen (NTera2 Klon D1) eine vollständige L1-mRNA detektiert, deren Transkription jedoch terminiert wurde, sobald man die Zellen durch Zugabe von Retinolsäure zur Differenzierung anregte (Skowronski and Singer, 1985). Die genauere Charakterisierung der L1-Transkripte aus diesen Teratokarzinom-Zellen führte innerhalb der L1-Familie zur Entdeckung der bereits beschriebenen Ta-Elemente, die sich durch ein diagnostisches Trinukleotid von den übrigen L1-Elementen unterscheiden und offenbar den größten Teil der rk-L1 Kopien im menschlichen Genom stellen (Skowronski *et al.*, 1988). Die Expression der L1-mRNA lässt sich auch induzieren indem man Zellen mit 5-Azadeoxycytidin behandelt (Woodcock *et al.*, 1997), welches die Demethylierung der CpGs der genomischen DNA induziert. Dies und die Erkenntnis, dass die CpG-Sequenzen in der 5'-UTR des L1 in normalen somatischen Zellen und in Tumorzellen unterschiedlich methyliert sind führte zu der Vermutung, dass sich die Transkription von L1 auf bestimmte Zelltypen beschränkt und mit dem Methylierungszustand der CpGs in der 5'-UTR korreliert (Alves *et al.*, 1996; Jones and Takai, 2001; Thayer *et al.*, 1993). Als ein Vermittler der methylierungsabhängigen Repression von L1 konnte das zelluläre Methyl-CpG-bindende Protein 2 (MeCP2) identifiziert werden, welches an methylierte CpGs des

L1 5'-UTR bindet und so die L1-Promotor-gesteuerte Transkription hemmt (Yu *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese von Tim Bestor und seinen Mitarbeitern, wonach sich die CpG-Methylierung in Säugetieren ursprünglich als ein Verteidigungsmechanismus gegen die Expression und daraus resultierende Ausbreitung mutagener TEs entwickelt hat (Bestor, 1998; Yoder *et al.*, 1997).

Besonders kontrovers wurde die Frage diskutiert, ob das menschliche L1 durch die RNA-Polymerase II (Pol II) oder RNA-Polymerase III (Pol III) transkribiert wird. Zuerst wurde eine Pol III abhängige Transkription postuliert, da sich diese durch den RNA-Polymerase III spezifischen Inhibitor Tagetitoxin unterdrücken ließ (Kurose *et al.*, 1995). Doch das Vorhandensein von zwei starken Terminatoren im L1 (5'-TTTTT-3') für Pol III und die Tatsache, dass α -Amanitin die Transkription der L1-mRNA in Teratokarzinom-Zellen inhibiert (Woodcock *et al.*, 1996), sprachen für die Hypothese, dass L1 durch die RNA-Polymerase II transkribiert wird. Außerdem lässt sich der L1-Promotor ohne negative Auswirkung auf die Retrotranspositionsrate durch einen viralen Pol II-Promotor, z.B. aus CMV oder RSV substituieren (Moran *et al.*, 1996). Deshalb geht man inzwischen davon aus, dass ein Pol II-Transkript das Intermediat für die Retrotransposition von L1 darstellt.

3.3.2.2 Translation

Zum Zeitpunkt des Beginns meiner Dissertationsprojekte war es nur gelungen, ausschließlich das von L1-ORF1 kodierte Translationsprodukt ORF1p in menschlichen Zellen nachzuweisen. ORF1p konnte im Zytoplasma einer Reihe von Keimbahntumoren im Hoden, in Brustkarzinomen, in Medulloblastomen sowie in verschiedenen transformierten menschlichen Zelllinien detektiert werden (Asch *et al.*, 1996; Branciforte and Martin, 1994; Bratthauer and Fanning, 1992). Das einzige nicht-maligne menschliche Gewebe, in dem es zu diesem Zeitpunkt gelungen war, ORF1p nachzuweisen, war das Epithel der Brustdrüse (Asch *et al.*, 1996). In Mäusen hingegen konnte L1-kodiertes ORF1p nicht nur in embryonalen Karzinom-Zelllinien und verschiedenen anderen immortalisierten Zelllinien, sondern auch in gesunden männlichen und weiblichen Keimzellen, Leydigzellen des embryonalen Hoden und Thecazellen des adulten Ovars gezeigt werden (Branciforte and Martin, 1993; Branciforte and Martin, 1994; Trelogan and Martin, 1995). Alle Versuche ORF2p im Menschen oder in der Maus nachzuweisen, blieben bis dahin erfolglos (Ostertag and Kazazian, 2001a). Es war somit bis dahin unklar, ob ORF2 in vivo translatiert wird.

In *Drosophila* wurden die Non-LTR-Retrotransposons *HeT-A* und *TART* hinsichtlich der Expression, der Lokalisation und dem Transport ihrer Gag Proteine, die ihre Entsprechung in ORF1p des menschlichen L1 finden, genauer untersucht. Die Gag Proteine beider Elemente werden schnell und effizient in den Zellkern transportiert (Rashkova *et al.*, 2002b). Allerdings ist die Anwesenheit von *HeT-A* Gag erforderlich um *TART* Gag zu den Telomeren der Chromosomen zu dirigieren, wo die Insertion stattfindet (Rashkova *et al.*, 2002a). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Gag Proteine von *HeT-A* und *TART* miteinander interagieren. Durch Deletionsexperimente konnten zwei separate, funktionelle Proteinregionen im N-terminalen und C-terminalen charakterisiert werden. Sowohl in *HeT-A* Gag als auch in *TART* Gag ist die N-terminale Region für den Transport in den Zellkern notwendig. Zusätzlich gibt es in *HeT-A* eine Region im C-terminalen Bereich, welcher ebenfalls eine Kernlokalisation bewirkt. Unabhängig von der Lokalisation der Proteine sind Polypeptide aus dem C-terminalen Bereich von *HeT-A* Gag und *TART* Gag für spezifische Protein-Protein Interaktionen verantwortlich. Die Zink-Finger plus Leucin-Zipper Region oder die MHC-Region (*major homology region*) allein sind für homologe oder heterologe Interaktionen zwischen den beiden Gag-Proteinen ausreichend (Rashkova *et al.*, 2003). Bis auf die MHC-Region liegen diese Motive auch im L1-ORF1p vor.

3.3.3 Replikationszyklus

Die Integration einer neuen L1-Kopie in einen genomischen Zielort wird durch den Prozess der sog. *target-primed reverse transcription* (TPRT) initiiert (Abb. 3) und erfolgt in die degenerierte genomische Konsensus-Zielsequenz 5'-TTTT/A-3' (Cost and Boeke, 1998; Feng *et al.*, 1996; Jurka, 1997). Die EN-Domäne des ORF2p erkennt und bindet die spezielle DNA-Struktur der Konsensus-Zielsequenz und spaltet den Erst- oder Folgestrang meist direkt am TA-Übergang der Zielsequenz, wodurch ein freies 3'-OH-Ende generiert wird. Nach Anlagerung des PolyA-Schwanzes der L1-mRNA, fungiert diese als Template. Es folgt die reverse Transkription und die Verbindung des 5'-Endes der neusynthetisierten cDNA mit der genomischen DNA. Der Zweitstrang der genomischen Zielsequenz wird anschließend an variablen Stellen 3'- von der komplementären Sequenz der degenerierten genomischen Konsensussequenz, bevorzugt im Abstand von 15-16 bp, gespalten (Jurka, 1997; Szak *et al.*, 2002; Zingler *et al.*, 2005).

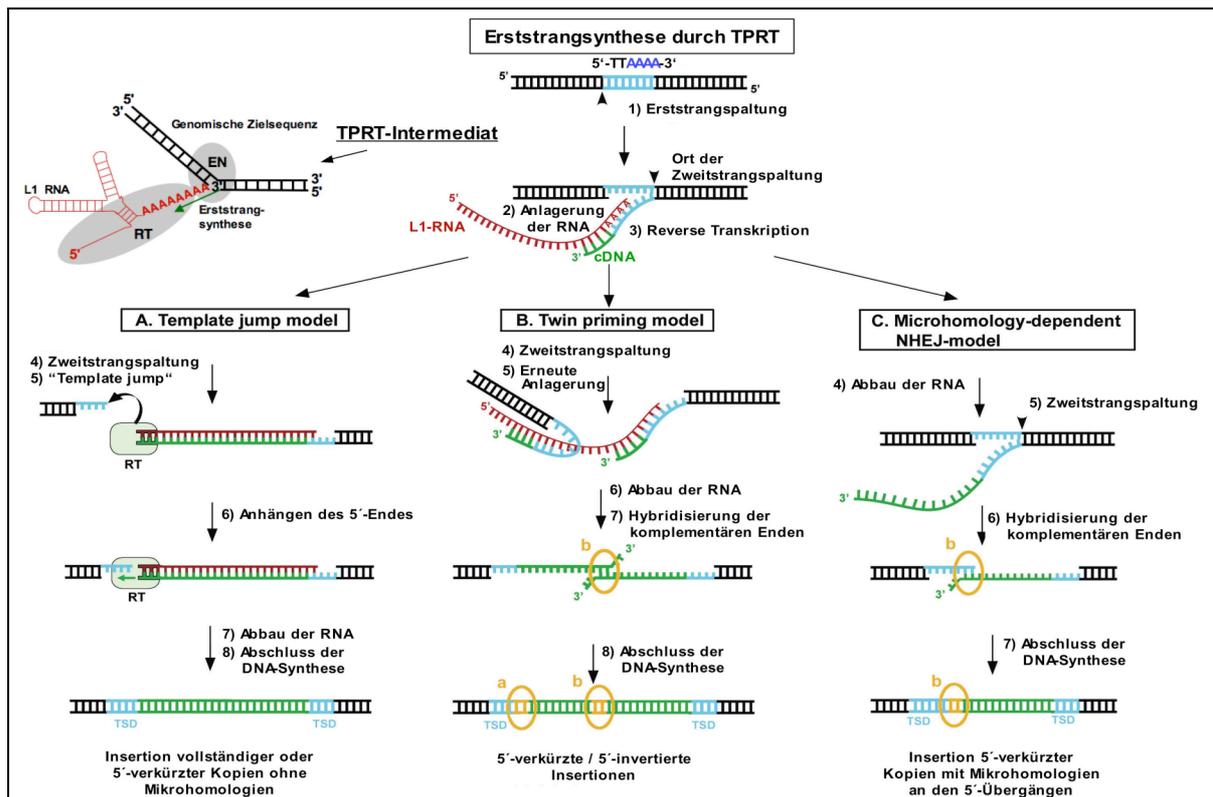


Abb. 3: Modell des Mechanismus der L1-Retrotransposition. Entsprechend dem Modell der "target primed reverse transcription" (TPRT), schneidet L1-EN den Erstrang der genomischen Ziel-DNA (1) und generiert eine freie 3'-Hydroxyl-Gruppe, welche als Primer für die reverse Transkription der vollständigen RNA von L1 fungiert. Dabei bilden ORF1p und ORF2p zusammen mit der L1-RNA ein RNP, der als Initiator der TPRT agiert. Die EN des ORF2p erkennt und bindet ihre Zielsequenz (blau) auf der genomischen DNA und katalysiert die Hydrolyse des Erstrangs der Zielsequenz (1). Mit dem PolyA-Schwanz kann sich die L1-RNA an die TTTT-Abfolge der Zielsequenz anlagern (2) und das bei der Hydrolyse des Folgestrangs entstandene freie 3'-OH dient der RT des ORF2p als Primer für die Erststrangsynthese, wobei die L1-RNA (rot) als Matrize fungiert (3). Dabei entsteht ein TPRT-Intermediat, in dem die neu synthetisierte cDNA von L1 (grün) direkt mit dem Folgestrang der genomischen DNA verbunden ist. (A) "*Template jump model*": Nach Beendigung der Erststrangsynthese wird der Zweitstrang geschnitten (4) und L1-RT springt von der L1-RNA-Matrize auf die 5'-gelegene Ziel-DNA (5). Die cDNA-Synthese wird, unter Verwendung des genomischen 3'-Überhangs als Matrize, fortgeführt, und das 3'-Ende der entstehenden cDNA wird an die genomische DNA angehängt (6). Findet der "Template jump" (Matrizenwechsel) vom 5'-Ende einer vollständigen RNA-Kopie aus statt, entsteht ein vollständiges L1-Element. Ist die L1-RNA jedoch am 5'-Ende degradiert, entsteht eine 5'-verkürzte Kopie ohne das es zur Bildung von Mikrohomologien kommt. (Eickbush, 2002; Bibillo and Eickbush, 2004). (B) "*Twin priming model*": L1-EN spaltet den Zweitstrang (4) noch bevor die reverse Transkription des ersten cDNA-Strangs vollendet wurde (3). Dieser Vorgang erzeugt eine zusätzliche 3'-Hydroxyl-Gruppe und ein kurzes einzelsträngiges DNA-Stück, welches als interner Primer verwendet wird. Dieser Primer lagert sich an komplementäre Nukleotide im Inneren der L1-RNA an und initiiert die reverse Transkription stromaufwärts vom 3'-Ende der L1-RNA (5), wo die TPRT ursprünglich gestartet wurde. Nachdem die RNA des RNA/cDNA Hybrids degradiert wurde (6), können die einzelsträngigen cDNA in Regionen mit hoher Komplementarität aneinander binden (7) und dienen einander als Primer für den Abschluss der DNA-Synthese (8). (Ostertag and Kazazian, 2001b). In diesem Modell sind Orte mit Mikrohomologien die Folge von RNA/DNA Hybridisierung am 5'-Übergang (a) oder DNA/DNA Basenpaarung am Inversionspunkt (b). (C) "*Microhomology-mediated end-joining model*": Nach dem Start der TPRT fällt die RT von der RNA-Matrize ab, bevor sie das 3'-Ende der RNA erreicht hat (3). Die Zweitstrangspaltung (5) findet erst statt, nachdem die reverse Transkription gestoppt und die L1-RNA abgebaut wurde (4). In Regionen mit hoher Komplementarität können der 3'-Überhang aus der chromosomalen Zielsequenz und das 3'-Ende der L1-cDNA miteinander hybridisieren (6) und dienen einander als Primer für die Zweitstrangsynthese (7), was zur Entstehung von 5'-verkürzten L1-Kopien mit Mikrohomologien an den 5'-Übergängen führt (b). Nach der Vollendung der Zweitstrangsynthese wird der Zweitstrang in allen drei Modellen durch zelluläre Ligasen mit der Ziel-DNA kovalent verbunden (verändert nach Zingler *et al.*, 2005).

Abhängig von der genauen Position des zweiten Einzelstrangschnittes auf dem Führungsstrang relativ zum Schnitt im Folgestrang, kann es entweder zu einer Deletion an der Integrationsstelle kommen, zu einer bündigen Insertion ohne Veränderung der Integrationsstelle oder zu den bereits erwähnten Zielsequenzverdoppelungen, die das neu integrierte L1 Element flankieren.

Ursprünglich wurde das TPRT-Modell an R2Bm, einem Non-LTR Retrotransposon der Seidenmotte (*Bombyx mori*) entwickelt (Luan and Eickbush, 1995; Luan *et al.*, 1993).

Damals gelang es ein TPRT-Intermediat zu isolieren, durch welches bestätigt werden konnte, dass die freie 3'-Hydroxylgruppe des Folgestrangs als Primer für die Synthese der cDNA der neuen R2Bm-Kopie dient (siehe Abb. 3). Inzwischen konnten aber auch für das menschliche L1 Element die ersten Schritte des Retrotranspositionsprozesses *in-vitro* nachgestellt und so die Gültigkeit des TPRT-Modells für die Retrotransposition von L1 (Abb.3) demonstriert werden (Cost *et al.*, 2002).

Während also der Mechanismus der Erststrangsynthese einer neuen L1-Kopie am Zielort verstanden worden ist, bleibt der Mechanismus der Verknüpfung des 5'-Endes der L1-Sequenzen mit der genomischen DNA sowie die Zweitstrangsynthese noch unklar. Genauere Untersuchungen der Übergänge zwischen den L1 5'-Enden und der jeweiligen angrenzenden genomischen Zielsequenz, führte zu der Schlussfolgerung, dass zelluläre Mechanismen der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) an diesen abschließenden Schritten der L1-Retrotransposition beteiligt sein könnten (Symer *et al.*, 2002; Zingler *et al.*, 2005). Es wurden drei verschiedene Theorien aufgestellt, die Integration von 5'verkürzten/5'invertierten Elementen sowie von vollständigen oder 5'verkürzten Elementen erklären.

Das "template jump model" (Abb. 3A) stellt ein Modell für die Entstehung von vollständigen und 5'verkürzten Elementen ohne die zwingende Anwesenheit von Mikrohomologien dar (Bibillo and Eickbush, 2004; Eickbush, 2002). Nach Synthese des Leitstranges wird der Folgestrang geschnitten und die RT springt von der L1-Template-RNA zur 5' genomischen Ziel-DNA. Die Zweitstrangsynthese wird anschließend durch die Verwendung des genomischen 3'-Überhangs, der als Template fungiert, weitergeführt.

Die Kombination aus Verkürzung und Inversion wurde durch eine Variation der TPRT, dem "twin priming model" (Abb. 3B), erklärt (Ostertag and Kazazian, 2001b). Die Struktur der variablen Zielsequenz-Verdopplungen (vTSDs), welche das *de novo* integrierte L1-Element flankieren lässt hierbei ein Modell für die Zweitstrangsynthese vermuten, dass auch als "microhomology-driven single strand annealing" bezeichnet wird (Symer *et al.*,

2002). In diesem Modell sind Mikrohomologien zwischen genomischer Zielsequenz und invertierter L1-cDNA für Basenpaarungen komplementärer Bereiche verantwortlich. Dies ist ein typischer Mechanismus für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen über den alternativen Weg des "*non-homologous endjoining pathway*" (NHEJ), der Mikrohomologien in einer Größenordnung von 1-10 Nukleotiden verwendet (Gottlich *et al.*, 1998; Pfeiffer *et al.*, 2000; Thacker *et al.*, 1992). Das alternative NHEJ unterscheidet sich von dem klassischen Reparaturmechanismus dadurch, dass Reparaturfaktoren, wie z.B. Ku70, Ku86, DNA-PKcs, XRCC4, Artemis oder DNA-Ligase IV nicht verwendet werden (Bentley *et al.*, 2004; Roth, 2003). Beim "*twin priming*" Modell schneidet die L1-EN den DNA-Folgestrang, bevor die reverse Transkription der Leitstrang-cDNA abgeschlossen ist. Dadurch wird ein freies 3'-OH-Ende und ein kurzer Bereich einzelsträngiger DNA generiert, welche im nächsten Schritt als Template fungiert. Dieser Primer lagert sich an komplementäre Bereiche auf der L1-RNA an, und dient als Ausgangsstelle für die L1-RT. Die reverse Transkription wird anschließend in 5'-3'-Richtung durchgeführt. Nach Degradation der RNA vom RNA/cDNA-Hybrid, paart sich die verbleibende cDNA mit einer kleinen Region limitierter Komplementarität von durchschnittlich 3 bp Länge, und die DNA-Synthese wird abgeschlossen (Ostertag and Kazazian, 2001b). Bei dem "*microhomology-mediated end-joining pathway*" diffundiert die RT nach Initiierung der TPRT von der Template-RNA ab, bevor das 5'-Ende der RNA erreicht wurde (Abb. 3C). Der Schnitt des Folgestranges erfolgt erst nachdem die reverse Transkription gestoppt und die L1-RNA degradiert wurde. Der 3'-Überhang der Ziel-DNA lagert sich an das 3'-Ende der L1-cDNA an einer Region mit limitierter Komplementarität an und dient als Primer für die Synthese des Folgestranges. Es resultiert ein 5'-verkürztes L1-Element mit Mikrohomologien an der 5'-Verbindung zur genomischen DNA. In allen drei Modellen wird der Folgestrang der DNA mit der genomischen Zielsequenz über die Beteiligung von zellulären Ligasen nach Komplettierung der Zweitstrangsynthese verknüpft (Zingler *et al.*, 2005).

Der komplette Replikationszyklus von aktiven L1-Elementen findet ausschließlich innerhalb derselben Zelle statt und führt meist zu 5'-verkürzten L1-Kopien. Ausgehend von einem rk-L1 Element wird die Transkription vom internen Promotor aus initiiert und produziert eine vollständige L1-mRNA, die anschließend aus dem Kern in das Zytoplasma exportiert wird (siehe Abb. 4). Hier findet die Translation der beiden L1 kodierten Proteine statt. Mutationsanalysen haben demonstriert, dass die gleichzeitige Anwesenheit von funktionellem ORF1p und ORF2p für die Retrotransposition von L1 essentiell ist (Feng *et*

al., 1996; Moran *et al.*, 1996). ORF1p und ORF2p zeichnen sich durch eine *cis*-Präferenz für die eigene L1-mRNA aus von der sie translatiert wurden und bilden mit dieser zytoplasmatische Ribonukleoprotein-Partikel (RNP) (Esnault *et al.*, 2000; Kulpa and Moran, 2005; Moran *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass die L1-kodierten Proteine durch die *cis*-Präferenz im wesentlichen die Retrotransposition ihrer eigenen mRNA bewerkstelligen, erklärt auch, wie eine relativ geringe Zahl von ca. 80 - 100 rk-L1 Elementen trotz einer gewaltigen Überzahl an nicht funktionellen L1-Kopien im menschlichen Genom persistieren konnten (Brouha *et al.*, 2003).

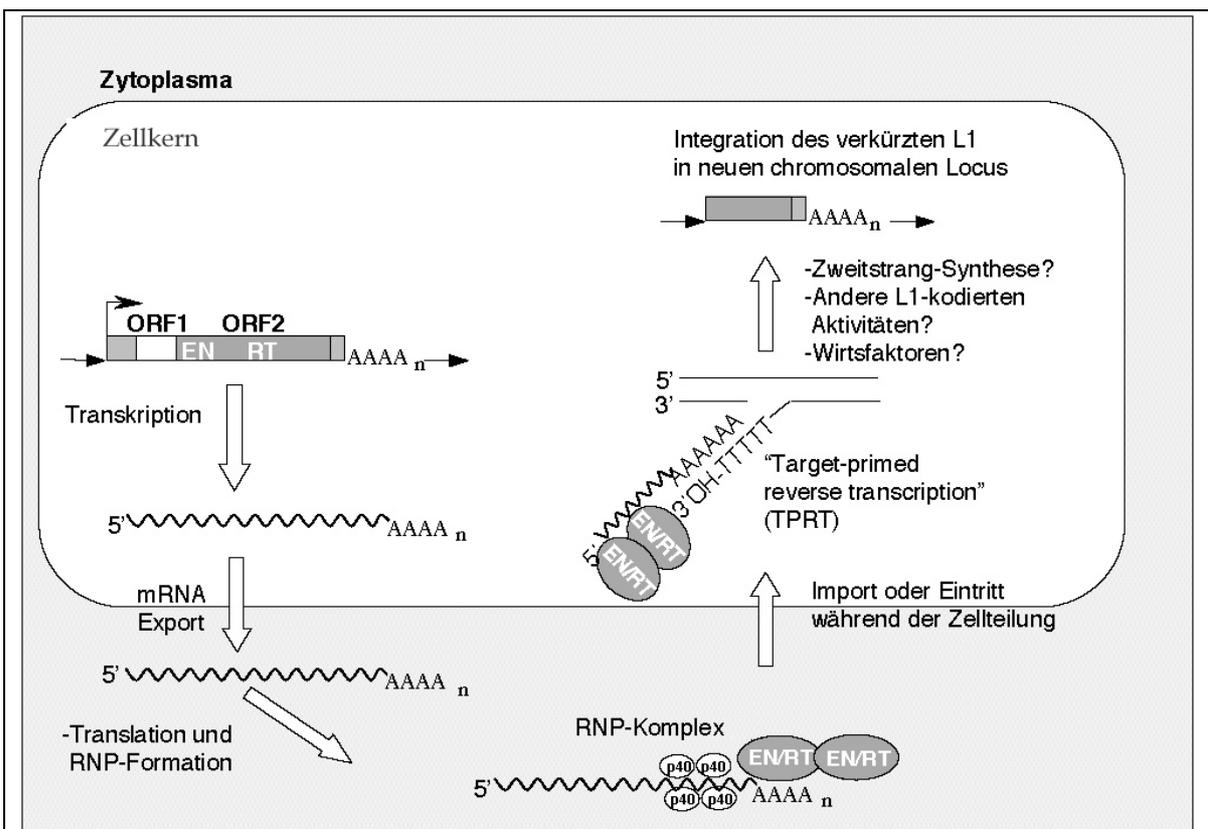


Abb. 4: Modell des L1-Replikationszyklus. Ein aktives L1-Element wird im Zellkern von Keimzellen transkribiert und die resultierende L1-mRNA in das Zytoplasma exportiert, um dort translatiert zu werden. Die beiden von L1 kodierten Proteine, ORF1p (p40) und ORF2p, bilden einen Komplex mit dem für sie kodierenden L1-Transkript im Ribonukleoproteinpartikel (RNP). Diese Partikel werden dann zurück in den Zellkern zur genomischen Rezipienten-DNA transportiert, wo die TPRT stattfindet. Im ersten Schritt dieser Reaktion spaltet die EN-Aktivität des vermuteten RT/EN-Polypeptids den nicht-kodierenden Erststrang der Zielsequenz und verwendet das so hergestellte freie 3'-Ende um den Prozess der reversen Transkription zu initiieren. Während oder nach der reversen Transkription findet die Spaltung des Zweitstranges statt. Neueste Ergebnisse sprechen für das Modell des "microhomology-driven single-strand annealing" als Ausgangspunkt für die Initiierung der Zweitstrangsynthese (Zingler *et al.*, 2005). Die neu in das Wirtsgenom integrierte L1-Kopie ist in 95 % aller Fälle an ihrem 5'-Ende stark verkürzt und somit nicht replikationskompetent. Viele Fragen zu den aufgezeigten Schritten dieses Replikationszyklus sind noch offen. Die Bildung eines RNP-Komplexes sowie die Anwesenheit von ORF1p im Zellkern wurden experimentell noch nicht gezeigt. EN = Endonuklease, ORF = offener Leserahmen, RT = Reverse Transkriptase, TPRT = "target primed reverse transcription". (verändert nach (Kazazian and Moran, 1998; Kazazian, 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die RNPs, die aus ORF1p, ORF2p und der L1-RNA zusammengesetzt sind, vom Zytoplasma in den Zellkern gelangen (Kulpa and Moran, 2005). Zellkulturstudien belegten, dass humanes ORF1p und L1-RNA in zytoplasmatischen RNPs von 2102EP und in NTerra2D1-Zellen vorliegt (Holmes and Singer, 1992; Kolosha and Martin, 1997). Sowohl kleinere RNPs mit nur einer einzigen L1-RNA Kopie als auch RNP-Komplexe höherer Ordnung mit mindestens zwei L1-RNAs sind theoretisch möglich (Abb. 4). Einzig für das bei der Komplexierung involvierte p40 scheint klar, dass es als Multimer im L1-RNP vorliegt (Hohjoh and Singer, 1996). Diese Ergebnisse stützten die Vermutung, dass RNPs wichtige Retrotranspositionsintermediate sind. Durch die Verwendung von epitopmarkierten ORF1ps konnte eine Kolo-kalisation von ORF1p und seiner kodierenden L1-RNA in zytoplasmatischen RNPs nachgewiesen werden (Kulpa and Moran, 2005). Eine Beteiligung des ORF2p am Aufbau der RNP-Partikel ist Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Erste Hinweise hierauf gab es durch den Nachweis einer reversen Transkriptase-Aktivität in RNP-Isolaten aus menschlichen Teratokarzinomzellen (Deragon *et al.*, 1990). Die Interaktion von ORF2p mit seiner Template-RNA ist für die Retrotransposition unerlässlich. Zusammen mit Mutationsexperimenten mit ORF1p konnte gezeigt werden, dass die Bildung von RNPs wichtig, aber nicht ausreichend für die L1-Retrotransposition ist (Kulpa and Moran, 2005). Außerdem wird diskutiert, ob zusätzlich zu den L1-kodierten Proteinen auch zelluläre Faktoren bei der Bildung des RNP-Komplexes eine Rolle spielen.

Es gibt zwei verschiedene Alternativen, die erklären würden, wie zytoplasmatische RNPs zur genomischen Ziel-DNA gelangen könnten. Entweder sie bewegen sich passiv zur genomischen DNA nach dem Zusammenbrechen der Kernmembran während der Mitose oder der gesamte RNP-Komplex wird aktiv durch die Kernmembran in das Innere des Zellkerns transportiert. Für das humane L1 konnte diese Frage noch nicht beantwortet werden, aber Studien über Tad, ein Non-LTR Retrotransposon aus *Neurospora crassa* zeigten, dass in diesem Fadenpilz der RNP-Komplex durch einen aktiven Transport in den Kern importiert wird und ein Abbau der Kernmembran während der Mitose nicht notwendig ist (Kinsey, 1993). Sobald die L1-RNA zusammen mit den L1-kodierten Proteinen die genomische Ziel-DNA erreicht hat, findet die Erstrangsynthese an der Zielsequenz über den TPRT-Mechanismus statt (Abb. 3). Die nach Anschluss der Zweitstrangsynthese entstandenen neuen L1-Kopien sind mehrheitlich am 5'-Ende verkürzt (Abb.4). Die Durchschnittslänge eines L1-Elements im menschlichen Genom liegt daher nur bei etwa 1640 bp (Szak *et al.*, 2002). Nur ca. 0,01 % der

Integrationsereignisse führt zu vollständigen und replikationskompetenten Kopien, die sich als Garant für das Überleben von L1 im Menschen weiter ausbreiten können (Brouha *et al.*, 2003).

3.3.4 Der Einfluss von L1 auf das Genom des Wirtsorganismus

LINE-1 Retrotransposons machen etwa 21% des menschlichen Genoms aus (Lander *et al.*, 2001) und spielen eine signifikante Rolle bei der Gestaltung des Genoms in Säugetieren (Beck *et al.*, 2011). Mehr als 75 % der menschlichen Gene enthalten mindestens eine integrierte L1-Kopie, die normalerweise in Introns oder den 5'- bzw. 3'-untranslatierten Bereichen liegt (Han *et al.*, 2004). Ihr Einfluss beschränkt sich jedoch nicht nur auf die eigene Ausbreitung, sondern LINE-Elemente sind auch für die Mobilisierung von heterologen Sequenzen verantwortlich.

LINE-1 verändert das Wirtsgenom durch (I) Insertion von neuen Kopien seiner selbst, (II) Destabilisierung des Genoms verursacht durch substanzielle Deletionen und Inversionen (Gilbert *et al.*, 2002; Mine *et al.*, 2007; Symer *et al.*, 2002), (III) häufig vorkommende Transduktion von 3'-beziehungsweise 5'-flankierenden genomischen Sequenzen, (IV) *trans*-Aktivierung von *Alu*-Elementen, SVA-Elementen (Ostertag and Kazazian, 2001a) und Erzeugung von prozessierten Pseudogenen, die zusammen einen Anteil von etwa 15 % der genomischen DNA abdecken, durch (V) alternatives Spleißen und dem Überspringen von Exons und (Mulhardt *et al.*, 1994; Takahara *et al.*, 1996) und durch (VI) homologe Rekombination zwischen nicht-allelischen L1-Elementen (Burwinkel and Kilimann, 1998). Durch L1-Neuinsertionen verursachte Mutagenese konnte in vielen Fällen nachgewiesen werden. So wurde die erste L1-Retrotransposition entdeckt, als man 1988 feststellte, dass die Neuintegration von verkürzten L1 Kopien in Exon 14 des Faktor VIII Gens die Ursache für mehrere Fälle der genetischen Erkrankung Hämophilie war (Kazazian *et al.*, 1988). Später fand man auch bei einer ganzen Reihe anderer genetischer Erkrankungen die eigentliche Ursache in einer "de novo" L1-Insertion während der frühen Embryonalentwicklung oder in der Keimbahn (zur Übersicht siehe Tabelle 1). Noch häufiger als durch L1-Insertionen wurden genetische Krankheiten durch Insertionen von *Alu*-Elementen oder SVAs hervorgerufen, die ebenfalls durch L1 mobilisiert werden und in Tabelle 1 zusammengefasst sind (Belancio *et al.*, 2008).

Der Effekt der L1-Insertion beschränkt sich aber nicht ausschließlich auf die Unterbrechung und daraus resultierender Inaktivierung von vielleicht wichtigen Genen.

Abhängig vom genomischen Ort der Spaltung des zweiten DNA-Stranges, kann eine L1-Retrotransposition in seltenen Fällen sogar zu Zielsequenz-Verdoppelungen von über 6 kb führen (Symer *et al.*, 2002), welche die neue L1-Kopie flankieren. 10% der Neuinsertionen

Insertion	Häufigkeit x Locus	Chromosom	Krankheit
Alu	3 x F8a,b	X	Hämophilie B
	2 x F9b	X	Hämophilie A
	2 x CLCN5b	X	Dent-Syndrom
	2 x BTKb	X	Bruton-Syndrom
	IL2RGa	X	X-chromosomale Immundefizienz
	GKa	X	Juvenile familiäre Endokrinopathie
	ABCD1b	X	Adrenoleukodystrophie
	ATP7Ac	X	Menkes-Syndrom
	CD40LGd	X	Hyper-IgM Syndrom
	CRB1b	1	Retinale Erblindung
	SERPINC1b	1	Antithrombin III Mangel Type 1
	ZEB2b	2	Muckle-Wells Syndrom
	MSH2b	2	Lynch-Syndrom
	CASRa	3	Hypokalurische Hyperkalzämie + Hyperparathyroidismus
	BCHEa	3	Cholinesterase Defizienz
	HESX1b	3	Hypophysenvorderlappen-Aplasie
	MLVI2a	5	Zusammenhang mit Leukämie
	2 x APCa	5	Familiäre infiltrative Fibromatose
	NT5C3e	7	Chronisch hämolytische Anämie
	2 x CFTRf	7	Zystische Fibrose
	EYA1a	8	Branchio-oto-renales Syndrom
	LPLg	8	Lipoprotein Lipase Defizienz
	CHD7h	8	CHARGE-Assoziation
	POMT1i	9	Walker-Warburg-Syndrom
	FASb	10	Autoimmunlymphoproliferatives Syndrom
	3 x FGFR2a	10	Apert-Syndrom
	SERPING1a	11	Komplementdefekt
	HMBSb	11	Akute intermittierende Porphyrie
	CMASj	12	Homo sapiens-spezifische evolutionäre Änderung
	MLVI2	12	I-Zell-Krankheit
	2 x BRCA2a	13	Mammakarzinom
	BRCA1a	17	Mammakarzinom
	NF1a	17	Recklinghausen-Krankheit
L1	CHMb	X	Choroiderämie
	2 x CYBBb	X	Septische Granulomatose
	4 x DMDb,k	X	Duchenne-Muskeldystrophie
	3 x F8b	X	Hämophilie A
	2 x F9b	X	Hämophilie B
	RP2b	X	X-chromosomale Retinitis Pigmentosa
	RPS6KA3b	X	Coffin-Lowry-Syndrom
	APCb	5	Darmkrebs
	FKTNb	9	Kongenitale muskuläre Dystrophie (Fukuyama-Typ)
	HBBb	11	Betathalassämie
	PDHXL	11	Pyruvatdehydrogenasedefekt
SVA	BTKb	X	Agammaglobulinämie (Bruton-Typ)
	LDLRAP1b	1	Autosomal rezessive Hypercholesterinämie
	SPTA1b	1	Hereditäre Elliptozytose + Hereditäre Pyropoikilozytose
	FKTNb	9	Kongenitale muskuläre Dystrophie (Fukuyama-Typ)

Tab. 1: Insertionen und Krankheiten (aus Belancio *et al.* 2008).

zeichnen sich durch substantielle Deletionen der genomischen Ziel-DNA an der Integrationsstelle aus, welche bisher in zwei Fällen an der Entstehung von Brustkrebs bzw. dem Apert-Syndrom beteiligt waren (Segal *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). L1-Retrotranspositionereignisse können auch häufig zu Insertionen von bis zu 100 zusätzlichen Nukleotiden, sowie zu chromosomalen Inversionen an der genomischen Integrationsstelle führen (Symer *et al.*, 2002). Das Phänomen der 3'-Transduktion von Sequenzen des Wirtsgenoms ist ein potentieller Mechanismus für die Transposition von Exonsequenzen zwischen verschiedenen Genen (Moran *et al.*, 1999). Dies geschieht, wenn das schwache L1-Polyadenylierungssignal überlesen wird und stattdessen ein benachbartes zelluläres L1-Polyadenylierungssignal für die Terminierung der Transkription verwendet wird (Moran *et al.*, 1999). Dadurch können beispielsweise Exons, die zwischen den beiden L1-Polyadenylierungssignalen liegen, quasi "Huckepack", mit der transponierten L1-Sequenz kopiert und an anderer Stelle integriert werden. Bei etwa 10 - 20 % der jüngeren L1-Retrotranspositionereignisse scheint es zur Transduktion von 3'-gelegenen Sequenzen gekommen zu sein (Moran *et al.*, 1999). Da transponierte L1-Elemente zumeist am 5'-Ende verkürzt sind, kann es sogar vorkommen, dass eine Chimäre aus L1 und genomischer Sequenz soweit verkürzt wird, dass die 3'-transduzierten Sequenzen überhaupt keine L1-Bereiche mehr beinhalten, sondern einzelne Exons innerhalb des Genoms transduziert werden. Die 5'-Transduktion durch Start der Transkription von stromaufwärts gelegenen starken Promotoren ist hingegen ein sehr seltenes Ereignis.

Außergewöhnlich beim Retrotranspositionsprozess von L1 ist die hohe Spezifität der L1-Proteinmaschinerie für die eigene mRNA, was auch als cis-Präferenz bezeichnet wird. Zwar werden auch zelluläre RNAs von den L1-Proteinen aktiv transponiert, was zur Entstehung prozessierter Pseudogene führt. Allerdings geschieht dies nur in etwa 0,01 - 0,05 % der Fälle (Esnault *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001). Ausnahmen der cis-Präferenz bilden das *Alu*-Element, SVA-Elemente und andere SINEs. Die evolutionäre Verwandtschaft zwischen *Alu*-RNA und SRP-RNA, eines integralen Bestandteils des ribosomalen Translationsapparates und die darauf zurückzuführende Fähigkeit der *Alu*-RNA an die SRP-Proteine 9 und 14 zu binden, ermöglichen es der *Alu*-RNA in die unmittelbare Nähe neu synthetisierter, funktioneller L1-Proteine direkt aus dem ribosomalen Translationsapparat transportiert zu werden (Boeke, 1997). Dort konkurriert die *Alu*-RNA mit der L1-RNA während der Translation um die Bindung der L1-Proteine an den PolyA-Schwanz. Diese *trans*-Mobilisierung von *Alu*-Elementen mittels L1-kodierter Proteine ist vergleichsweise effektiv. Retrotranspositionsversuche in der

Zellkultur ergaben eine 100 - 1.000 fach höhere Retrotranspositionsfrequenz von *Alu*-Elementen im Vergleich mit einer Kontroll-RNA (β -Galaktosidase) (Dewannieux *et al.*, 2003). Addiert man zu den 17 % an L1-Anteil am Genom nun die prozessierte Pseudogene und *Alus* hinzu, so ergibt sich in der Summe, dass ca. ein Drittel des menschlichen Genom direkt oder indirekt durch die Aktivität von L1-Elementen entstanden ist.

Während die oben aufgezählten Effekte die direkten Folgen der L1-Mobilisierung verdeutlichen, gibt es zusätzlich noch die indirekten Folgen für unser Genom. Dazu zählt vor allem die homologe Rekombination, die während der Meiose stattfindet und substantiell zur Entstehung neuer Kombinationen von Allelen beiträgt. Durch seine hohe Kopienzahl ist L1 ein Hauptansatzpunkt für die homologe Rekombination. Nicht-allelische Rekombination kann aber auch zu umfangreichen genomischen Verschiebungen und Krankheiten führen (Moran, 2002).

Die 5'-UTR des humanen L1 beherbergt nicht nur den bisher erwähnten internen Promotor, welcher für die eigene Replikation benötigt wird. Es wurde zusätzlich auch ein in die umgekehrte Richtung weisender Polymerase II Promotor gefunden (Speek, 2001). Dieser Antisense Promotor (ASP) kontrolliert den alternativen Transkriptionsstart einer Reihe unterschiedlicher Gene und führt zu fusionierten Transkriptionsprodukten (Nigumann *et al.*, 2002; Speek, 2001). Da innerhalb des ASP eine potentielle RUNX-Bindestelle liegt (+526 bis +508) könnte die Aktivität dieses Promotors ebenfalls über RUNX3 reguliert werden (Yang *et al.*, 2003). Zieht man die große Zahl von L1-Elementen im menschlichen Genom in Betracht, könnten die aktiven ASPs die normale Genexpression im großen Stil beeinflussen und einen weit verbreiteten Mechanismus der L1-vermittelten Transkriptionskontrolle darstellen.

Eickbush stellte nach phylogenetischen Analysen die Hypothese auf, dass sich die Telomerasen aus Non-LTR-Retrotransposons entwickelt haben (Eickbush, 1997). Demnach sollen Retrotransposons von Eukaryonten herangezogen worden sein, um die Verlängerung der Telomeren - spezialisierten Strukturen an den Enden von Chromosomen - innerhalb der Zelle zu übernehmen. Diese Daten zeigen einen weiteren Weg, wie Retrotransposons unser Genom verändert haben könnten (Eickbush, 1997).

Von den zahlreichen genetisch bedingten Krankheiten, die durch L1-Interaktionen verursacht wurden, ist nur ein Teil auf direkte Unterbrechung von kodierenden Bereichen oder wichtigen regulatorischen Sequenzen, wie dem Promotor zurückzuführen. In vielen Fällen kam erst während des Spleißens die Auswirkung der L1-Integration zum tragen. Entweder wurde ein betroffenes Exon übersprungen, wie in einem Fall von Muskeldystrophie oder es

kam zu alternativen Spleißvarianten (Mulhardt *et al.*, 1994; Narita *et al.*, 1993). In einem Fall von chronischer Granulomatose fand sich die Ursache in einem zusätzlichen Exon, welches durch die L1-Integration entstanden war (Meischl *et al.*, 2000). Eine Isoform des menschlichen *Attractin*-Gens ist auf die Integration eines L1-Elements zurückzuführen und somit ein Beispiel für einen positiven Beitrag von L1 für die menschliche Evolution (Tang *et al.*, 2000).

Eine andere nützliche Funktion, die L1 im Verlauf der Evolution übernommen hat, ist die Reparatur von DNA-Strangbrüchen im Genom. In Zellen mit beeinträchtigter DNA-Reparatur konnte gezeigt werden, dass L1 in einem Endonuklease-unabhängigen Retrotranspositionsvorgang in vorhandene DNA-Läsionen integriert, was zu einer L1-abhängigen Reparatur der DNA-Strangbrüche führte (Morrish *et al.*, 2002).

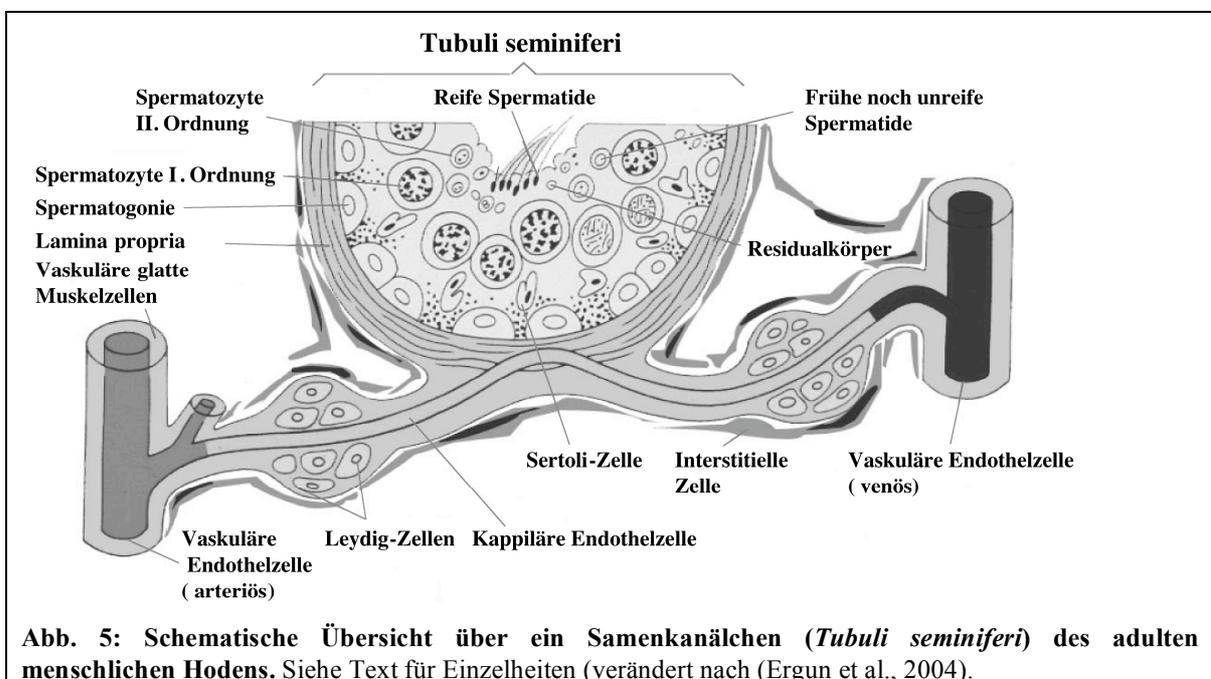
Analysen haben ergeben, dass schwach exprimierte Gene wesentlich mehr L1-Sequenzen enthalten als stark exprimierte Gene. Dies wird darauf zurückgeführt, dass L1-Sequenzen von mehr als 1 kb mit der Elongation von RNA interferieren (Han *et al.*, 2004). Zusammengenommen machen all diese Faktoren das menschliche L1 zu einer bedeutenden Quelle für Genominstabilität und zu einer Triebfeder für die Evolution.

3.4 Keimbahnentwicklung und Spermatogenese des Menschen

Es wurde gezeigt, dass L1-Retrotranspositionereignisse sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimzellen stattgefunden haben (Ostertag and Kazazian, 2001a). Nur diejenigen Ereignisse, die in solchen Zellen stattfinden, die für die nächste Generation vorgesehen sind, können auch an die folgenden Generationen weitergegeben werden. In Säugetieren sind dies die primordialen Keimzellen (*primordial germ cells*, PGC), reife Keimzellen und die Zellen der frühen Embryonalentwicklung, bevor die Keimzelllinie sich von den somatischen Zellen abspalten hat. Gonaden und hier insbesondere die männlichen Keimdrüsen gelten daher als Erfolg versprechendes Ausgangsmaterial, um sowohl *in vivo* L1-Retrotranspositionereignisse zu untersuchen, als auch die daran beteiligten Proteine genauer zu charakterisieren. So deuten die bisherigen Untersuchungen in Hodengewebe von Mäusen darauf hin, dass die Expression von ORF1p während der Keimbahnentwicklung in Embryonen stark variiert. Entwicklungsstadien mit starker Expression von ORF1p werden voneinander durch Stadien ohne nachweisbare Expression

getrennt (Trelogan and Martin, 1995). Deshalb wird vermutet, dass auch während der Keimbahnentwicklung im Menschen die L1-Expression spezifisch reguliert wird.

Die Entwicklung der männlichen Gameten beginnt mit den, in die Keimstränge der embryonalen Gonade eingewanderten PGCs (Moore, 1993). Um die 18. - 22. Schwangerschaftswoche hat die Hodendifferenzierung einen Stand erreicht, der ohne wesentliche Veränderungen über die Geburt hinweg bis zum Beginn der Pubertät bestehen bleibt. Bis zu diesem Zeitpunkt lassen sich im Hoden noch vereinzelt PGCs nachweisen, die aber im weiteren Verlauf über Prospermatogonien zu Spermatogonien differenzieren. Die Spermatogonien bilden den Ausgangspunkt für die Bereitstellung befruchtungsfähiger Keimzellen, die das Ergebnis eines langen Entwicklungs- und Reifungsprozesses, der so genannten Spermatogenese darstellen (Bustos-Obregon *et al.*, 1975). In den Hoden des geschlechtsreifen Mannes findet die Spermatogenese in den aus den Keimsträngen hervorgegangenen Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) statt (Abb. 5). Hier bauen Keimzellen zusammen mit somatischen Zellen (Sertolizellen) das Keimepithel auf. Peripher wird das Keimepithel von einer Basalmembran begrenzt, der als äußerer Abschluss des Samenkanälchens eine 7 -10 µm dicke *Lamina propria* aus mehreren Lagen von Myofibroblasten aufliegt (Abb. 5). Beim Menschen ziehen zwar Blutgefäße in die *Lamina propria* hinein, das Keimepithel selbst ist jedoch avaskulär (Ergun *et al.*, 1996).



Die Spermatogonien werden als Stammzellen der männlichen Keimzellentwicklung angesehen, deren Bestand in einer ständigen Vermehrungsphase durch mitotische Teilungen aufrecht erhalten wird (Schulze, 1979). Aus diesen gehen nach einer weiteren

mitotischen Zellteilung die Spermatozyten I hervor, die sich von der Basalmembran gelöst haben und in mehreren Lagen oberhalb der Spermatogonien im Keimepithel liegen (Abb. 5). Durch die nun folgende Teilung I der Meiose wird aus der diploiden Spermatozyte I eine haploide Spermatozyte II mit einem einfachen Chromosomensatz. Ohne eine weitere DNA-Reduplikation oder ein Zellwachstum zu durchlaufen treten sie in die Teilung II der Meiose ein, die wie eine normale Mitose verläuft, wobei die beiden entstehenden Tochterzellen von jedem Chromosom eine Chromatide erhalten. Die dadurch entstandenen unreifen Spermatiden sind die kleinsten und am weitesten lumenwärts gelegenen Zellen im Keimepithel eines Hodenkanälchens (Abb. 5). Während einer Phase komplizierter Differenzierungs-vorgänge, die durch eine Kondensation des Zellkerns, die Akrosomenbildung und die Entstehung einer Geißel gekennzeichnet sind (Holstein, 1976), reifen die Spermatiden heran, wobei der größte Teil des Zytoplasmas mit den nicht mehr benötigten Zellbestandteilen von der Spermatide als Residualkörperchen abgeschnürt (Breucker *et al.*, 1985). Nach Abschluss dieser Differenzierungsvorgänge wird die morphologisch reife Spermatide in einem als Spermatio bezeichnetem Vorgang aus dem Keimepithel abgegeben.

Die Keimzellen stehen während ihrer gesamten Entwicklungszeit in engem Kontakt mit den Sertolizellen. Diese Zellen bilden ein Stützgewebe für die Keimzellreifung und errichten außerdem die interzelluläre "*Zonulae occludentes*" (*tight junctions*), die sogenannte Sertolizellbarriere. Offensichtlich werden durch diese Blut-Hoden-Schranke die empfindlichen Keimzellen vor mutagenen Substanzen oder autoimmunreaktiven Antikörpern aus dem Blut effektiv geschützt (Dym and Fawcett, 1970). Des weiteren sind die Sertolizellen am Hormonmetabolismus beteiligt und zu eigener sekretorischer Tätigkeit befähigt.

Die *Tubuli seminiferi* sind in ein Interstitium eingebettet, das neben Bindegewebe, Blutgefäßen und interstitiellen Zellen vor allem die wichtigsten Hormonproduzenten des Hodens, die Leydigzellen, enthält (siehe Abb. 5). Das wichtigste Hormon, das in den Leydigzellen produziert wird, ist das Testosteron, welches wiederum stimulierend auf die Keimzellentwicklung wirkt (Weinbauer, 1990). Interessanterweise waren alle somatischen Zellen im Hodengewebe von Mäusen, in denen die Expression von ORF1p nachgewiesen werden konnte, ebenfalls in der Lage androgene Steroidhormone zu produzieren wie beispielsweise Testosteron (Trelogan and Martin, 1995).

4 Ziele dieser Arbeit

LINE-1 Retrotransposons machen etwa 17% des menschlichen Genoms aus und spielen eine signifikante Rolle bei der Gestaltung des Genoms in Säugetieren. LINE-1 verändert das Wirtsgenom durch (I) Insertion von neuen Kopien seiner selbst, (II) Destabilisierung des Genoms verursacht durch substanzielle Deletionen und Inversionen, (III) häufig vorkommende Transduktion von 3'-beziehungsweise 5'-flankierenden genomischen Sequenzen, (IV) *trans*-Aktivierung von *Alu*-Elementen, SVA-Elementen und Erzeugung von prozessierten Pseudogenen, die zusammen einen Anteil von etwa 12 % der genomischen DNA abdecken.

Mutationsanalysen haben bestätigt, dass sowohl ORF1 als auch ORF2 kodierte Proteine für eine erfolgreiche Retrotransposition erforderlich sind. Und obwohl L1-Retrotransposition sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimzellen nachgewiesen werden konnten, haben nur Keimbahnereignisse, die an eventuelle Nachkommen vererbt werden, eine potentielle Auswirkung auf den Verlauf der Evolution. Um die Mechanismen der oben beschriebenen mutagenen Einflüsse von L1 auf das Genom besser zu verstehen, wurden die Proteine, die an der L1-Retrotransposition beteiligt sind, im Rahmen dieser Arbeit eingehender untersucht.

Zu Beginn dieser Dissertation waren nur wenige Daten zur Expression von ORF1p aus Mäusen sowie malignen menschlichem Gewebe oder transformierten Zelllinien verfügbar und ein direkter Nachweis von ORF2p war noch nicht gelungen. Im ersten Teil der Arbeit sollten daher zuerst geeignete Antikörper zur Detektion von ORF1p und ORF2p hergestellt werden und anschließend die Expression der L1-kodierten Proteine, insbesondere in der Keimbahn untersucht werden.

Menschliche Zelllinien zeigen starke Unterschiede in der Retrotranspositionsfrequenz von L1. Differentiell exprimierte Wirtsproteine, die direkt an der L1-Retrotransposition beteiligt sind, könnten die Ursache für diese Beobachtung sein. Im zweiten Teil der Arbeit wurden daher mit Hilfe einer Hefe 2-Hybrid Analyse potentielle Interaktionspartner der L1-Endonuklease isoliert, um anschließend zu testen, ob diese einen Einfluss auf die L1-Retrotransposition haben.

5 Material

5.1 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme

5.1.1 Zelllinien

HeLa-Zellen	ATCC Katalog-Nr. CCL-2
HDMECs	HDMEC-p (Katalog-Nr. C-12260, PromoCell, Heidelberg)
Phönix-gp Zellen	293T-Zell basierte Verpackungszelllinie für die Herstellung von Viruspartikeln mit dem VSV-G Hüllprotein (Pear <i>et al.</i> , 1993)

5.1.2 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F' ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>rk⁻,mk⁺</i>) <i>phoA supE44 λ thi⁻¹ gyrA96 relA1</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
XL10-Gold	Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Stratagene, Heidelberg
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F' <i>dcm ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻) <i>gal λ</i>(DE3)</i>	Stratagene, Heidelberg
ElectroTen-Blue	Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Kan^r</i> [F' <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg

5.1.3 Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme wurden von der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) bezogen.

Stamm	Genotyp
AH109	<i>MATα trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2:: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA3:: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ MEL1</i>

5.2 Plasmide

5.2.1 *E. coli*-Klonierungs- und Expressionsvektoren

pET16b	EMD Biosciences, Inc., Novagen Brand, Madison, USA
pGEX(-2T)	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden

5.2.2 Hefe-Hybridvektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme wurden von der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) bezogen.

Plasmid	Eigenschaften	Selektion in <i>E. coli</i>	Selektion in <i>S. cerevisiae</i>
pACT2	8,1 kb, <i>GAL4</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD	amp ^r	<i>LEU2</i>
pCL1	15,5 kb, vollständiges <i>GAL4</i>	amp ^r	<i>LEU2</i>
pGBKT7	7,3 kb, <i>GAL4</i> ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD	kan ^r	<i>TRP1</i>
pGBKT7-53	8,3 kb, p53 ₍₇₂₋₃₉₀₎ aus der Maus	kan ^r	<i>TRP1</i>
pGADT7	8,0 kb, <i>GAL4</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD	amp ^r	<i>LEU2</i>
pGADT7-T	10,0 kb, grosses SV40 T-Antigen	amp ^r	<i>LEU2</i>

5.2.3 Expressionsvektoren für die Zellkultur

pJM101 L1.3	pCEP4 basierender Vektor mit L1-Reportgenkassette für den RTP-Test (Moran <i>et al.</i> , 1996)
R850	pLH-Z12I-PL basierender Vektor mit zusätzlicher Hygromycin-Reportergenkassette aus ARGENT™ Regulated Transcription Retrovirus Kit 2.0 (Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, USA)
R873	R850 basierender Testvektor mit integriertem ΔLNGFR-Gen
R874	pL ₂ N ₂ -R _H S3H/ZF3 basierender Vektor mit Puromycin- statt Neomycin-Resistenz aus ARGENT™ Regulated Transcription Retrovirus Kit 2.0 (Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, USA)

5.2.4 LINE-1 spezifische Oligonukleotide

Name	Sequenz*	Schnittstelle
GS 9	GACCAAAAGTAC <u>CATATG</u> ACCACAAAGATGG	NdeI
GS 10	TTTCTTCCTAGTCT <u>CCATGGT</u> CCTTAC	NcoI
GS 11	GTATCAGCCATGGAAGATGAAATGAATG	NcoI
GS 51	CC <u>CATATG</u> ACAGGATCAAATTCACACATAAC	NdeI
GS 52	CCGGATCCAATCCTGAGTTCTAGTTTGATTGC	BamHI
WS4F	CCCCAAG <u>CATATG</u> GGGAAAAAACAGAACAGAAAAAC	NdeI
WS5R	CCGGATCCATTTACATTTTGGCATGATTTTGCAG	BamHI

* Unterstrichen sind jeweils die palindromischen Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen

5.2.5 CREME9 spezifische Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
GS 96	CACCATCGTACAATGATGCCTCCAGG	5'-Klonierung, PCR
GS 97	GTACTGGTGGGCGAGATGCTACTGTTCC	5'-Klonierung, PCR
GS 130	GTTTCGCCGGCCGCGCGG	5'-Klonierung, PCR
GS 185	ACAAGCTTATGAGGGGGCGATGGAGCTGG	Klonierungs-PCR
GS 186	ACAAGCTTCTAAAACACTAACACTTTCCATCC	Klonierungs-PCR

5.2.6 Sonstige Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
GS 6	TTTTTCGTTTTTAAACCTAAGAGTC	PCR, Sequenzierung
GS 7	ATATAACTATCTATTCGATG	PCR
GS 69	GCACAGTTGAAGTGAAGTTGC	Sequenzierung
Oligo(dT) ₁₅	TTTTTTTTTTTTTTTTT	RT-Primer

5.3 Antikörper

5.3.1 Primäre Antikörper

Maus anti-c-myc Antikörper 9E10, monoklonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)

Maus anti-Lap2 Antikörper, monoklonal (BD Biosciences, Heidelberg)

Maus anti-ΔLNGFR Antikörper (Boehringer Mannheim)

Ratte anti-HA Antikörper 3F10, monoklonal (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

5.3.2 Sekundäre Antikörper

Cy3-markierter Esel anti-Huhn AK (Dianova, Hamburg)

Cy5-markierter Esel anti-Maus AK (Jackson ImmunoResearch, Soham, UK))

HRP gekoppelter Ziege anti-Maus AK (DAKO, Glostrup, Dänemark)

Alexa Fluor[®] 488 donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

Kaninchen anti-Chicken IgG AK Peroxidase gekoppelt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)

Biotinlierter Kaninchen anti-Chicken AK (Abcam, Cambridge, UK)

Phytoerythrin gekoppelter Ziege anti-Maus AK (DAKO, Glostrup, Dänemark)

Ziege anti-Kaninchen HRP gekoppelt (Amersham, Freiburg)

Ziege anti-Ratte IgG (H+L), F(ab')₂, Peroxidase gekoppelt (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

5.4 Nährmedien

5.4.1 Nährmedien für die Zellkultur

DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium ergänzt mit 10 % FCS und 2 mM Glutamin
HDMEC-Medium	Endothelial Cell Groth Medium MV (Katalog-Nr. C-22020, PromoCell, Heidelberg)

5.4.2 Nährmedien für *E. coli*

<u>LB-Medium:</u>	5 g/l	Hefe-Extrakt
	10 g/l	Pepton
	5 g/l	NaCl
	20 g/l	Agar (nur für Platten)

<u>DYT-Medium:</u>	10 g/l	Hefe-Extrakt
	16 g/l	Pepton
	5 g/l	NaCl
	20 g/l	Agar (nur für Platten)

5.4.3 Nährmedien für *S. cerevisiae*

<u>SD (<i>synthetic dropout</i>) - Medium:</u>	26,7 g/l	Minimal SD Base (Clontech)
	angegebene Menge	DO-Supplement (Clontech)

<u>SD-Platten:</u>	46,7 g/l	Min. SD Agar Base (Clontech)
	angegebene Menge	DO-Supplement (Clontech)

<u>YPD:</u>	10 g/l	Hefe-Extrakt
	20 g/l	Pepton
	20 g/l	α -D-Glukose
	20 g/l	Agar (nur für Platten)

5.5 Gebräuchliche Lösungen und Puffer

<u>Laemmli-Auftragspuffer (2x):</u>	0,1 M	Tris-Cl (pH 6,8)
	2 % (w/v)	SDS
	2 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
	20 % (v/v)	Glyzerin
	0,002 % (w/v)	Bromphenolblau

<u>PB (<i>phosphate buffer</i>):</u>	13 ml	0,1 M NaH ₂ PO ₄
	87 ml	0,1 M Na ₂ HPO ₄

PBS (phosphate buffered saline): 137 mM NaCl
 10 mM Na₂HPO₄
 2,7 mM KCl
 1,5 mM KH₂PO₄

SP-Puffer (pH 7,6): 13 ml 0,1 M NaH₂PO₄
 87 ml 0,1 M Na₂HPO₄
 0,1 M NaCl
 0,01 % (w/v) NaN₃
 ad 1 l H₂O

TBS (tris buffered saline): 137 mM NaCl
 10 mM Tris-Cl (pH 7,4)
 2,7 mM KCl

TTBS (mit Protease-Inhibitoren): TBS-Puffer siehe oben
 0,5% Tween 20
 1 Tablette je 10 ml Complete mini (5.6)

5.6 Chemikalien und Biochemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit im Text nicht anders angegeben, im Reinheitsgrad "pro analysi" von folgenden Firmen bezogen: Amersham (Freiburg), Biochrom (Berlin), Biomal (Hamburg), Boehringer (Mannheim), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Merck KGaG (Darmstadt), NeoLab (Heidelberg), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München).

Antibiotika: 100x Penicillin-Streptomycin Lösung (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

DNA-Farbstoff: DAPI (Merck KGaA, Darmstadt)

Einbettmedium: VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) und DePeX (EMS, Fort Washington, PA, USA)

Entparaffinierungsmittel: Histo-Clear (National Diagnostics, Hull, UK)

Enzymsubstrate:	x-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyrano-sid) (Boehringer, Mannheim)
G418:	Geneticin® Selective Antibiotic, liquid (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
Protease-Inhibitoren:	Complete mini protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
Sepharose:	Glutathion Sepharose 4B (Amersham, Freiburg), CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow (Amersham, Freiburg)
Transfektionsreagenz:	Fugene-6 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
X- α -Gal;	(5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- α -D-Galaktopy-ranosid) (Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France)

5.7 Radiochemikalien

Redivue -[^{35}S]methionine (Amersham, Freiburg)

5.8 Standards

BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

5.9 Enzyme

DNA modifizierende Enzyme, wie Restriktionsendonukleasen, T4 Ligase oder DNA-Polymerasen wurden von Roche (Mannheim), Invitragen GmbH (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), NEB (Schwalbach), PE Applied Biosystems (Weiterstadt), Stratagene (Heidelberg) und Qiagen (Hilden) bezogen. Die Reaktion wurden entsprechend den Herstellerangaben angesetzt und durchgeführt.

5.10 Kommerzielle Kits

ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)

ARGENT™ Regulated Transcription Retrovirus Kit 2.0 (Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, USA)

ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham, Freiburg)

Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden)

Qiagen Plasmid Mini, -Midi, -Maxi und -Giga Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

TA Cloning® Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

5.11 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Blotmembran: Protran Nitrocellulose Transfer Membrane (Schleicher und Schuell, Dassel)

Einfrierröhrchen: 0,8 ml Cryotubes (Nalge Nunc International, Rochester, USA)

Nitrozellulose-Rundfilter: BA 85, 0,45 µm (Schleicher und Schuell, Dassel)
Millex GP, 0,22µm (Millipore, Eschborn)

Faltenfilter: diverse (Schleicher und Schuell, Dassel)

Filterpapier: 3 MM (Whatman, Maidstone, UK)

Parafilm: M (Pechiney, Menasha, WI, USA)

Röntgenfilme: X-Omat AR (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA),
Hyperfilm ECL (Amersham, Freiburg)

5.12 Geräte

Agarosegelkammer: Sub-Cell System (BIO-RAD, München)

Western-Blotkammer: Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD, München)

Cycler: T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen)

Einfrier-Container: Cryo 1°C Freezing Container (Nalge Nunc International, Rochester, USA)

Elektroelution: ELUTRAP Electro-Seperation System (Schleicher und Schuell, Dassel)

IP-Anlage: Heidolph REAX2 (Heidolph Instruments, Schwabach)

Mikroskop: Axiovert 25 (Carl Zeiss, Oberkochen)

Rührer:	Ikamag RCT (IKA-Labortechnik, Staufen)
Speed Vac:	Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)
Sterilbank:	Hera Safe HS 12 (Kendro, Hanau)
Transformator:	Power PAC 200 und 300 (BIO-RAD, München)
Ultraschall-Desintegrator:	Sonifier II (Branson Ultrasonic Corp., Danbury, USA)
UV-Transilluminator:	TI 2 (Biometra, Göttingen)
Vortexer:	Vibrax VXR (IKA-Labortechnik, Staufen), MS1 Minishaker (IKA-Labortechnik, Staufen)
Wasserbad:	GFL 1086 (GFLmbH, Burgwedel)
Zellsortierer:	MoFlo [®] Cytomation, Inc. (Ft. Collins, CO, USA)
Tischzentrifugen:	Biofuge 15R (Kendro, Hanau), Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburg)
Untertischzentrifugen:	Varifuge 3.0 (Kendro, Hanau), Superspeed RC 2B (Sorvall, Langenselbold)

6 Methoden

6.1 Kultivierung von Zellen

6.1.1 Zellkulturen

6.1.1.1 Züchten menschlicher Zellen

HeLa-Zellen (ATCC Nummer CCL-2) wurden in 4,5 g/l Glukose enthaltendem DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) kultiviert, welches mit 10 % FCS (*fetal calf serum*) und 2 mM Glutamin ergänzt wurde. Beim Umgang mit Zellen wurde darauf geachtet nur sterile Lösungen und Geräte zu verwenden. Falls nicht gesondert erwähnt wurden allgemeine Standardtechniken für die Kultivierung von Zellen verwendet (Ausubel *et al.*, 1988-2000).

6.1.1.2 Trypsinieren von Zellen

Vor dem Trypsinieren wurde das Kulturmedium möglichst vollständig aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde gerade soviel gebrauchsfertige Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben, dass die Oberfläche der Kulturflasche vollständig benetzt war. Dieser Ansatz wurde bei 37 °C inkubiert, bis unter dem Mikroskop erkennbar war, dass die Zellen sich vom Untergrund lösen. Durch Zugabe von FCS haltigem Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert und die resultierende Zellsuspension wurde direkt weiterverwendet.

6.1.1.3 Einfrieren von Zellen

Für das Anlegen von Dauerkulturen wurden die Zellen aus einer Zellkulturflasche mit einer Konfluenz von etwa 90 % trypsiniert, bei 100 g und 5 min zentrifugiert und in einer eiskalten Mischung aus 90 % FCS und 10 % DMSO resuspendiert. Je 5×10^6 Zellen wurden durch eine 20 g Kanüle in ein Einfrierröhrchen gefüllt und in Einfrier-Containern langsam auf -80 °C herabgekühlt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

6.1.1.4 Zellzahlbestimmung

Zellen wurden trypsiniert und 20 µl der Zellsuspension wurden mit einer 0,36 %igen Trypan Blau Lösung vermischt. Nach 3 min Inkubation waren tote Zellen blau gefärbt während die lebenden Zellen farblos blieben. Letztere wurden in einer Neubauer Kammer gezählt.

6.1.1.5 Klonierung durch Endpunktverdünnung

Zur Herstellung unabhängiger Klone wurden aus Massenkulturen transduzierter HeLa-Zellen Endpunktverdünnungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden nach Abschluss der Puromycin-Selektion serielle Verdünnungen der transduzierten Zellen hergestellt und unterschiedliche Zellzahlen (0,3/1/3/10) pro Vertiefung in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausplattiert. Pro Zellzahl wurden eine Platte verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen wurde die Auswertung durch Auszählen des Zellwachstums vorgenommen und die etablierten Klone für weitere Experimente expandiert.

6.1.1.6 Herstellung transgener Viren für die Infektion von Zellen

Für die Infektion von Zellen des Menschen (HeLa) wurde die Verpackungszelllinien Phönix-gp verwendet (Pear *et al.*, 1993). Unter Benutzung dieser Verpackungszelllinie konnten amphotrophe, mit VSV-G Protein pseudotypisierte Viruspartikel hergestellt werden. Der Vorteil der transienten Virenexpression liegt in der einfachen und schnellen Handhabung, sowie der Herstellung von Überständen mit zumeist hohen Virustitern. Aufgrund der fusogenen Eigenschaft (Synzythienbildung) wirkt das VSV-G Protein zelltoxisch. Die Virusernte ist deswegen nur innerhalb von 3-4 Tage möglich, bevor die Zellen absterben.

Verpackungszellen wurden mit Expressionsplasmiden für VSV-G (M4; 3 µg) zusammen mit dem zu verpackenden retroviralen Plasmid (5 µg) über die Kalziumphosphat-Methode transformiert. Um den Titer zu erhöhen, wurde zusätzlich das gag-pol-Plasmid M57 (10 µg) eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden pro Vektorkonstrukt 5×10^6 Phönix-gp Zellen auf einer 9 cm Gewebekulturschale ausplattiert. Die Kalziumphosphat-Transfektion wurde mit dem *”Calcium Phosphate Transfection Kit”*, Fa. 5-3 prime (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Angaben des Herstellers am darauf folgenden Tag durchgeführt. Abweichend vom Protokoll wurde zur Steigerung der Effizienz direkt vor der Transfektion

Chloroquin in einer Endkonzentration von 25 μM zum Medium zugegeben. Ein Mediumwechsel fand 6-8 Stunden später statt, diesmal ohne Zusatz von Chloroquin, ehe nach 24 Stunden mit der Virusernte begonnen wurde. Im folgenden wurden zweimal täglich alle 12 Stunden Überstände gesammelt, steril filtriert (Millipore-Filter), auf Eis gekühlt und dann bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

6.1.1.7 Stabile Transduktion von Zellen

Diese Methode verwendet nicht replikationskompetente VSV-G Protein pseudotypisierte Viruspartikel für den Transfer retroviraler Vektoren in eine Zielzelle. Dort integriert die eingebrachte DNA nach der reversen Transkription als Provirus in das Genom der Zielzelle, womit eine stabile, transgene Zelllinie etabliert wird. Zunächst wurden 10^5 HeLa-Zellen pro Vertiefung einer 12-Lochplatte vorgelegt und 1,5 ml Virusüberstand zugegeben. Der Zusatz von Protaminsulfat (Endkonzentration: 4 $\mu\text{g/ml}$) führte zur Verbesserung der Transduktionseffizienz. Im Anschluss wurde bei 200 g für 90 min bei $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Nach Inkubation für 12 Stunden im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (unter 5 % CO_2 Begasung) wurde der Virusüberstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Weitere 24 h später wurde die Transduktionseffizienz bestimmt. Dies geschah unter dem Fluoreszenzmikroskop durch Zählen aller Zellen in einem Bildausschnitt. Dann wurden die grünen Zellen im selben Bildausschnitt gezählt, die nach Transduktion mit dem retroviralen Vektor den eGFP Selektionsmarker exprimieren. Die Transduktionseffizienz wurde wie folgt berechnet: Zahl der grünen Zellen geteilt durch Gesamtzahl der Zellen multipliziert mit 100 ergibt Transduktionseffizienz in Prozent.

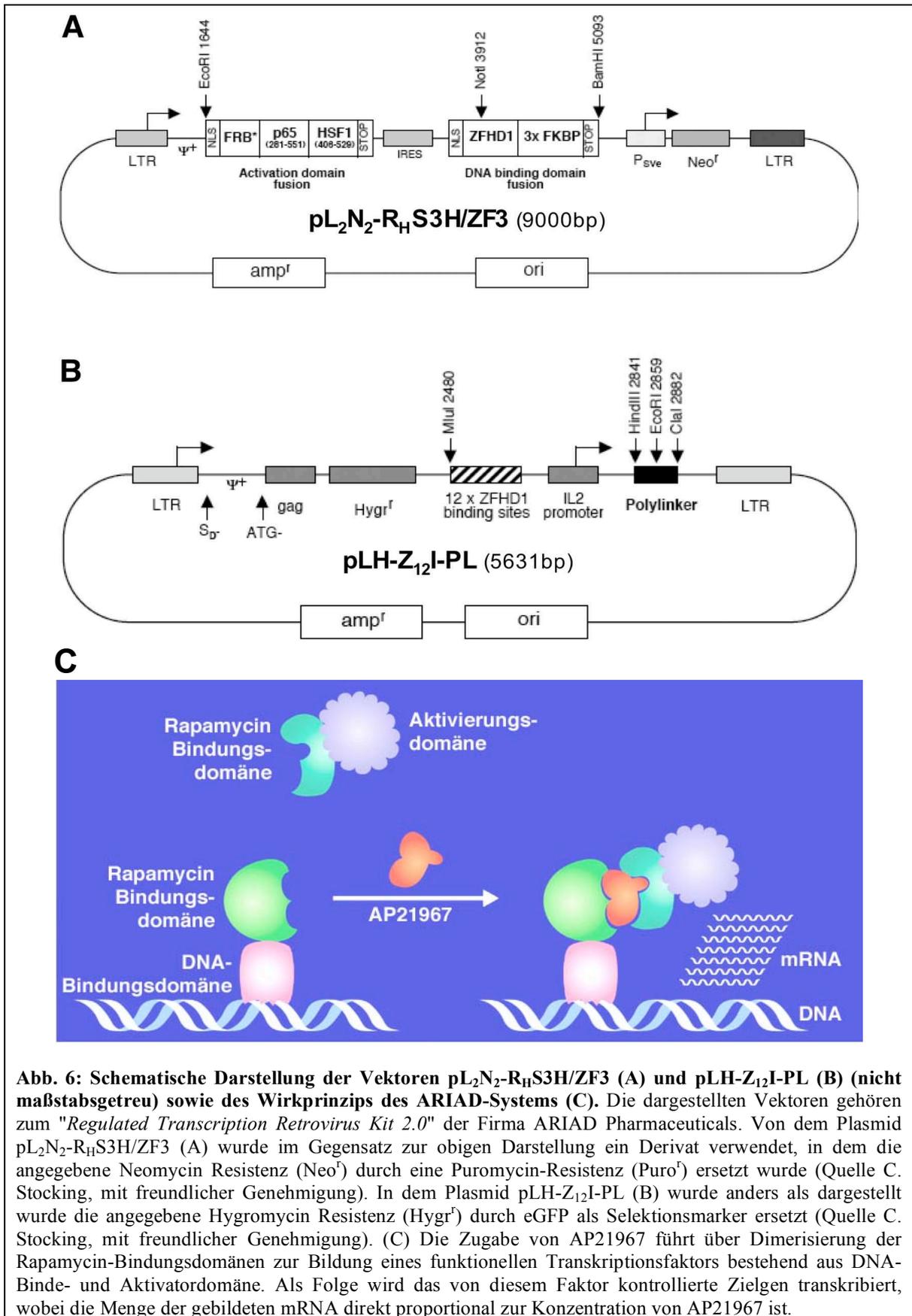
6.1.1.8 Etablieren einer Zelllinie für die Überexpression eines Proteins mittels des ARIAD-Systems

Für die Überexpression eines Transgens in Säugetierzellen wurde ein System der Firma ARIAD Pharmaceuticals benutzt. Das "*Regulated Transcription Retrovirus Kit 2.0*" dieser Firma ermöglicht eine Regulation der Überexpression des gewünschten Proteins in Abhängigkeit von der Konzentration des heterodimerisierenden Rapamycin Analogons AP21967. Das System besteht aus zwei Vektoren, die nach der Verpackung in Retroviren die Zielzelle infizieren können und in das Wirtsgenom integriert werden. Der Erste der beiden Vektoren (pL₂N₂-R_HS3H/ZF3) kodiert für eine DNA-Bindungsdomäne und eine DNA-Aktivierungsdomäne (Abb. 6A). Beide Proteine werden als Fusion mit einer

Rapamycin Bindungsdomäne exprimiert. Nach Zugabe des Rapamycin-Analogons AP21967 entsteht aus diesen beiden Proteinen ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor der spezifisch ZFHD1-Bindestellen erkennt und durch seine Bindung die Expression eines nachgeschalteten Gens initiiert (Abb. 6C). Diese ZFHD1 Zielsequenzen sind wiederum auf dem zweiten retroviralen Vektor (pLH-Z₁₂I-PL) des ARIAD Expressionssystems lokalisiert und das gewünschte Transgen wird direkt hinter diese Aktivatorsequenzen in den sog. Polylinker kloniert (Abb. 6B). Dass das ARIAD-System das gewünschte Transgen auf einem separaten Vektor in die Zielzelle bringt hat einen entscheidenden Vorteil. Ist eine Zelllinie mit dem ersten Vektor infiziert, lassen sich Einzelzellen isolieren und diese können nach klonaler Expansion auf stabile Expression getestet werden. Mit dem Klon, der die beste Expression eines Transgens ermöglicht, können in dieser Zelllinie durch einfache Infektion mit einem Virus, in den der zweite Vektor mit dem Transgen verpackt ist, viele Expressionsexperimente mit unterschiedlichen Proteinen durchgeführt werden ohne jedes Mal Einzelklone zu isolieren, zu expandieren und testen zu müssen. In der Literatur wurde mit AP21967 Konzentration zwischen 0,1 nM und 100 nM gute Ergebnisse bei der Überexpression von Proteinen erzielt (Pollock et al., 2000), wobei sich AP21967 bis zu einer Konzentrationen von etwa 1 µM als nicht toxisch erwies.

In der vorliegenden Arbeit wurde das ARIAD-System für die AP21967 induzierte Expression eines Transgens in HeLa-Zellen eingesetzt. Dazu wurde der Vektor R874 (mit freundlicher Genehmigung durch C. Stocking, Hamburg) in Phönix-gp Zellen in mit VSV-G Protein pseudotypisierte Viruspartikel verpackt (siehe 6.1.1.6) und HeLa-Zellen mit den daraus resultierenden Virusisolaten infiziert (siehe 6.1.1.7). R874 ist ein Derivat des oben beschriebenen Vektors pL₂N₂-R_HS3H/ZF3, wobei der Neomycin-Selektionsmarker (Neo^r) durch eine Puromycin-Resistenz (Puro^r) ersetzt wurde (Abb. 6A).

Vier Tage nach der Infektion der HeLa-Zellen wurde die Selektion mit 2 µg/ml Puromycin begonnen. Nach weiteren vier Tagen wurde die Puromycin-Selektion erfolgreich abgeschlossen und die Zellen in 96-Loch Platten für eine Endpunktverdünnung ausplattiert (siehe 6.1.1.5). Aus den resultierenden Einzelzellen wurden Klone etabliert, die anschließend auf Expression eines Transgens nach Zugabe von AP21967 getestet wurden.



6.1.1.9 Induktion der Proteinexpression in HeLa-Zellen durch AP21967

Eine stabile, für den R874 Provirus positive HeLa-Zelllinie (HeLa-R874) wurde etabliert (siehe 6.1.1.8). Diese HeLa-R874 Zellen wurden mit Virusisolaten transduziert, in welche ein Derivat des Vektors pLH-Z₁₂I-PL mit einem induzierbaren Zielprotein verpackt worden war (siehe 6.1.1.7). Nach 7 Tagen wurden die transduzierten Zellen auf zwei 25 cm² Zellkulturflaschen aufgeteilt um 24 h später die Expression des Zielproteins durch Zugabe von AP21967 zu induzieren. Alternativ wurden die Zellen auch weiter expandiert, um ausreichend Zellen für eine Anreicherung transduzierter Zellen mittels Zellsortierung heranzuziehen.

6.1.1.10 Fluoreszenz-Markierung von Zellen für die Durchflusszytometrie

Um die AP21967 abhängige Expression des Transgens detektieren zu können, wurden Antikörper zur Erkennung des Oberflächenmoleküls LNGFR eingesetzt.

Pro Ansatz wurden jeweils 5×10^5 der zu markierenden Zellen durch 30 min Inkubation in 5 mM EDTA in PBS suspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (200 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur) wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und der primäre Maus anti- Δ LNGFR Antikörper 1:100 verdünnt in einem Volumen von 200 μ l auf das Zellsediment pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 4 °C für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der sekundäre PE-gekoppelte Antikörper 1:200 verdünnt in einem Volumen von 20 μ l zugegeben und dieser Ansatz bei 4 °C für 30 min im Dunkeln. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS in einem Volumen von 0,5 ml PBS + 5 % FCS resuspendiert und sofort für die Durchflusszytometrie eingesetzt.

6.1.1.11 Durchflusszytometrische Analyse von fluoreszenzmarkierten Zellen

Beim durchflusszytometrischen Messverfahren macht man sich die Eigenschaft zunutze, dass verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften einzelner Zellen - wie relative Größe, Granularität sowie verschiedene Fluoreszenzintensitäten - simultan gemessen werden können. Dabei werden die Zellen als Suspension durch Überdruck in die Messküvette gepresst und dort hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom angeordnet, so dass sie einzeln vom Laserstrahl erfasst und physikalisch gemessen werden können. In dieser Arbeit fand das *FACSCalibur* (Becton-Dickinson, Heidelberg) Verwendung. Dieses

Gerät bietet die Möglichkeit, vitale Zellen in einer Probe zu identifizieren und gleichzeitig die Stärke der eGFP-Expression in diesen Zellen zu quantifizieren.

Für die Analyse eGFP exprimierender Zellen diese trypsiniert (siehe 6.1.1.2) mit 1x PBS-Puffer + 5 % FCS gewaschen und direkt im Durchflusszytometer analysiert. Als Negativ-Kontrolle diente eine parallel kultivierte, untransduzierte Kultur der betreffenden Zelllinie. Durch Vergleich mit dem Histogramm der Negativ-Kontrolle konnte der Anteil an eGFP-exprimierenden Zellen in einer Kultur ermittelt werden. LNGFR exprimierende Zellen wurden vor der Analyse mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper behandelt (siehe 6.1.1.10) um die Expression des Proteins im Durchflusszytometer detektieren zu können.

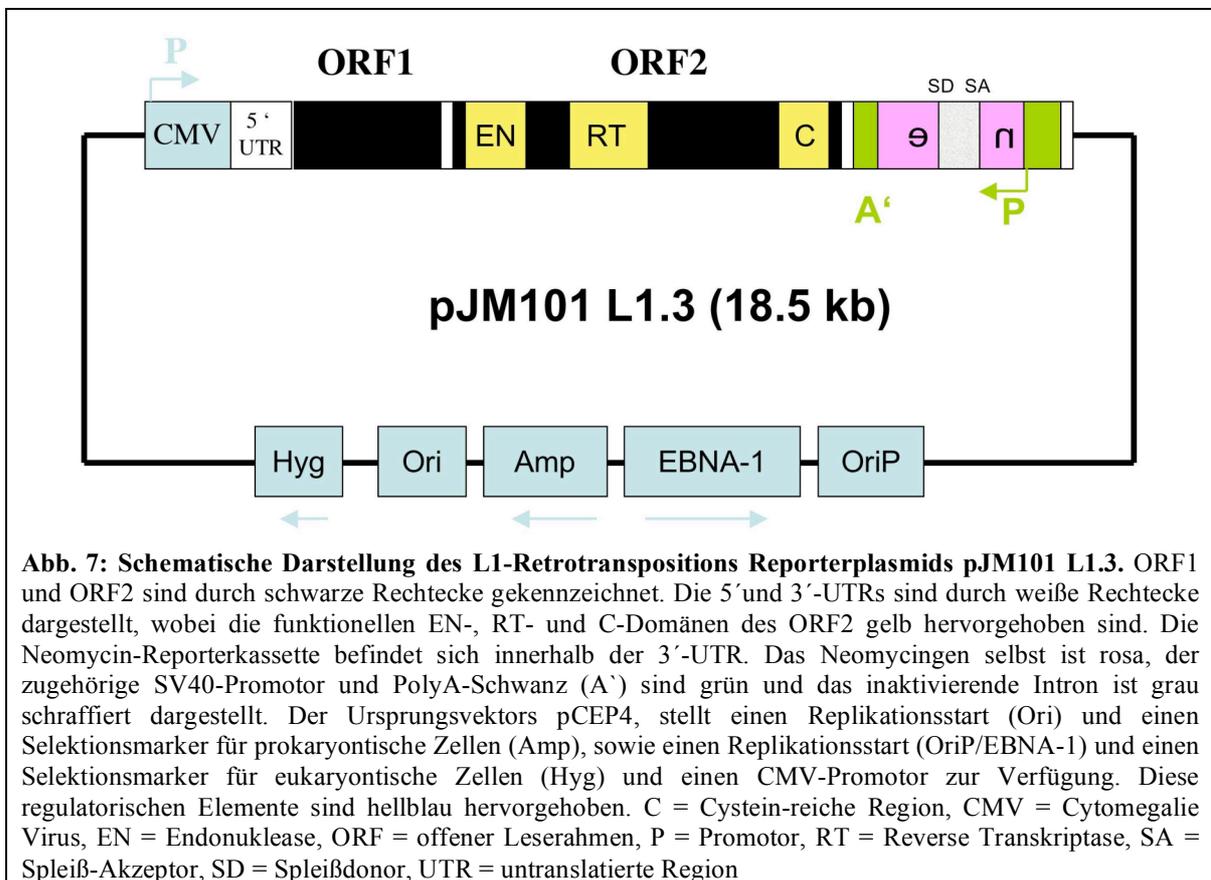
6.1.1.12 Sortieren von HeLa-Zellen

Etwa 10^7 transduzierte HeLa-Zellen wurden trypsiniert, in Sortierungsröhrchen gegeben und bei 100 g für fünf Minuten bei einer Temperatur von 37 °C sedimentiert. Das resultierende Pellet wurde PBS + 1 x Penicillin/Streptomycin aufgenommen (Zelldichte: 5×10^5 /ml). Zur Abtrennung von Zellklumpen wurden die Zellen dann in sterile Prä-Separationsfilter aus Nylon mit einem Durchlass von 30 µm (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) pipettiert und in einem sterilen Sortierungsröhrchen aufgefangen. Die Zellen wurden bis zum Sortieren auf Eis gelagert. Die Sortierung eGFP-exprimierender Zellen erfolgte mit einem Zellsortierer der Firma MoFlo[®]. Aus der Kultur wurden bis zu 2 - 3 x 10^6 Zellen in sterile Sortierungsröhrchen abgelegt. Nach einem Waschschrift mit 1 x PBS wurden die Zellen in Medium + 1 x Penicillin/Streptomycin resuspendiert und auf Kulturschalen eingesät.

6.1.1.13 Der LINE-1 Retrotranspositionstest

Zur Analyse und Auswertung individueller Retrotranspositionsereignisse in kultivierten Zellen wurde eine Plasmid-basierte Strategie verwendet, wie sie zuerst von Curcio und Garfinkel umgesetzt wurde um Ty1-Insertionen in der Hefe zu untersuchen (Curcio and Garfinkel, 1991). Dieser Retrotranspositions-Assay (RTP-Assay) hat sich bei der Studie zur Biologie des L1-Retrotransposons als sehr nützlich erwiesen (Moran et al., 1996). Ein retrotranspositions-kompetentes (rk) L1 wird mit einer Reporterkassette markiert, die eine antisense Kopie eines Antibiotika Resistenzgens (Neomycin) unterbrochen durch ein Intron in sense-Orientierung trägt (siehe Abb. 7). Transkription vom L1-Promotor aus, Spleißen des Introns, reverse Transkription der mRNA und Insertion der cDNA-Kopie des

L1-Elements in das Wirtsgenom ermöglicht die Expression des Reportergens und somit die Selektion und Isolierung von einzelnen Retrotranspositionseignissen. Vor der Retrotransposition sind alle Transkripte vom Promotor des Markergens nicht-funktionell, weil das eingefügte Intron wegen seiner falschen Orientierung nicht gespleißt werden kann. Mit dieser Strategie lassen sich frische L1-Insertionen verfolgen und charakterisieren, bevor sie, wie die Masse der L1-Elemente im Genom durch Mutation, Rekombination und Gen-Konversion verändert werden. Mit Hilfe des RTP-Assays konnte außerdem das Retrotranspositionspotential verschiedener L1-Kopien miteinander verglichen werden (Sassaman et al., 1997) und es wurde bereits gezeigt, dass eine erfolgreiche Retrotransposition auch von der Expression verschiedener Wirtsproteine beeinflusst wird (Morrish et al., 2002).



Es wurden 2×10^5 HeLa-Zellen in jeweils einem Loch handelsüblicher 6-Loch Platten in DMEM ausplattiert. Am folgendem Tag wurden die Zellen mit $2 \mu\text{g}$ des Vektors pJM101 L1.3 (Moran *et al.*, 1996) pro Loch, unter Verwendung von $6 \mu\text{l}$ Fugene-6 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) entsprechend der Herstelleranleitung, transfiziert. Nach 24 h wurde der Transfektionsansatz verworfen und durch frisches DMEM ersetzt. Weitere 2 Tage später wurde die G418-Selektion durch Kultivierung der Zellen mit DMEM

begonnen, welches mit 400 µg/ml G418 versetzt worden war. Nach durchschnittlich etwa 12 Tagen G418-Selektion wurden die G418 resistenten Kolonien, die jeweils ein unabhängiges Retrotranspositionsereignis repräsentieren mit 0,4 % Giemsa gefärbt und anschließend unter dem Lichtmikroskop gezählt. *E. coli*-Kulturen

6.1.1.14 Anlegen einer Übernachtskultur

Mit einer Impfföse werden aus Dauerkulturen (6.1.2.2) konservierte Bakterien oder Kolonien von einer Klonierungsplatte in LB-Medium mit einem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert.

6.1.1.15 Einfrieren von Bakterien

Eine frische Übernachtskultur (6.1.2.1) wird in einem Verhältnis von 1:1 mit autoklaviertem 86%igen Glycerin versetzt. Diese Bakteriensuspension kann als Dauerkultur anschließend bei -80 °C gelagert werden.

6.2 Präparation von Plasmid-DNA

6.2.1 Plasmid-Minipräparation

Zur Isolierung kleinerer Mengen an Plasmid-DNA für analytische Zwecke wurde die STET-Methode (Holmes and Quigley, 1981; Sambrook et al., 1989) verwendet. Der Aufschluss der Bakterien erfolgt bei dieser Methode durch Behandlung mit Lysozym und anschließendem Aufkochen in einem geeigneten Puffer. Durch die abschließende Fällung der Plasmid-DNA wird zwar ein Großteil an Verunreinigungen entfernt, jedoch ist die so gewonnene DNA "unsauber" und lässt sich nur für ein begrenztes Spektrum von nachfolgenden Applikationen verwenden.

2 ml einer Übernachtskultur rekombinanter *E. coli*-Bakterien wurde für 30 sec bei 16.000 g zentrifugiert und das resultierende Zellpellet in 300 µl STET-Puffer resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte nach Zugabe von 20 µl Lysozym (10 mg/ml), durch 5 min Inkubation bei RT und anschließendem 3 minütigen Erhitzen im Heizblock auf 100°C. Durch Zentrifugation für 15 min bei 16.000 g wurden Zelltrümmer und denaturierte Proteine pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß mit 300 µl 2-

Propanol als Vorlage überführt. Nach sorgfältigem Mischen des Ansatzes wurde die Plasmid-DNA durch 5 minütige Zentrifugation bei 16.000 g pelletiert und mit 500 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, um etwaige Verunreinigungen durch Salze zu entfernen. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und wovon etwa 5 µl für nachfolgende Restriktionsanalysen verwendet wurde.

<u>STET-Puffer:</u>	50mM	Tris-Cl (pH 8.0)
	50mM	EDTA
	8% (w/v)	Sucrose
	5% (v/v)	Triton X-100

6.2.2 Plasmid-Midi- und Maxipräparation

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurden Midi- (bis 100µg), Maxi- (bis 500µg) oder Giga-Präparationen (bis zu 10 mg Plasmid-DNA) mit den entsprechenden Qiagen-tip-100, tip-500 oder tip-10000 (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde gemäß den Angaben des Herstellers ein vorgeschriebenes Volumen einer Übernachtskultur rekombinanter *E. coli* Bakterien aufgeschlossen und die resultierende Plasmid-DNA nach der Aufreinigung in 10 mM Tris-Cl, pH 7.0, aufgenommen. Diese Plasmid-Aufreinigung basiert auf der Interaktion der DNA mit dem Anionen-Austauscher-Material der Qiagen-Säule. Die Plasmid-DNA bindet unter niedriger Salzkonzentration an das Anionen-Austauscher-Material der Säule und wird, nach mehreren Waschschritten, durch Erhöhung der Salzkonzentration wieder eluiert. Bei Verwendung der isolierten Plasmid-DNA für Transfektionen in eukaryontische Zelllinien sollte die DNA endotoxinfrei vorliegen, da sich diese bei der Transfektion als störend erwiesen haben. Hierfür wurde das „*Endofree Plasmid Buffer Set*“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

6.3 Reinigung von Plasmid-DNA

6.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion dient zur Abtrennung verunreinigender Proteine aus einer wässrigen DNA-Lösung und macht sich das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten von DNA und Proteinen zu nutze. Proteine sind generell

hydrophober als DNA und lösen sich daher besser in bestimmten organischen Lösungsmitteln als in Wasser.

Eine wässrige DNA-Lösung wurde für die Extraktion in einem Verhältnis von 1:1 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (siehe 6.21.3) versetzt und etwa eine Minute kräftig gevortext. Anschließend wurde für 2 min bei 16.000 g zentrifugiert und die obere, wässrige Phase, in der sich die DNA befindet, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. In der unteren organischen Phase befinden sich die Proteine, die durch diesen Schritt von der DNA getrennt wurden. Die gesamte Extraktion wurde noch einmal wiederholt und die gereinigte DNA anschließend gefällt.

6.3.2 Fällung von DNA

Diese Methode basiert auf dem Prinzip des "Aussalzen". Ein schwerlösliches Salz, in diesem Fall die DNA, wird durch Entzug der Hydrathülle durch das leichtlösliche Salz Natriumacetat aus der Lösung verdrängt und fällt aus. Der eigentliche Wasserentzug wird hierbei durch Ethylalkohol Zugabe erreicht.

Um die DNA zu fällen wurde die Probe mit 10 % (v/v) einer 3 M Natriumacetatlösung, pH 5,4, versetzt und gut geschüttelt. Es folgte die Zugabe von 2,5 Volumenteilen Ethanol abs. und erneutes Durchmischen der Probe. Die DNA wurde 20 min bei - 20 °C präzipitiert und anschließend bei 16.000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, um verunreinigende Salze zu entfernen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 16.000 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in der Speed Vac getrocknet. Die gefällte DNA wurde in einem entsprechenden Volumen Aqua bidest. aufgenommen.

6.4 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Nach (Sambrook et al., 1989) erfolgt die photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen durch Messung der Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei 260 nm einer DNA-Konzentration von etwa 50 µg/ml für Doppelstrang-DNA und 40 µg/ml für Einzelstrang-DNA oder RNA.

Aromatische Verbindungen, wie manche Aminosäuren oder Phenol, absorbieren Licht einer Wellenlänge von 280 nm. Der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} stellt eine relative

wurden die Zellen zur Expression eines plasmidkodierten Antibiotika-Resistenzgens eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator vermehrt. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C oder bei Raumtemperatur für mehrere Tage inkubiert. Von diesen Platten ließen sich Einzelkolonien mit einer Impföse für nachfolgende Experimente isolieren.

<u>SOC-Medium; sterilfiltriert:</u>	2 % (w/v)	Bacto-Trypton
	0,5 % (w/v)	Bacto-Yeast Extract
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	20 mM	Glucose

6.5.3 Selektion positiver Klone

Die Selektion erfolgreich transformierter Klone erfolgte durch Verwendung von Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten, auf welchen nur solche Bakterien wachsen können, die das plasmidkodierte Resistenzgen aufgenommen haben.

Bei einer Transformation von Bakterienstämmen, die eine Mutation im 5'-Bereich des lacZ-Gens aufweisen (lacZ Δ M15 Mutation, z.B. DH5 α) und daher keine aktiven Tetramere der β -Galaktosidase bilden, ermöglichen Vektoren wie der verwendete pcr2.1 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) eine direkte, visuelle Selektion (*blue white screening*) rekombinanter Bakterien.

Dies geschieht durch Komplementation mit dem plasmidkodierten lacZ α -Peptid (26 AS N-terminales lacZ-Fragment) und führt zur Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität. Eine aktive β -Galaktosidase setzt das Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff um. Wird bei einer erfolgreichen Klonierung der Leserahmen des α -Peptids im Plasmid-Polylinker durch Insertion unterbrochen, werden weiße Kolonien erzeugt. Dagegen bedeuten blaue Kolonien, dass das lacZ-Gen funktionsfähig geblieben ist und keine Fremd-DNA inseriert wurde.

6.6 Enzymatische Manipulation von DNA

6.6.1 Fragmentierung von Doppelstrang-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Häufig synthetisieren Bakterien Endodesoxyribonukleasen, welche die Funktion haben, eingedrungene Fremd-DNA abzubauen. Diese Restriktionsendonukleasen (Typ II) sind in der Lage, die Phosphodiester-Bindungen von doppelsträngigen DNA-Molekülen an spezifischen, meist palindromischen Sequenzen zu spalten.

Durch die Spaltung können, je nach Enzym, 5'- bzw. 3'- überhängende oder stumpfe DNA-Enden entstehen. Dabei ist immer das 3'-Hydroxylende frei, während das 5'-Ende die Phosphatgruppe trägt (Roberts, 1983).

In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, um definierte DNA-Fragmente für Klonierungsansätze herzustellen oder Plasmid-DNA anhand ihres spezifischen "Restriktionsmusters" zu identifizieren.

Die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Puffer und gegebenenfalls BSA-Zusatz) wurden nach den jeweiligen Angaben des Herstellers gewählt. Bei Verwendung von zwei unterschiedlichen Enzymen in einem Restriktionsansatz musste ein Puffer eingesetzt werden, der für beide Enzyme geeignet ist. In der Regel wurden 1-2 Units Enzym pro μg DNA eingesetzt, wobei eine Einheit (Unit, U) eines Enzyms definiert ist als die Menge, die 1 μg λ -DNA in einer Stunde bei der angegebenen Temperatur vollständig spaltet. Damit die Gesamtkonzentration an Glycerin in einem Reaktionsansatz 5% nicht überstieg, wurde maximal 10% des Gesamtvolumens an Enzym eingesetzt (üblicherweise werden Restriktionsenzyme in 50% Glycerin geliefert).

Die Inkubationsdauer ist von der eingesetzten DNA- und Enzymmenge abhängig. Für analytische Zwecke wurde ca. 1 μg DNA in einem Volumen von 10-20 μl mit 2-3 Units Enzym für 1-2 Stunden bei der empfohlenen Temperatur inkubiert. Bei präparativen Restriktionsansätzen wurden die verwendeten Enzymaktivitäten und das Volumen des jeweiligen Reaktionsansatzes entsprechend der größeren DNA-Menge angepasst.

Grundsätzlich wurde nach dem Restriktionsverdau für präparative Zwecke anschließend eine Hitzeinaktivierung der verwendeten Restriktionsenzyme durch 10 minütiges Erhitzen bei 65°C oder 80°C (entsprechend den Herstellerangaben) vorgenommen.

6.6.2 Auffüllen kohäsiver Enden mit dem Klenow-Fragment

Das Klenow-Fragment entsteht bei der proteolytischen Spaltung der DNA-Polymerase I und füllt an 5'-überhängenden DNA-Enden den Gegenstrang mit entsprechenden dNTPs auf, so dass glatte Enden entstehen.

1-5 µg linearisierte DNA wurden in 43 µl H₂O, 5 µl mitgeliefertem 10 x Klenow-Puffer und 1 µl dNTP-Mix (siehe 5.9) aufgenommen und mit 5 U Klenow-Enzym versetzt. Die Ansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert und für 10 min bei 75 °C inaktiviert.

6.6.3 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA

Das Enzym alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von endständigen Phosphatgruppen exklusiv am 5'-Ende von DNA- und RNA-Fragmenten. Durch diese Reaktion lässt sich die intramolekulare Religation linearisierter Vektor-DNA zugunsten der intermolekularer Ligation mit dem gewünschten Insert spezifisch unterdrücken (Ullrich et al., 1977).

Die Dephosphorylierung wurde meist direkt nach dem Restriktionsverdau der Vektor-DNA und anschließender Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym in demselben Reaktionsgefäß durchgeführt. Nach Zugabe von 11% 10-fach CIP-Puffer (bezogen auf das Reaktionsvolumen des vorangegangenen Restriktionsverdaus) und 1 U CIP pro µg DNA erfolgte die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen für 30 min bei 37°. Durch 10-minütiges Erhitzen bei 65 °C wurde die alkalische Phosphatase inaktiviert und die Reaktion beendet.

CIP: *Calf Intestinal Phosphatase*, 1 U/µl (NEB, Schwalbach)

CIP-Puffer: 10-fach vom Hersteller mitgeliefert (NEB, Schwalbach)

6.6.4 Ligation von DNA

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden unter Hydrolyse von ATP. DNA-Fragmente mit komplementären, überhängenden Enden werden dabei effizienter verknüpft als Fragmente mit nicht-überhängenden Enden.

Ligationen wurden in der Regel in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Menge an linearisiertem Vektor betrug 50-100 ng, wobei das zu klonierende Insert in

einem 3 fachen molaren Überschuss zugegeben wurde. Die eingesetzte Insertmenge wurde bei vorgegebener Vektormenge durch die folgende Formel berechnet:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} * \text{Insertgröße [Kb]}}{\text{Vektorgröße [Kb]}} * \text{molares Verhältnis} \quad \text{Insert/Vektor}$$

Der Ligationsansatz wurde mit 0,5 – 1 U Enzym versetzt und bei 16°C über Nacht oder 2h bei RT inkubiert.

Enzym: T4 Ligase (NEB, Schwalbach)

Puffer: 5-fach Puffer, vom Hersteller mitgeliefert (NEB, Schwalbach)

6.6.5 DNA-Sequenzierung

Die Analyse von DNA-Sequenzen erfolgte nach einem modifiziertem Verfahren der Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzierung wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 4 µl BigDye-Terminator und 10 pmol Primer gemischt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler mit folgendem Programm:

1.	96 °C	69 sec	Vorlauf
2.	96 °C	30 sec	Denaturierung
3.	50 °C	15 sec	Hybridisierung
4.	60 °C	240 sec	Polymerisation
	danach auf	4 °C	Pause

Die Schritte 2. bis 4. wurden in 25 Zyklen wiederholt durchlaufen. Die fluoreszenzmarkierten Amplifikate wurden durch eine Ethanol-fällung sedimentiert (siehe 6.3.2) und als getrocknetes Präzipitat dem Sequenzierservicelabor des „Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie“, UKE, Hamburg (Leiter Prof. Dr. D. Richter) zur Analyse übergeben.

6.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Ein Gemisch von DNA-Fragmenten kann mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt werden. In einem elektrischen Feld wandern DNA-Moleküle aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen zur positiven Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearer, doppelsträngiger DNA in einem Agarosegel ist bei konstanter Feldstärke umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes (Helling et al., 1974). Diese physikalische Eigenschaft wird bei der Auftrennung von unterschiedlich großen Fragmenten genutzt. Durch Vergleich mit einem Größenstandard, der DNA-Fragmente definierter Größe enthält, lässt sich das unbekannte Molekulargewicht von DNA-Fragmenten in einer Probe näherungsweise bestimmen.

Im Agarosegel lassen sich DNA-Fragmente durch den Intercalationsfarbstoff Ethidiumbromid detektieren. Intercalationsfarbstoffe sind planare aromatische Kationen, die auf Grund ihrer Struktur in der Lage sind, in Nukleinsäuren zu integrieren und über Konjugationseffekte mit den aromatischen Basen stabile Komplexe mit DNA und RNA zu bilden. Im Falle des Ethidiumbromids lassen sich diese Komplexe unter UV-Licht zur Fluoreszenz anregen, wodurch sich eine empfindliche Nachweismethode für Nukleinsäuren ergibt.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde präparativ zur Reinigung und Trennung, oder analytisch zur Identifizierung von zirkulärer Plasmid-DNA und von DNA-Fragmenten genutzt.

Die Konzentration des Gels wurde entsprechend der erwarteten Größe des DNA-Fragmentes gewählt. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit mehr als 1 kb wurde ein 0,8 % iges Agarosegel eingesetzt. Für Fragmente von 0,1 - 1 kb wurden 1 - 2 %ige Agarosegele verwendet. Zum Gießen der in dieser Arbeit ausschließlich verwendeten Agarose-Flachbettgele wurde die entsprechende Menge an Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle geschmolzen. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde 0,002 % (v/v) Ethidiumbromid-Lösung zugefügt und der Ansatz etwa 1 cm hoch in einen vorbereiteten Gelschlitten mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Das erstarrte Gel wurde in der Gelkammer mit TAE-Puffer überschichtet und der Probenkamm entfernt. Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurde die Probe mit 1/5 Volumenanteil 6 x DNA-Probenpuffer (*loading buffer*) vermischt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt je

Durch die Verwendung von degenerierten Primern, also Oligonukleotiden, die einige von der Matrize abweichende Nukleotide enthalten, lassen sich mutierte PCR-Produkte generieren, um neue Schnittstellen für Restriktionsenzyme einzuführen.

6.8.1 Präparative PCR

Sollen DNA-Fragmente generiert werden, die für nachfolgende Klonierungen benötigt werden, spricht man von einer präparativen PCR. Bei der Durchführung verwendet man eine DNA-Polymerase mit Korrekturlesefähigkeit, um das Auftreten von Mutationen so weit wie möglich zu minimieren. Folgender Ansatz hat sich im Rahmen dieser Arbeit als optimal für eine präparative PCR herausgestellt, wobei der Ansatz mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt wurde:

1 -100 ng	DNA
5 µl	10-fach Puffer (mit MgCl ₂)
2 µl	dNTP-Mix (je 25 mM)
1 µl	Primer 1 (10 µM)
1 µl	Primer 2 (10 µM)
1 µl	Pfu DNA Polymerase (1 U)

6.8.2 Analytische PCR

Im Gegensatz zur präparativen PCR wird die analytische PCR zur Überprüfung von Klonierungen und ähnlichem verwendet. Da es hierbei nur auf die Länge des resultierenden PCR-Fragments und nicht auf die Sequenz ankommt, ist eine günstigere Polymerase ohne Korrekturlesefähigkeit ausreichend. Ein analytischer PCR-Reaktionsansatz enthält folgende Lösungen und wird mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt:

1 -100 ng	DNA
10 µl	10-fach Puffer (mit MgCl ₂)
2 µl	dNTP-Mix (je 25 mM)
1 µl	Primer 1 (10 µM)
1 µl	Primer 2 (10 µM)
1 µl	Taq DNA Polymerase (5 U)

Die PCR-Reaktionen wurden in einem automatisierten, programmierbaren Thermoblock durchgeführt, wobei die einzelnen Parameter für jede PCR optimiert werden mussten.

<u>Polymerase:</u>	Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden)
<u>Puffer:</u>	10 x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden)
<u>Nukleotide:</u>	dNTP-Mix 25 mM (Qiagen, Hilden)

6.9 Klonierung von PCR-Amplifikaten

Für die schnelle Klonierung von PCR-Produkten wurde ein Teil des PCR-Ansatzes nach dem Ende der PCR-Reaktion direkt für die Klonierung mit dem TA Cloning® Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) entsprechend der Herstelleranleitung eingesetzt.

6.10 Methoden zur Manipulation von RNA

6.10.1 Präparation von Gesamt-RNA

Für die Präparation von Gesamt-RNA aus Hodengewebe wurde die GITC-Methode (Chomczynski and Sacchi, 1987) mit Guanidiniumisothiocyanat als RNase inaktivierendem Agens verwendet. Allen hierbei benutzten Puffern und Lösungen wurden außerdem zur Inaktivierung eventuell vorhandener RNAsen 0,1% (v/v) DEPC zugesetzt. Die Lösungen wurden daraufhin für mindestens 60 min unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert und überschüssiges DEPC für 60 min bei 121 °C inaktiviert. Nach der Präparation entsprechend den Angaben in der obigen Literatur wurde die resultierende Gesamt-RNA gefällt (siehe 6.3.2) und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

6.10.2 Reverse Transkription von RNA

Die Reverse Transkription von RNA dient im Wesentlichen zur Klonierung der cDNA ausgewählter Gene, Herstellung von cDNA-Bibliotheken oder zum Nachweis der Expression von Proteinen in bestimmten Geweben.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden) benutzt. Entsprechend der Herstelleranleitung wurden 0,5 µg Gesamt-RNA und 1 µM eines Oligo(dT)₁₅-Primers für eine 20 µl Standard-Reaktion für 60 min bei 37 °C und

abschließenden 10 min bei 42 °C eingesetzt. Die resultierende cDNA wurde direkt für die nachfolgenden Versuche eingesetzt.

6.11 Lyse von Zellen unter denaturierenden Bedingungen

Dies ist eine sehr schnelle und bequeme Methode zur Herstellung von Gesamtzell-Extrakten für den Nachweis von endogenen oder rekombinanten Proteinen mittels Immunblotanalyse. Besonders bei Proteinen die während anderer Aufreinigungsmethoden schnell proteolytisch degradiert werden ist diese Methode eine sinnvolle Alternative, da alle Proteasen sofort nach der Lyse der Zellen inaktiviert werden. Zu diesem Zweck wurden die kultivierten Zellen durch Trypsinieren oder ein anderes geeignetes Verfahren von den Kulturschalen gelöst und nach Bestimmung der Zellzahl für 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde einmal mit sterilem PBS gewaschen und in 100 µl Laemmli-Auftragspuffer (2 x) je 10^5 Zellen für 5 min bei 98°C inkubiert. Nach kurzem Vortexen lassen sich die Zellysate bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahren.

6.12 Expression von Proteinen in Bakterien

6.12.1 Induktion der Proteinexpression in *E. coli* mit IPTG

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete, modifizierte pGex-2T (Amersham, Freiburg) Expressionsplasmid beruht auf der differentiellen Regulation des Laktose Operons in Bakterien. Die Transkription eines Zielgens steht dabei unter der Kontrolle des *lac*-Repressorproteins (Produkt des plasmidkodierten *lacI^q* Gens), welches durch Bindung an den *lac*-Operator den P(tac)-Promotor blockiert. Durch Zugabe von IPTG verliert der *lac*-Repressor seine DNA-Bindungseigenschaften, womit dieser auch die Initiation der Transkription am P(tac)-Promotor nicht mehr unterdrückt.

Für die Überexpression wurde ein rekombinanter Bakterienstamm in DYT-Medium (100 µg/ml Ampicillin) bis zum Erreichen einer $OD_{595} = 0,8$ im Schüttler bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von IPTG-Stammlösung auf eine Endkonzentration von 0,3 mM induziert. Nach weiteren drei Stunden Schütteln bei 37°C wurden die Bakterien durch 10 minütige Zentrifugation bei 5.000 g und 4°C sedimentiert. Um eine optimale Proteinausbeute zu erzielen, wurden die oben angegebenen Parameter für die

Zusammensetzung des Kulturmediums, IPTG-Konzentration, Zelldichte zum Induktionszeitpunkt und Wachstumsdauer vor- und nach Induktion in Vorversuchen empirisch ermittelt.

IPTG-Stammlösung:

1M in H₂O, sterilfiltriert

6.12.2 Präparative Reinigung von Proteinen über Histidin-Cluster

Diese Technik macht sich eine spezielle Eigenschaft von Histidin-Clustern bestehend aus einer Abfolge von sechs Histidinresten zunutze. Zusammen mit Nickelionen (Ni²⁺) bilden diese Histidine nämlich ein sehr stabiles Chelat aus. Daher lassen sich mit Histidin-Clustern markierte Proteine relativ schnell und effektiv über Nickel-Agarose aus Zellextrakten isolieren (Janknecht *et al.*, 1991).

Nach der Induktion der Bakterien in 500 ml LB-Medium (siehe 6.12.1) wurde das resultierende Zellsediment in 50 ml Extraktionspuffer resuspendiert und anschließend mit dem Ultraschall-Desintegrator durch 8 x 30 sec Ultraschallpulse (Stufe 5) mit der großen Spitze aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch 20 min Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C sedimentiert und der resultierende Überstand wurde durch tropfenweise Zugabe von 2 ml 5M NaCl-Lösung auf eine Endkonzentration von 200 mM NaCl eingestellt. Nickel-NTA (*Nitrilotriacetic acid*) Agarose-Beads wurden durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer 1 präequilibriert und 3 ml der Nickel-NTA Agarose zu dem Proteinüberstand gegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C auf der Immunpräzipitationsanlage (IP-Anlage) auf Stufe I inkubiert. Die Nickel-NTA Agarose-Beads mit den gebundenen Proteinen wurde durch Zentrifugation bei 500 g sedimentiert und nacheinander für jeweils 20 min mit 5 ml der Waschpuffern 1 - 5 gewaschen. Dann wurden die Proteine zweimal durch Inkubation mit 5 ml Elutionspuffer für je 20 min von der Nickel-NTA Sepharose eluiert und beide Eluate vereinigt.

Extraktionspuffer:	10 mM	NaPO ₄ (pH 6,8)
	400 mM	NaCl
	0,1 %	Triton X-100
	1 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF
	1 Tablette	Complete Mini w/o EDTA je 50 ml

<u>Waschpuffer 1:</u>	PBS pH 7,7 + 10 % Glyzerin + 10 mM Imidazol
<u>Waschpuffer 2:</u>	PBS pH 7,7 + 10 % Glyzerin + 30 mM Imidazol
<u>Waschpuffer 3:</u>	PBS pH 7,7 + 10 % Glyzerin + 80 mM Imidazol
<u>Waschpuffer 4:</u>	PBS pH 7,7 + 10 % Glyzerin + 150 mM Imidazol
<u>Waschpuffer 5:</u>	PBS pH 7,7 + 10 % Glyzerin + 250 mM Imidazol

<u>Elutionspuffer:</u>	PBS	pH 7,7
	10 %	Glyzerin
	500 mM	Imidazol
	0,5 mM	EDTA
	1 M	NaCl

6.12.3 Affinitätschromatographische Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Diese Methode macht sich die hochaffine Bindung von Glutathion durch das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) zu nutze. Exprimiert man ein gewünschtes Protein als Fusion mit GST, lässt sich dieses über den GST-Anteil selektiv an einer Glutathionmatrix immobilisieren und durch geeignete Waschschriffe von anderen Proteinen und sonstigen Verunreinigungen separieren. Die meisten Systeme verwenden hierfür Fusionsproteine mit einem N-terminalen GST-Anteil, wie z.B. pGEX-2T 2T (Amersham, Freiburg).

Um die Bakterien nach der Induktion und Expression des gewünschten GST-Fusionsproteins zu lysieren, wurde das Bakterienpellet (siehe 6.12.1) über Nacht bei -20°C eingefroren. Nach dem langsamen Auftauen des Ansatzes auf Eis wurden die Bakterien im selben Volumen GST-Puffer suspendiert und anschließend mit dem Ultraschall-Desintegrator durch 5 x 60 sec Ultraschallpulse (Stufe 5) mit der großen Spitze aufgeschlossen (auf Eis). Die Trennung von festen und löslichen Zellbestandteilen wurde durch Zentrifugation bei 20.000 g und 4°C erzielt. Die gesuchten Proteine sollten sich zum überwiegenden Teil im Überstand befinden. Für die Affinitätschromatographie wurde Glutathion Sepharose 4B (Amersham, Freiburg) entsprechend den Anweisungen des Herstellers mehrmals mit PBS gewaschen, um den Stabilisator Laktose zu entfernen. Das Bakterienlysat wurde mit 1/1000 des ursprünglichen Kulturvolumens an Glutathion-Sepharose (v/v) versetzt und 30 min auf der IP-Anlage auf Stufe I inkubiert, um eine Bindung der GST-Fusionsproteine an die Affinitätsmatrix zu erreichen. Nach dreimaligem

Waschen der Glutathion-Sepharose mit dem fünffachen Volumen GST-Puffer wurden die gebundenen Proteine entweder mit 10 mM Glutathionlösung (10 min bei RT) eluiert oder direkt weiterverwendet. Alle Zentrifugationsschritte mit Glutathion Sepharose 4B wurden entsprechend den Herstellerangaben bei 500 g für 1 min und bei 4°C durchgeführt.

<u>GST-Puffer (pH 7,6):</u>	16 mM	Na ₂ HPO ₄
	4 mM	NaH ₂ PO ₄
	150 mM	NaCl
	0,1%	Triton X-100
	1 Tablette je 10 ml	Complete mini

6.12.4 GST-Fällung von Proteinen

Diese Methode wurde für die affinitätschromatographische Konzentration von Protein-Protein Interaktionspartnern verwendet. Dabei wird ein Interaktionspartner als GST-Fusionsprotein exprimiert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Der andere Interaktionspartner wird in Hefezellen überexprimiert und nach der Lyse der Zellen als lösliches Protein mit der Sepharose-Matrix inkubiert. Hierbei binden die Proteine aneinander und der lösliche Interaktionspartner aus den Hefezellen lässt sich mit der Sepharose-Matrix fällen.

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt um die Degradation der Proteine zu minimieren. Jeweils 50 µl Glutathion-Sepharose mit den daran gebundenen aufgereinigten Proteinen (aus 6.12.3) wurden 5 min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Überstände aus einem nativen Hefeaufschluss (siehe 6.22.1) zugegeben. Diese Ansätze wurden über Nacht in der IP-Anlage auf Stufe I inkubiert, dann für 5 min bei 500 g zentrifugiert und die resultierenden Überstände verworfen. Die Sepharose-Matrix mit den gebundenen Proteinen wurde dreimal mit dem zehnfachen Volumen TTBS gewaschen and anschließend in 50 µl Probenpuffer für die weitere Analyse aufgenommen.

Probenpuffer: Rotiload, denat. (4 x) Roth, Karlsruhe

6.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zur Trennung von Proteingemischen verwendet und basiert auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt im Wesentlichen von Gesamtladung, Teilchengröße und Porengröße des Gels ab. Durch den Zusatz von SDS werden alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen der nativen Proteine eliminiert und es entsteht ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein, dessen stark negative Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins wird dadurch kompensiert und die Proteine wandern in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Proteine werden somit über ein konstantes Ladungs-/Masse-Verhältnis vergleichbar. Vervollständigt wird die Denaturierung der Proteine durch β -Mercaptoethanol im Probenpuffer, welches die inter- und intramolekularen Disulfidbrückenbindungen reduziert. Die SDS-PAGE wurde als diskontinuierliche Gelelektrophorese mit separatem Trenn- und Sammelgel durchgeführt. Diese unterscheiden sich voneinander in Puffer- und Salzkonzentrationen und erlauben dadurch eine Fokussierung der Proteinbanden (Laemmli, 1970).

Das SDS-Gel wurde als vertikales Plattengel (Minigel, Bio-Rad) mit 12 %igen Trenngel und 4 %igen Sammelgel gegossen. Der Kamm für die Probenauftragtaschen wurde in das frisch gegossene Sammelgel gesteckt und die Gele jeweils eine Stunde zur Polymerisation bei RT inkubiert. Die fertigen Gele wurden in die zugehörigen Gelapparaturen (Mini-PROTEAN 3 Cell, Biorad) eingespannt, mit Puffer SDS-Laufpuffer überschichtet und die Proteine nach dem Probenauftrag für 60-120 min bei 25 mA aufgetrennt.

<u>Probenpuffer:</u>	Rotiload, denat. (4 x)	Roth, Karlsruhe
<u>Acrylamid-Lösung:</u>	30 % Acrylamid/Bis (37,5:1)	Bio-Rad, Hercules
<u>APS:</u>	10 % (w/v)	Ammonium Persulfat (Sigma)
<u>TEMED:</u>	Tetramethylethylendiamin	SERVA
<u>SDS-Laufpuffer:</u>	25 mM	Tris
	200 mM	Glycin

0,1 % (w/v) SDS

Trenngelpuffer (4 x): 1,5 M Tris-Cl (pH 8,8)
0,4 % (w/v) SDS

Sammelgelpuffer (4 x): 0,5 M Tris-Cl (pH 6,8)
0,4 % (w/v) SDS

Ansetzen des PAA-Gels:

	12 % Trenngel	4 % Sammelgel
30% Acrylamid	2ml	0,267 ml
4 x Trenngelpuffer	1,25 ml	-
4 x Sammelgelpuffer	-	0,5 ml
Aqua dest.	1,75 ml	1,22 ml
APS	25 µl	10 µl
TEMED	5 µl	2 µl

6.13.1 Aufkonzentrieren von L1-ORF1p durch Elektroelution

Für die Immunisierung von Kaninchen mit L1-ORF1 wurde sehr reines und vor allem konzentriertes Protein benötigt. Daher wurden die 10 ml Eluat aus 6.12.2 über insgesamt 6 SDS-Gele aufgetrennt und die Banden mit dem L1-ORF1 herausgeschnitten. Entsprechend der Herstelleranleitung unter www.ssbioscience.com wurde das Protein aus den Gelfragmenten mit dem ELUTRAP System in einer großen Gelkammer in Elektroelutionspuffer bei 200 V für 3 h eluiert. Insgesamt wurden 6 Elektroelutionen durchgeführt, die resultierenden Eluate (jeweils ca. 1 ml) wurden lyophilisiert und in 600 µl PBS resuspendiert.

Elektroelutionspuffer: 15 mM Na_2HCO_3
0,025 % SDS

6.14 Methoden zur Färbung von Proteinen

6.14.1 Färben von Nitrozellulose-Membranen mit Ponceau-Rot

Die Färbung von Proteinen mit Ponceau-Rot ist eine reversible Methode zur Detektion von Proteinen und wurde für die Kontrolle des Transfers auf Nitrozellulose-Membranen verwendet. Dazu wurde die Membran 5 min in der Ponceau-Lösung gefärbt und

anschließend so lange mit destilliertem Wasser entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

Ponceau-Lösung: 0,1 % (w/v) Ponceau S (Sigma)
 1 % (v/v) Essigsäure

6.14.2 Färben von Proteingelen mit Coomassie-Blau

Nach der Gelelektrophorese wurden die Glasplatten vorsichtig abgelöst und das Sammelgel entfernt. Die Färbung der im Gel aufgetrennten Proteine wurde durch 30 - 60 minütige Inkubation in der Färbelösung erreicht, wodurch sie auch gleichzeitig fixiert wurden. Die Entfärbung wurde für eine Stunde in Entfärberlösung I und einen Tag in Entfärberlösung II durchgeführt, wobei die Entfärbelösung mehrmals erneuert wurde. Zur längeren Aufbewahrung der Gele wurden diese zwischen Zellophanpapier in einem GelAir Dryer (Bio-Rad) getrocknet. Die Detektionsgrenze von Proteinen liegt für die Coomassie-Blau-Färbung bei etwa 100 ng. Geringere Proteinmengen wurden durch Silberfärbung nachgewiesen.

Coomassie-Färbelösung: 0,5 % (w/v) Coomassie-Blue-R-250
 50 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Eisessig

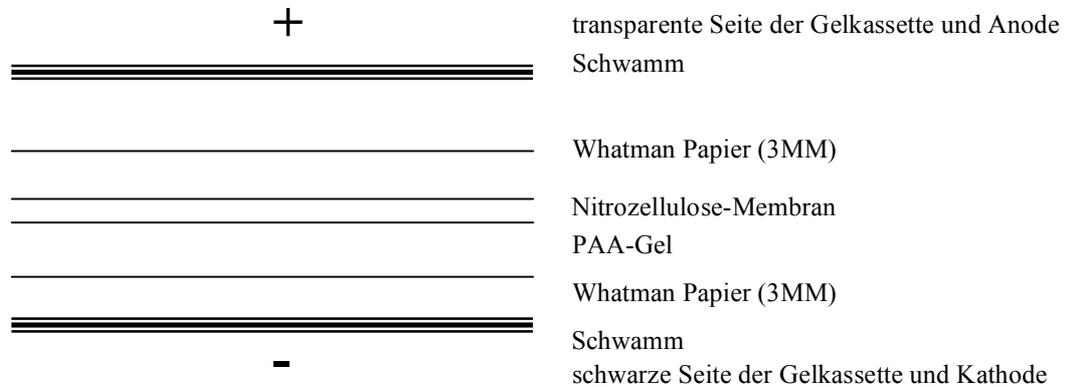
Entfärber I: 50 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Eisessig

Entfärber II: 30 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Eisessig

6.14.3 Silberfärbung von Proteingelen

Diese spezielle Methode zur Silberfärbung von Proteingelen wurde für die spezifischen Anforderungen der anschließenden MALDI-ToF Analyse von Proteinen entwickelt und optimiert (Shevchenko *et al.*, 1996; Switzer *et al.*, 1979). Von entscheidender Bedeutung für das Gelingen der nachfolgenden Massenspektrometrie ist, dass die Proteine nicht zu

äquilierten Komponenten nach untenstehendem Schema müssen alle Luftblasen sorgfältig entfernt werden. Der Transfer wurde über 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA durchgeführt.



Die Qualität der Proteintrennung und die Quantität des Proteintransfers lässt sich nach dem Transfer über die reversible Färbung der Nitrozellulose-Membran mit Ponceau-Rot überprüfen (siehe 6.14.1).

Transfer-Puffer:

130 mM	Glycin
30 mM	Tris
20 % (v/v)	Methanol

6.15.2 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Diese Methode macht sich die hochaffine Bindung von Antikörpern an ihr entsprechendes Antigen zunutze. Nach dem Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran (siehe 6.15.1) wird ein markierter primärer Antikörper zugegeben. Dieser bindet an das nachzuweisende Protein und ermöglicht die Detektion dieses Proteins in Abhängigkeit von der Art der Antikörpermarkierung. Inzwischen machen neuere Systeme die Markierung jedes einzelnen primären Antikörpers durch die Verwendung von sekundären Antikörpern überflüssig. Durch Applikation eines sekundären Antikörpers, der Immunglobuline aus der Herkunftsspezies des primären Antikörpers bindet, werden sowohl Kosten und Aufwand erheblich reduziert als auch eine deutliche Signalverstärkung ermöglicht. Somit ist nur noch ein einziger markierter sekundärer Antikörper für alle Nachweisreaktionen mit primären Antikörpern aus einer Spezies erforderlich. Für den Nachweis von "geblotteten" Proteinen wurden ausschließlich HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet.

Es gibt eine große Zahl an Methoden für die Immunfluoreszenz, wobei der wesentliche Unterschied meist in der Stringenz der Extraktion der Zellen liegt. Für den Nachweis von Oberflächenproteinen müssen die Zellen nur fixiert werden. Für die Detektion von zytoplasmatischen oder gar nukleären Proteinen muss jedoch das Innere der Zellen für die Antikörper zugänglich gemacht werden. Dies geschieht durch Extraktion mit Agenzien, die sowohl die Membranen der Zelle permeabilisieren, als auch Teile des Zellplasmas extrahieren. Im extremsten Fall bleibt dabei nur das Gerüst des Zytoskeletts mit daran haftenden Proteinen zurück, wohingegen alle löslichen Fraktionen der Zelle vollständig entfernt werden.

6.16.1 Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis zytoplasmatischer Proteine

Dieses Protokoll verwendet geringe Konzentrationen Saponin als Detergenz, wodurch die Zellen sehr schonend extrahiert werden und der überwiegende Teil der zytoplasmatischen Proteine erhalten bleibt.

Am Tag vor der Färbung wurden die Zellen in 12-Loch Platten auf runden Deckgläschen ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette vorsichtig in ein Bad mit eiskaltem PBS überführt und darin 5 min inkubiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Fixiert wurden die Zellen für 30 min bei RT in PFA-Lösung. Nach fünfmaligem Waschen für 5 min in eiskaltem PBS wurden die Zellen für 5 min mit PGS permeabilisiert. Zum Absättigen von freien Bindungsstellen wurden die Deckgläser für 20 min bei RT in Block-Lösung inkubiert. Für die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde dieser ebenfalls in Block-Lösung verdünnt und für 1 h bei 37°C auf den Deckgläschen belassen. Es folgten drei Waschschrte mit PGS bevor die Zellen mit dem, in Block-Lösung verdünntem, sekundären Antikörper für 1 h bei 37°C inkubiert wurden. Nach viermaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurde die DNA im Zellkern für 3 min mit DAPI (3 µl in 100 ml PBS) gegengefärbt. Abschließend wurden die Deckgläschen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen, auf Objektträgern mit VectaShield eingebettet und mit klarem Nagellack versiegelt. Die versiegelten Präparate lassen sich bis zu 3 Monate bei 4°C aufbewahren.

PFA-Lösung:

4 % (v/v) Paraformaldehyd
in PBS

<u>CSK I-Puffer:</u>	0,5 % (v/v)	Triton X-100
	10 mM	PIPES (pH 6,8)
	100 mM	KCl
	300 mM	Sucrose
	1 mM	EGTA
	3 mM	MgCl ₂
	1 Tablette je 10 ml	Complete mini

CSK VI-Puffer: CSK I-Puffer ohne Triton X-100 und Protease-Inhibitoren

6.17 Immunhistochemie

6.17.1 Entnahme und Einbetten von Gewebeproben

Die Orchiektomie von Hodengewebe wurde im Rahmen einer Kooperation mit PD Dr. Süleyman Ergün vom Institut für Anatomie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) an Patienten im Alter von 40 bis 70 Jahren aufgrund von Prostatakrebs durchgeführt. Von den entnommenen Proben wurden, nach Fixierung, entweder in Bouin's-Lösung oder in 4 % (w/v) Paraformaldehyd für 12 - 24 Stunden, und dem Einbetten in Paraffin, Serienschnitte von 5 -7 µm Dicke angefertigt (Kilic, 2001).

In Paraffin eingebettete, fötale Gewebeproben wurden freundlicherweise von der Abteilung für Pathologie und Gynäkopathologie des UKE zur Verfügung gestellt.

Die Forschung an adultem und fötalem Gewebe wurde von der Ethik-Kommission des UKE genehmigt.

<u>Bouin'sche-Lösung:</u>	4,5 % (v/v)	Essigsäure
	9,5 % (v/v)	Formaldehyd
	0,9 % (w/v)	Pikrinsäure

6.17.2 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Süleyman Ergün am Institut für Anatomie des UKE durchgeführt. Für eine optimale Signalstärke wurde die Reaktion durch die Verwendung von Avidin-Biotin

Komplexen und Peroxidase gekoppelten anti-Peroxidase Antikörpern maximal verstärkt (Kilic, 2001).

Das Parafin wurde aus den Gewebeschnitten (siehe 6.17.1) durch eine zweimalige Inkubation in Histo-Clear für jeweils 5 min entfernt. Die Rehydrierung der Schnitte erfolgte in einer absteigende Ethanolreihe (100 % (v/v) EtOH, 96 % (v/v) EtOH, 80 % (v/v) EtOH, 70 % (v/v) EtOH, H₂O für je 5 min) mit einem abschließenden Waschschrift für 5 min in PBS. Zum Blockieren von freien Proteinbindungsstellen wurde 30 min in PBS + 2 % (v/v) Normalserum (der Spezies, aus welcher der sekundäre AK stammte) inkubiert. Der primäre AK wurde in Verdünnungs-Puffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf die Präparate gegeben. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 10 min wurde der sekundäre biotinierte Antikörper für 1 h auf die Schnitte gegeben. Es folgten Inkubationen mit Peroxidase gekoppeltem anti-Peroxidase AK (aus der Spezies, aus welcher der primäre AK stammte) und ABC-Komplex für jeweils 30 min mit je 2 vorangehenden Waschschriften für 10 min in PBS. Die Schnitte wurden erst mit PBS, dann mit PB für je 10 min gewaschen und nach Zugabe des Peroxidase-Entwicklers + 0,0004 % Glukose Oxidase erfolgte die Färbung der Schnitte. Unter dem Mikroskop wurde die Färbung verfolgt und zum gewünschten Zeitpunkt durch dreimaliges Spülen für 5 min mit PBS gestoppt. Durch eine aufsteigende Ethanolreihe (siehe oben, umgekehrte Reihenfolge) wurden die Präparate dehydriert und dann mit DePeX eingebettet.

Verdünnungs-Puffer:

0,2 % (w/v) BSA
0,1 % (w/v) NaN₃
in PBS

ABC-Komplex (immer frisch):

0,25 % (w/v) Avidin
0,25 % (w/v) Biotin gekoppelte Peroxidase
in PBS

Peroxidase-Entwickler:

1,2 µM DAB
6,7 µM NH₄Cl
1 mM NiSO₄
0,2 % (w/v) Glukose
in PBS

6.18 Immunzytochemie

Dies ist eine immunologische Methode zur direkten Färbung von Zellen. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenzfärbung lässt sich mit dieser Methode nur ein Protein pro Färbung nachweisen. Ein Vorteil ist allerdings die fast unbegrenzte Haltbarkeit der angefertigten Präparate und die Unabhängigkeit von aufwendiger Technik.

Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Färbung auf Gelatine-beschichteten Deckgläschen ausplattiert und wie unter 5.17.2 gefärbt. In Abänderung der Anleitung (5.17.2) wurden die Schritte bis zum Blockieren in PBS + 2 % Normalserum, durch die Fixierung der Zellen für 20 min in PFA-Lösung mit anschließendem dreimaligen Waschen in PBS, ersetzt.

6.19 Isolierung und Reinigung von Immunglobulinen

6.19.1 Isolierung und Aufreinigung von Immunglobulinen aus Hühnereigelb

Das größte Problem bei der Präparation von Immunglobulinen aus Hühnereiern sind Lipide, die in hohen Konzentration im Eidotter vorliegen. Die besten Ergebnisse für die Trennung der Plasmaproteine von den Granulas und Lipiden lassen sich mit der Wasserverdünnungs-Methode erzielen (Akita and Nakai, 1993). Um eine optimale Ausbeute in Verbindung mit minimalem Aufwand zu erzielen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine modifizierte Wasserverdünnungs-Methode mit anschließender, sequentieller Fällung der Immunglobuline durch PEG (Polson *et al.*, 1985; Polson *et al.*, 1980) verwendet.

Sämtliche Schritte der nachfolgenden Gesamt-IgY-Präparation wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Eidotter wurden vorsichtig vom Eiweiß getrennt, mit Aqua dest. gespült, um soviel Albumin wie möglich abzuwaschen, und anschließend auf Papier-Handtüchern gerollt, um daran haftendes Eiweiß zu entfernen. Die Membran wurde mit einer Kanüle punktiert und das Dotter ohne Membran in einem Messzylinder aufgenommen. Je 100 ml Eigelb wurden mit 900 ml H₂O (pH 5,2) verdünnt und 6 Stunden auf einem Rührer inkubiert. Die wässrige Phase mit den Plasmaproteinen wurde durch Zentrifugation bei 10.000 g für 1 h von den Lipiden getrennt und sofort zweimal durch einen Faltenfilter gegeben. Der Durchlauf wurde mit 120 g PEG 6000 versetzt und über Nacht gerührt. Der gesamte Ansatz wurde für 10 min bei 14.000 g zentrifugiert und das resultierende Pellet in 100 ml Phosphat-Puffer resuspendiert. In diesem Ansatz wurden 12

g PEG 6000 unter Rühren gelöst und alles wie zuvor zentrifugiert. Das resultierende Pellet enthielt IgY mit mehr als 95 % Reinheit. Es wurde in 10 ml sterilem SP-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Phosphat-Puffer (pH 7,6):

13 ml	0,1 M NaH ₂ PO ₄
87 ml	0,1 M Na ₂ HPO ₄
ad 1 l	H ₂ O

6.19.2 Kopplung von Peptiden/Proteinen an CnBr-aktivierte Sepharose

Um Antikörper affinitätschromatographisch aufzureinigen zu können, muss zunächst das spezifische Antigen immobilisiert werden um eine Affinitätsmatrix herzustellen. Im vorliegenden Falle war das Antigen ein Peptid, weshalb sich CnBr-aktivierte Sepharose (Amersham, Freiburg) als Ausgangsmaterial für die Affinitätsmatrix anbot. CnBr-aktivierte Sepharose bildet bei pH 8-9 kovalente Bindungen zu freien Aminogruppen des zu koppelnden Peptids aus. Im umgekehrten Fall sollte das spezifische Antigen aus der Gesamtproteinfraktion von Zellen isoliert werden. Zu diesem Zweck wurde der Antikörper kovalent an die CnBr-aktivierte Sepharose gekoppelt um die benötigte Affinitätsmatrix herzustellen.

Entsprechend der Herstelleranleitung wurden alle Zentrifugationsschritte bei 600 g durchgeführt. 0,5 g Sepharose wurden abgewogen und in 5 ml 1 mM HCl ca. 15 min zum Quellen inkubiert. Um das Konservierungsmittel vollständig zu entfernen wurde die Sepharose dreimal mit je 25 ml 1 mM HCl und abschließend einmal mit 5 ml Kopplungspuffer gewaschen. 2,5 mg Peptid wurde in Kopplungspuffer gelöst und zur CnBr-aktivierten Sepharose gegeben. Die Kopplung erfolgte über Nacht bei 4 °C auf der IP-Anlage (kleinste Stufe). Zweimal wurde der Ansatz mit je 10 ml Kopplungspuffer gewaschen und zur Absättigung der freien Bindungsstellen für 2 h bei RT in 10 ml 0,1 M Tris-Cl (pH 8,0) inkubiert. Abschließend wurde die Matrix dreimal abwechselnd mit je 12 ml Acetat-Waschpuffer und Tris-Waschpuffer gewaschen, bevor sie in 10 ml SP-Puffer aufgenommen wurde.

Für die Kopplung von Antikörpern an CnBr-aktivierte Sepharose wurden 100 µl der präequilibrierten Sepharose (siehe oben) mit 2 ml der affinitätschromatographisch aufgereinigten Antikörper (aus 6.19.3) in 5,9 ml SP-Puffer, wie zuvor beschrieben, gekoppelt.

Die Affinitätsmatrix wurde mit 50 ml 10 mM Tris-Cl (pH 7,5) gewaschen und konnte nach Zugabe von 0,1 % (w/v) NaN₃ bis zu 6 Monate lang wieder verwendet werden.

6.20 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antigenen

Nach Kopplung von Antikörpern an ein Trägermaterial lässt sich die so hergestellte Affinitätsmatrix dazu verwenden, geringe Mengen von Antigen aus einem Proteingemisch anzureichern und zu isolieren.

Alle Zentrifugationen wurden entsprechend der Herstelleranleitung bei 600 g durchgeführt (Amersham, Freiburg). Die Immunaффinitätsmatrix mit den kovalent gebundenen Antikörpern wurde über Nacht mit 0,5 ml Zellysat in 5, 4 ml SP-Puffer bei 4°C in der IP-Anlage auf kleinster Stufe vorsichtig geschwenkt, um die Bindung der Antigene zu ermöglichen. Nach jeweils 1 minütiger Zentrifugation wurde die Matrix je dreimal mit 1 ml folgender Puffer in der angegebenen Reihenfolge gewaschen: TBS + 0,5 % Tween 20, TBS + 0,5 % Tween 20 + 350 mM NaCl, TBS + 3 % Tween 20 + 350 mM NaCl und PBS. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Ansatz bei 4°C in PBS aufbewahrt.

6.21 Methoden zur Hefegenetik

6.21.1 Anlegen einer Übernachtskultur

Mit einer Impföse wurden aus Dauerkulturen (6.21.2) konservierte Hefezellen oder Hefekolonien von einer Klonierungsplatte in SD-Medium oder YPD überführt und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator herangezogen.

6.21.2 Einfrieren von Hefezellen

Eine frische Übernachtskultur (6.21.1) wurde im Verhältnis 1:1 mit autoklaviertem 86%igen Glycerin versetzt. Diese Hefesuspension kann als Dauerkultur anschließend bei -80 °C gelagert werden.

6.21.3 Analytische Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

Zellen aus 3 ml einer frischen Übernachtskultur (6.21.1) wurden durch 30 sec Zentrifugation bei 10.000 g geerntet. Das Zellpellet wurde in 300 µl "Lyse-Puffer"

resuspendiert und mit jeweils dem gleichen Volumen an säuregewaschenen Glasperlen und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Die Proben wurden 5 min mit maximaler Stärke auf einem Vortexer durchmischt. Zur Trennung der Phasen wurden die Ansätze für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthält die isolierte Plasmid-DNA nur in sehr geringen Konzentrationen. Daher wurde die DNA, wie in 6.3.2 beschrieben, gefällt und das getrocknete Präzipitat in 5 µl H₂O aufgenommen. Die resuspendierte Plasmid-DNA wurde für eine Transformation (6.5.2) in elektro-kompetente *E. coli*-Zellen (Herstellung siehe 6.5.1) eingesetzt, da sich nur nach Amplifikation in Bakterien ausreichende Mengen an DNA für nachfolgende Analysen gewinnen lassen.

<u>Lyse-Puffer:</u>	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris-Cl (pH 8,0)
	1 mM	EDTA
	2% (v/v)	Triton X-100
	1% (w/v)	SDS

<u>Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol:</u>	49%	Phenol
(hergestellt nach (Sambrook et al., 1989)	49%	Chloroform
	2%	Isoamylalkohol

6.21.4 Transformation von Hefezellen nach der Lithiumazetat-Methode

Diese sehr schnelle Methode ist besonders geeignet um im kleinen Maßstab Plasmid-DNA in Hefezellen zu transformieren. Ein Nachteil ist allerdings die sehr geringe Transformationseffizienz. Bereits für eine Doppeltransformation mit zwei verschiedenen Plasmiden wird daher eine sehr große Menge an DNA benötigt.

Für die Präparation von jeweils acht Transformationsansätzen wurden je 0,5 ml einer frischen Übernachtskultur (6.21.1) zu 50 ml YPD (Vollmedium) gegeben und bei 30°C und 200 rpm im Schüttelinkubator herangezogen. Alle nachfolgenden Schritte wurden, soweit nicht anderweitig beschrieben bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 - 1,2 wurden die Hefezellen durch 5 minütige Zentrifugation bei 4.000 g pelletiert. Die Zellen wurden sofort in 25 ml H₂O resuspendiert und wie zuvor mit 4.000 g zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 1 ml LiAc-Lösung resuspendiert, erneut

zentrifugiert (30 sec bei 13.000 rpm) und der Überstand möglichst vollständig entfernt. Zu diesem Ansatz wurden 400 µl LiAc-Lösung gegeben und die Zellen durch gründliches Vortexen suspendiert. Jeweils 50 µl dieser Suspension wurden für eine Transformation in ein separates Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos entfernt und je Transformationsansatz folgendes zugefügt:

- + 280 µl PEG/LiAc-Lösung
- + Plasmid-DNA (50 ng für Einzel- und je 1 µg für Doppeltransformationen)
- + 25 µl ss-DNA (2mg/ml), vor Verwendung 5 min bei 100 °C inkubieren und sofort auf Eis stellen

Obige Transformationsansätze wurden auf dem Vortexer geschüttelt bis die Hefezellen vollständig resuspendiert waren (mind. 1 min), 30 min bei 30 °C inkubiert, 20 min bei 42 °C inkubiert und schließlich 3 min bei 6.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt, die Zellen in 250 µl Minimalmedium suspendiert und auf den benötigten Selektionsplatten ausgestrichen. Nach 48 h Inkubation bei 30 °C konnten die Kolonien mit den transformierten Hefeklonen für nachfolgende Experimente geerntet werden.

<u>LiAc-Lösung:</u>	100 mM	Lithiumazetat
	1 M	Sorbitol
	10 mM	Tris-Cl (pH 7,5)
	1 mM	EDTA (pH 7, 5)

<u>PEG/LiAc-Lösung:</u>	40 % (w/v)	PEG 4000 - 6000
	100 mM	Lithiumazetat
	10 mM	Tris-Cl (pH 7,5)
	1 mM	EDTA (pH 7, 5)

ss-DNA (2 mg/ml): einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer durchschnittlichen Länge von 2 kb; Herstellung entsprechend der Anleitung in (Ausubel *et al.*, 1988-2000)

6.21.5 Hefe 2-Hybrid Analyse

Die 2-Hybrid Analyse in Hefe ist eine Methode zur Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern eines Zielproteins. Sowohl die Sequenz des Zielproteins (*bait*) als auch eine cDNA-Bibliothek, welche eine große Anzahl von möglichen Interaktionspartnern generieren soll, werden in spezielle Hefevektoren kloniert und im ersten Schritt der 2-Hybrid Analyse in einen geeigneten Hefestamm transformiert. In einem zweiten Schritt werden die Doppeltransformatanten auf Selektionsplatten ausgestrichen, auf denen nur jene Zellen wachsen können, in denen durch Interaktion der beiden Proteine die, auf den Selektionsplatten fehlenden essentiellen Metaboliten synthetisiert werden. Entscheidend hierfür ist die Auxotrophie der verwendeten Hefestämme auf die Aminosäuren Trp, Leu, Ade und His.

Als auxotroph bezeichnet man Organismen, die bestimmte essentielle Substanzen nicht selbstständig synthetisieren können und somit auf die externe Zufuhr diese Stoffe angewiesen sind. Das Gegenteil von Auxotrophie wird Prototrophie genannt. Es handelt sich dabei um Organismen, die nicht auf die Zufuhr bestimmter Faktoren angewiesen sind, also alle benötigten Stoffe selbst synthetisieren können.

Transformiert man eine auxotrophe Mutante auch Mangelmutante genannt, mit einem Vektor, der das komplementierende Gen und ein zu untersuchendes Gen trägt, so kann man prüfen, ob beide Gene erfolgreich in den Organismus integriert wurden, denn nur bei komplementierten Mutanten wurde der Vektor und somit das zu untersuchende Gen aufgenommen. Daher werden auxotrophe Mutanten in der modernen Genetik häufig als Alternative zu bakteriellen Resistenzmarkern bei der Transformation von Genen eingesetzt.

Eine, mit dem Vektor pCBW12 transformierte Hefezellkolonie vom Stamm AH109 wurde in 5 ml -Trp SD-Medium (5.4.3) überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei 30°C und 200 rpm im Schüttelinkubator herangezogen. Dieser Ansatz wurde mit -Trp SD-Medium auf zuerst auf 100 ml aufgefüllt und die Zellen wiederum über Nacht bei 30°C und 200 rpm im Schüttelinkubator herangezogen. Dann wurde die Hefekultur auf 1 l mit -Trp SD-Medium aufgefüllt und auf mehrere Schikanekolben aufgeteilt. Bis zum Erreichen der benötigten Zelldichte mit einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 wurde der Ansatz weiterhin bei 30 °C im Inkubator geschüttelt. Alle nachfolgenden Schritte wurden, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1.000 g wurden die Hefezellen geerntet und die Pellets mit insg. 1 l H₂O gewaschen. Nach erneuter

Zentrifugation wie zuvor wurden die vereinigten Zellpellets in 20 ml LiAc/0,5 x TE-Lösung resuspendiert, 10 min bei RT inkubiert und in einen 1 l Erlenmeierkolben überführt. Es wurden 350 µg der amplifizierten cDNA-Bibliothek, 25 mg ss-DNA (BD Clontech, St. Germain-en-Laye, Frankreich) und 140 ml PEG/LiAc-Lösung (siehe 6.21.4) zugegeben. Das Ganze wurde 30 min bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt, 17,6 ml DMSO hinzugefügt und unter gelegentlichem Schütteln nochmals 15 min bei 42 °C inkubiert. Dann wurde der Ansatz schnellstmöglich im Eisbad heruntergekühlt und die Zellen wie zuvor bei 1.000 g pelletiert. Um die hohe Mortalität der Zellen zu verringern wurden sie in 1 l YPD-Medium resuspendiert und 1 h 30°C und 200 rpm im Schüttelinkubator gehalten. Dann wurden die Zellen durch erneute Zentrifugation geerntet, in 10 ml Trp/-Leu/-Ade-His SD-Medium resuspendiert und etwa 50 Trp/-Leu/-Ade-His Selektionsplatten mit einem Durchmesser von 150 mm ausgestrichen.

<u>LiAc/0,5 x TE-Lösung:</u>	100 mM	Lithiumazetat
	5 mM	Tris-Cl (pH 7,5)
	0,5 mM	EDTA (pH 7, 5)

6.22 Isolierung von Proteinen aus Hefezellen

6.22.1 Nativer Zellaufschluss mit Glasperlen

Der Aufschluss von Hefezellen mit Glasperlen zur Herstellung von Zellextrakten mit nativen Proteinen wurde vor allem für Immunpräzipitationen und zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen verwendet. Das Prinzip des Zellaufschlusses besteht darin, dass schnell rotierende Glasperlen die Zellen durch Scherkräfte aufbrechen.

Eine 10 ml Übernachtskultur (6.21.1) wurde durch Zentrifugation bei 3.000 g pelletiert und das Zellsediment in 300 µl eiskaltem TTBS (mit Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte für 15 min bei 4°C mit dem gleichen Volumen an säuregewaschenen Glasperlen (Ø= 425-600 µm) mit dem Vibrax VXR bei maximaler Leistung. Zelltrümmer und Glasperlen wurden anschließend bei 16.000 g und 4°C für 20 Minuten pelletiert und der Überstand mit den isolierten Proteinen entweder sofort verwendet oder bei -20°C eingefroren.

6.22.2 Zellaufschluss durch alkalische Lyse

Die alkalische Lyse von Hefezellen wurde hauptsächlich für die Isolierung von Proteinen angewendet, die später immunologisch nachgewiesen werden sollten. Proteolytischer Abbau wurde dabei durch die sofortige Denaturierung sämtlicher Proteine unterbunden.

Eine OD₅₉₅-Einheit (entspricht etwa 10⁷ Zellen) einer logarithmisch wachsenden Kultur wurde durch Zentrifugation (3 min bei 16.000 g) geerntet. Das resultierende Zellpellet wurde in 300 µl NaOH/β-Mercaptoethanol resuspendiert und die Zellen 10 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden 30 µl einer 110%igen TCA-Lösung (Endkonzentration von 10% (W/v)) zugegeben und wiederum 10 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 16.000 g pelletiert und der Überstand verworfen. Durch Waschen mit 100 µl von 1 M Tris-Cl, pH 7,5, wurde der Ansatz neutralisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (3 min bei 16.000 g) wurde das resultierende Proteinpellet in 30 µl Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

<u>NaOH/β-Mercaptoethanol:</u>	2 M	NaOH
	5% (v/v)	β-Mercaptoethanol

<u>110%ige TCA-Lösung:</u>	110% (w/v)	Trichloressigsäure in H ₂ O
----------------------------	------------	--

6.23 X-Gal Filtertest

AH109-Doppeltransformatanten wurden auf Minimalmedium-Platten ohne Tryptophan und Leucin ausgestrichen und 48 h im Brutschrank bei 30°C inkubiert. Durch Auflegen eines Nitrozellulose-Rundfilters wurde der Zellrasen auf diesen übertragen und von den Platten abgezogen. Die Zellen wurden für 10 Sekunden in flüssigem Stickstoff permeabilisiert und die Nitrozellulosemembran mit den Zellen nach oben auf Whatman 3MM Papier gelegt, das mit Z-Puffer (+X-Gal) durchfeuchtet worden war. Nach 3-24 Stunden Inkubation bei 30°C zeigte sich die β-Galaktosidase-Aktivität durch Umwandlung des Substrates X-Gal in einer deutlichen Blaufärbung der Hefezellen. Es ist zu beachten, dass die X-Gal-Stammlösung (X-Gal-STL) stets bei -20°C aufbewahrt und erst direkt vor der Verwendung zum Z-Puffer zugegeben wird.

Z-Puffer (pH 7,0):

60 mM	Na ₂ HPO ₄
40 mM	NaH ₂ PO ₄
10 mM	KCl
1 mM	MgSO ₄
0,27 % (v/v)	β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
(1,7 % (v/v)	X-Gal-STL, immer frisch zugeben)

X-Gal-STL:

2 % (w/v)	X-Gal in Dimethylformamid
-----------	---------------------------

7 Ergebnisse

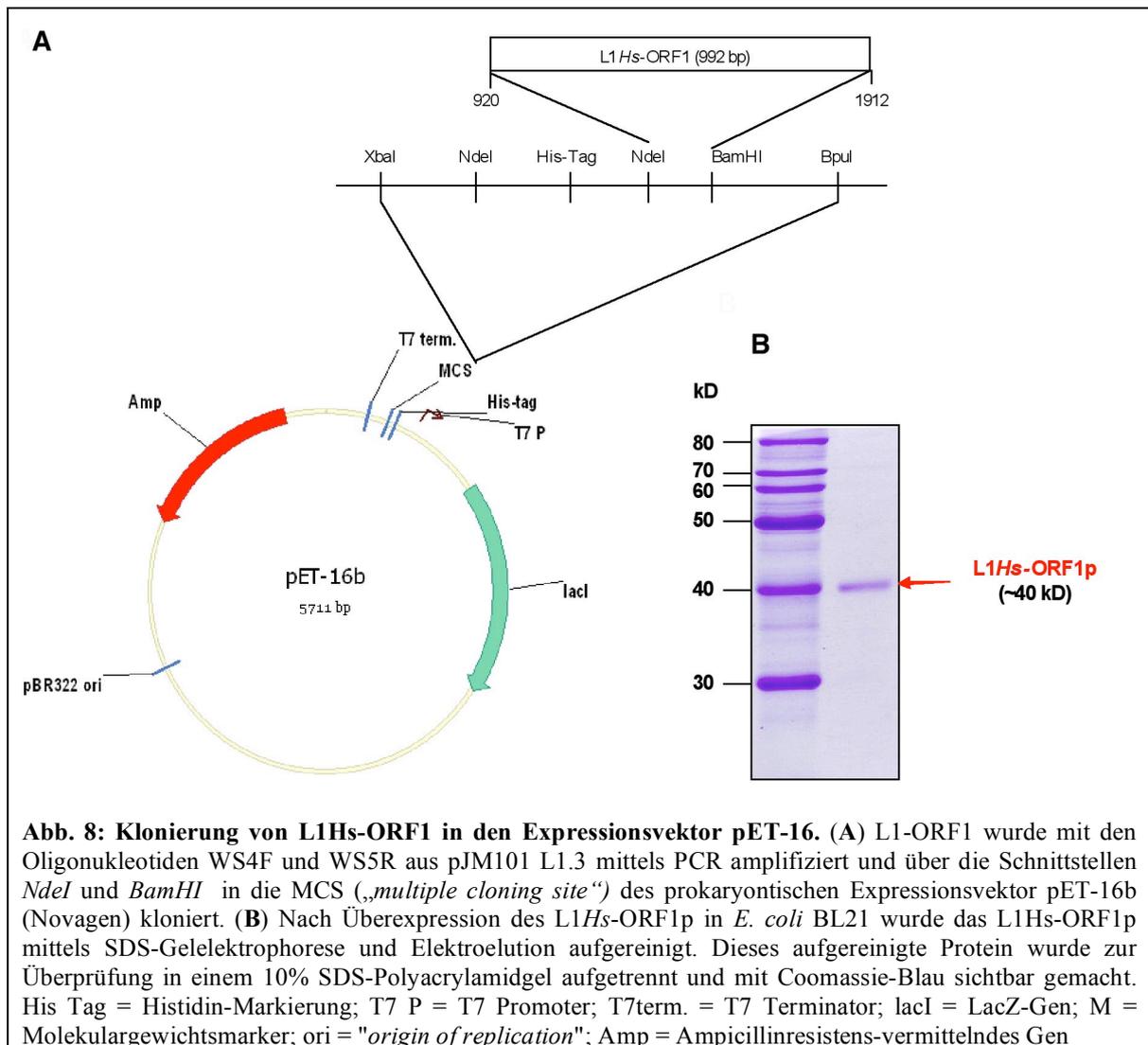
7.1 Nachweis von LINE-1 kodierten Proteinen

Die Anwesenheit beider von funktionellen L1-Elementen kodierten Proteine ist für den Vorgang der L1- Retrotransposition essentiell. Für die Identifizierung von Geweben und Zelltypen, in denen diese Voraussetzungen für die Retrotransposition von L1 gegeben sind, mussten spezifische Antikörper generiert werden, welche die Genprodukte beider L1-spezifischer offener Leserahmen erkennen.

7.1.1 Herstellung polyklonaler anti-ORF1p Antikörper

Der immunologische Nachweis von L1-kodiertem ORF1p geschah in der vorliegenden Arbeit größtenteils durch die Verwendung eines bereits in der Literatur beschriebenen Antikörpers AH40.1 (Leibold *et al.*, 1990), welcher freundlicherweise von T. G. Fanning zur Verfügung gestellt wurde. Da jedoch nur limitierte Mengen von diesem anti-ORF1p Antikörper zur Verfügung standen, sollte für weitere Experimente frisches Antiserum gegen L1-ORF1p in ausreichenden Mengen im Kaninchen hergestellt werden.

Mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. W. Strätling wurde zu diesem Zweck ein L1Hs-ORF1p-Expressionsplasmid hergestellt (Abb. 8A). Die für ORF1p kodierende DNA-Sequenz wurde mit den Oligonukleotiden WS4F und WS5R in einer präparativen PCR (siehe 6.8.1) unter Verwendung von pJM101 L1.3 (Vektorkarte siehe Anhang) als Matrize generiert. Dieses PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen Nde I und BamH I verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor pET16b kloniert, und das resultierende ORF1p-Expressionsplasmid pET-L1Hs-ORF1 mittels Sequenzierung kontrolliert. Nach der Transformation des ORF1p-Expressionsplasmid in den *E. coli* Stamm BL21 wurden 500 ml der *E. coli*-Schüttelkultur mit IPTG induziert (siehe 6.12.1), das überexprimierte Protein über Nickel-NTA Sepharose aufgereinigt (siehe 6.12.2) und die Aufreinigung über SDS-PAGE kontrolliert (Abb. 8B). Für die weitere Aufreinigung und Anreicherung wurden die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 6.13), die gewünschten Proteinbanden präpariert und die Proteine über Elektroelution aus den Gelfragmenten extrahiert (siehe 6.13.1). Auf diese Weise wurden 900 µg L1-ORF1p isoliert, welches mit sechs N-terminalen Histidinresten (His-Tag) markiert wurde.



Die Immunisierung von Kaninchen wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt. Um die Gewinnung von spezifischem anti-ORF1p-Antiserum zu gewährleisten, wurden aus zehn immunisierten Kaninchen diejenigen für die Antikörpergewinnung herangezogen, deren Serum die geringste unspezifische Hintergrundaktivität aufwies. Dazu wurden die Präimmunseren aller zehn Tiere für eine Immunblotanalyse von Gesamtzelllysaten von CEF-, HeLa- und Hefezellen eingesetzt, in denen ORF1p vom Plasmid pCBW 9 (siehe Abb. 23A) überexprimiert wurde. Da einige der getesteten Präimmunseren eine Vielzahl von Proteinen unspezifisch detektierten, wurden für die Immunisierung mit L1-ORF1p diejenigen zwei Kaninchen ausgewählt deren Präimmunseren die geringste unspezifische Reaktivität aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Diese beiden Kaninchen wurden von der Firma Eurogentec je viermal mit 100 µg Protein an den Tagen 0, 14, 28 und 56 immunisiert. Die erste Serumentnahme erfolgte am Tag 66

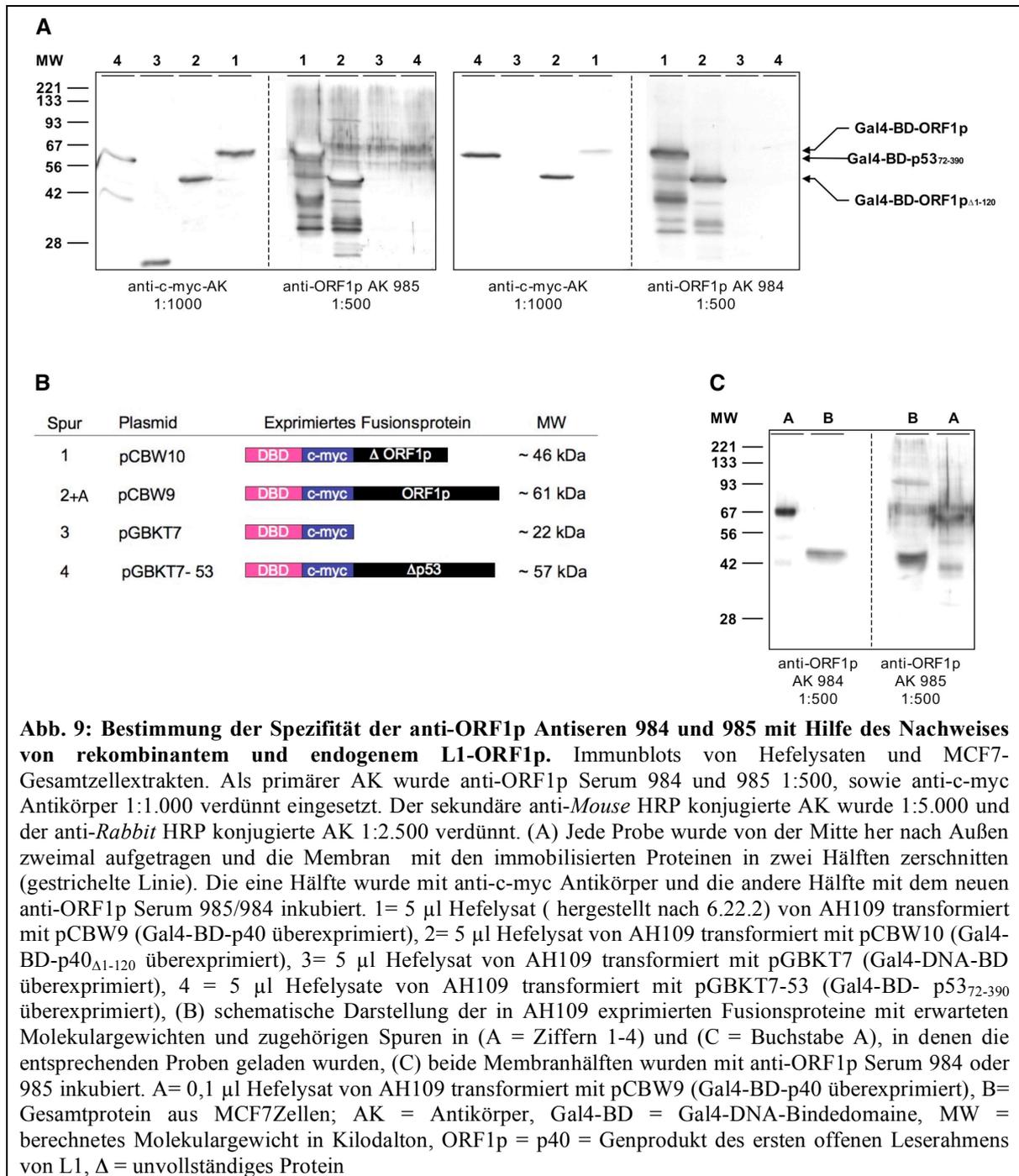
nach der initialen Immunisierung und umfasste jeweils 22 ml Blut. Die finale Blutung wurde an Tag 80 vorgenommen und ergab nochmals jeweils 60 ml Blut. Die daraus gewonnenen Seren der beiden immunisierten Kaninchen trugen die Bezeichnungen 984 bzw. 985.

7.1.1.1 Nachweis der Spezifität der anti-ORF1p Antikörper

Nach der Gewinnung der Seren musste deren Spezifität für ORF1p überprüft werden. Hierzu wurde mittels Immunblotanalysen getestet, ob die Antiseren rekombinantes ORF1p, das mit der Gal4-DNA-Bindedomäne (Gal4-BD) fusioniert wurde, erkennen. Die Gal4-BD-ORF1p-Expressionskonstrukte und deren Herstellung sind in Abb. 23A+B und im Abschnitt 7.2.1 beschrieben. Da die überexprimierten Fusionsproteine mit dem c-myc Antigen markiert sind (Abb. 9B), können die, mit dem anti-ORF1p Serum erhaltenen Ergebnisse, durch Immunblotanalyse mit einem anti-c-myc Antikörper kontrolliert werden. In Abb. 9A ist das Ergebnis der Immunblotanalyse für die Seren 984 und 985 gezeigt. Der anti-c-myc Antikörper detektiert die Fusionsproteine auf Höhe der berechneten und erwarteten Molekulargewichte (Abb. 9A, jeweils linke Membranhälfte), wobei die Gal4-BD alleine vom anti-c-myc Antikörper nur in auf der rechten Membran und nicht auf der linken Membran detektiert wird. Möglicherweise ist sie mit einem MW von ca. 22 kDa bereits aus dem zugrunde liegenden SDS-PAGE der linken Membran herausgelaufen.

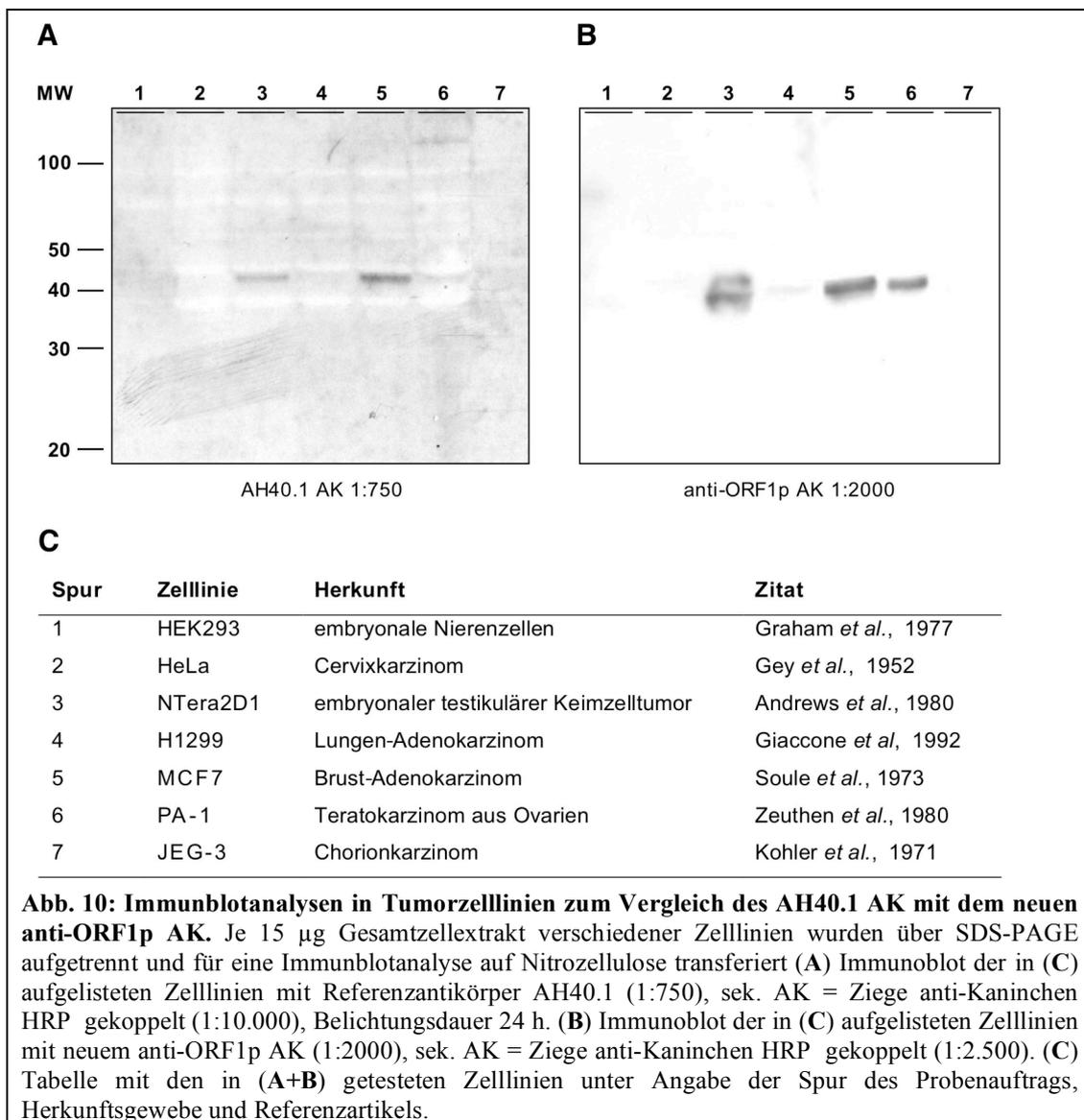
Der anti-ORF1p Antikörper detektiert jeweils nur die Fusionsproteine, die einen L1-ORF1p Anteil tragen (Abb. 9A, Spuren 1 und 2, rechte Membranhälfte). Dabei scheint das fehlende N-terminale Drittel von ORF1p die Bindung des Antikörpers nicht negativ zu beeinflussen, da keine auffällige Verminderung in der Bandenintensität zu beobachten ist (Abb. 9A, Vergleich Spur 2 zu Spur 1, rechte Membranhälfte). In der Immunblotanalyse sind mit beiden Antiseren mehrere kleinere Polypeptide nachweisbar, jedoch handelt sich hierbei vermutlich um zusätzliche Degradationsprodukte (Abb. 9A, Spuren 1 und 2, rechte Membranhälfte), da die beiden Negativkontrollen (Abb. 9A, Spuren 3 und 4, rechte Membranhälfte) praktisch keine Antikörperreaktion zeigen. Der einzige Unterschied zwischen den Proben beruht nämlich auf der Abwesenheit des L1-ORF1p. Somit kann durch dieses Ergebnis die hohe Spezifität des anti-ORF1p Antikörper bestätigt werden, wobei Antiserum 984 dem Antiserum 985 in der Spezifität scheinbar überlegen ist, da es deutlich weniger Hintergrundfärbung zeigt. Zusätzlich wurden beide Antiseren in einer weiteren Immunblotanalyse unmittelbar miteinander verglichen. Sowohl Antikörpertiter

als auch Spezifität wurden anhand des rekombinanten Gal4-BD-ORF1p Fusionsproteins (Abb. 9C) in Hefeextrakt und des in menschlichen MCF7-Zellen endogen exprimierten ORF1p untersucht.



Die größere Signalstärke im Falle von Antiserum 985 (Abb. 9C, rechte Seite) zeigt, dass dieses Antiserum einen etwas höheren anti-ORF1p Antikörpertiter aufweist als Antiserum 984 (Abb. 9C, linke Seite). Allerdings sind im Vergleich zu Antiserum 984 mehrere zusätzliche Banden erkennbar, die möglicherweise auf eine unspezifische

Antikörperreaktion zurückzuführen sind. Antiserum 984 zeigt eine geringere Signalstärke als Serum 985, allerdings wird dies durch die höhere Reaktionspezifität wettgemacht. Im MCF7 Gesamtzellextrakt zeigt Antiserum 984 keine Kreuzreaktivität innerhalb der Nachweisgrenze (Abb. 9C, Spur B, linke Seite). Bei den schwachen Banden im AH109-Hefelysat (Abb. 9C, Spur A, linke Seite) handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um proteolytische Spaltprodukte des Gal4-BD-ORF1p Fusionsproteins. Somit zeigt der in Abb. 9A und C dokumentierte Vergleich beider Antiseren eine bessere Eignung von Antiserum 984 für sich anschließende immunologische Experimente zum spezifischen Nachweis von L1-ORF1p. Für die weiteren Experimente wurde daher ausschließlich das Antiserum 984 verwendet, das fortan als anti-ORF1p Antikörper bezeichnet wurde.



Die Spezifität des neuen anti-ORF1p AK wurde mit der Spezifität des bisher verwendeten AK AH40.1 (Leibold *et al.*, 1990) verglichen. Im Immunoblot wurde die Spezifität gegen

Gesamtproteinextrakte von acht verschiedenen Tumorzelllinien getestet (Andrews *et al.*, 1980; Gey, 1952; Giaccone *et al.*, 1992; Graham *et al.*, 1977; Kohler and Bridson, 1971; Soule *et al.*, 1973; Zeuthen *et al.*, 1980), die in Abb. 10C mit dem Herkunftsgewebe aufgelistet sind. Während der AK AH40.1 nur in den Zelllinien NTera2D1 und MCF7 das L1-ORF1p im erwarteten Bereich von ca. 40 kDa klar detektiert (Abb. 10A, Spur 3 und 5), zeigt der neue anti-ORF1p AK zusätzlich eine etwas schwächere Reaktion im PA-1 Lysat (Abb. 10B, Spur 6), welche beim AH40.1 kaum erkennbar bleibt (Abb. 10A, Spur 6). Trotz der etwa 500 x längeren Belichtungsdauer des Films bleibt die Signalintensität beim AH40.1 schwächer als beim anti-ORF1p AK, während gleichzeitig der unspezifische Hintergrund beim anti-ORF1p AK geringer ist. Diese Resultate konnten in immunhistochemischen Vergleichsanalysen mit menschlichem Hoden-, Nebenhoden- und Tumorgewebe reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigte der neue anti-ORF1p AK in hinsichtlich der Signalstärke mindestens vergleichbare Resultate wie AK AH40.1 bei deutlich höherer Spezifität, was sich in einer geringeren Hintergrundaktivität manifestierte.

Um zu untersuchen, ob sich der anti-ORF1p AK auch für die spezifische Detektion von nativem ORF1p-Antigen eignet, sollte endogen exprimiertes L1-ORF1p mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) in HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11).

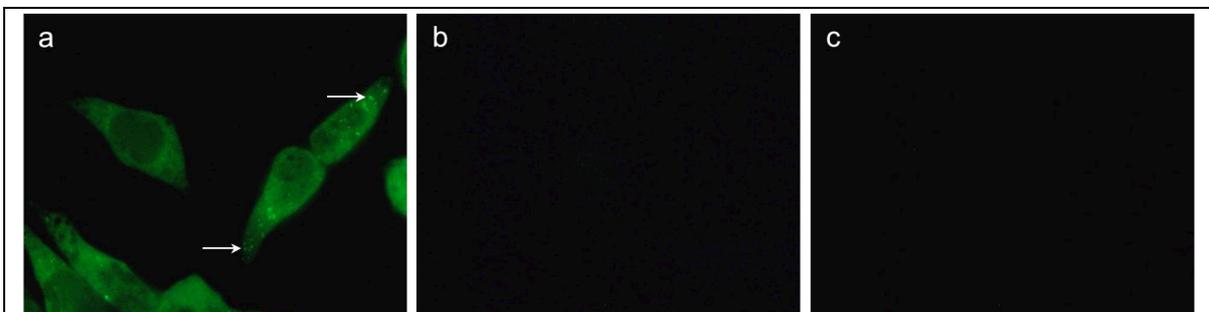


Abb. 11: Nachweis von endogenem ORF1p im Zytoplasma von HeLa-Zellen mittels Immunfluoreszenz. HeLa-Zellen wurden mit dem neuen anti-ORF1p Antikörper 984 (1:250) und dem sek. anti-Rabbit Alexa 488 gekoppeltem AK (1:100) markiert. Als Negativkontrollen wurde die Immunfluoreszenzfärbung an HeLa-Zellen mit Präimmunsereum 984 (Aufnahme *b*) und ohne primären Antikörper (Aufnahme *c*) in denselben AK-Verdünnungen durchgeführt.

Hierzu wurden HeLa-Zellen für Immunfluoreszenzexperimente (siehe 6.16.1) mit anti-ORF1p Antiserum 984, Präimmunsereum 984 und sekundärem Antikörper als Negativkontrolle, eingesetzt. Als Ergebnis zeigt sich eine gleichmäßige Färbung im Zytoplasma der HeLa-Zellen, während im Zellkern kaum oder gar keine Färbung mit Antiserum 984 identifiziert werden kann (Abb. 11*a*). Einige Zellen weisen zusätzlich kräftige punktförmige Färbungen auf (siehe Pfeilmarkierungen in Abb. 11*a*), die auf

ORF1p-Aggregate hindeuten. Kontrollexperimente mit Präimmenserum 984 (Abb. 11b) und sekundären Antikörper alleine (Abb. 11c) zeigten erwartungsgemäß keine Reaktion. Durch diese Ergebnisse wurde bewiesen, dass Antiserum 984 L1-ORF1p spezifisch detektiert und somit für IF-Untersuchungen gut geeignet ist.

7.1.2 Herstellung polyklonaler anti-ORF2p Antikörper

Nachdem ausreichende Mengen L1-ORF1p-spezifischer Antikörper zur Verfügung standen, sollten jetzt auch Antikörper zum Nachweis von L1-ORF2p hergestellt werden. Versuche anderer Arbeitsgruppen einen solchen Antikörper in Kaninchen zu erzeugen, scheiterten an ungenügender Spezifität oder an zu niedrigen Antikörpertitern des gewonnenen Antiserums. Diese Misserfolge sind mit größter Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass L1-ORF2 innerhalb der Klasse der Säugetiere hochkonserviert ist und L1-ORF2p nach Injektion in den Säugerorganismus (z.B. Kaninchen oder Maus) nicht als "fremd" erkannt und somit keine Immunantwort gegen L1-ORF2p induziert wird. Da L1-Elemente im Huhn nicht vorkommen, und die, in deren Genom vorliegenden non-LTR Retrotransposons sich von den LINE-1s der Säuger signifikant unterscheiden, erwarteten wir eine starke Immunantwort gegen humanes L1-ORF2p im Huhn. Da im humanen Genom eine Vielzahl nicht-funktionaler L1-Elemente vorliegt, die an den 5'-Enden ihres ORF2 verkürzt sind und daher nur für inaktive ORF2p-Fragmente kodieren, mussten die ORF2-spezifischen Antigene so gewählt werden, dass die dagegen gerichteten Antikörper möglichst nur funktionelle, intakte ORF2-Proteine detektieren. Um dies zu erreichen wurden die Hühner mit zwei unterschiedlichen Peptiden immunisiert, die auf der EN-Domäne am N-terminalen Ende von ORF2p lokalisiert sind (Abb. 12). Durch die Verwendung von Antikörpern, die gegen diese Peptide gerichtet sind, wird bei Expressionsstudien der von Genprodukten unvollständiger Elemente verursachte Hintergrund verringert und die Wahrscheinlichkeit ein vollständiges und funktionelles ORF2p zu detektieren erhöht. Die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) wurde beauftragt mit Hilfe der Lasergene Software (Firma DNASTAR) diejenigen Peptide der N-terminalen EN-Domäne auszuwählen, für die sich eine maximale Immunogenität erwarten lässt. Um derartige EN-Peptide zu identifizieren, wurden Hydrophobizitäts-/Hydrophilizitäts-Profile erstellt, Vorhersagen zu möglichen Sekundärstrukturen getroffen, Wahrscheinlichkeiten der Oberflächenexpositionen berechnet sowie umfangreiche Datenbankrecherchen durchgeführt. Die Peptide #1419 und #1420 mit den Aminosäuresequenzen

"CTLDRSTRQKVNKDTQ" und "CRDTHRLKIKGWRKIY" wurden für die Immunisierung der Hühner ausgewählt, da für diese Peptide die höchste Immunogenität vorhergesagt wurde. Das Amino-terminale Cystein von Peptid #1419 wurde für die Kopplung an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) als Trägermaterial hinzugefügt und ist nicht L1-kodiert.

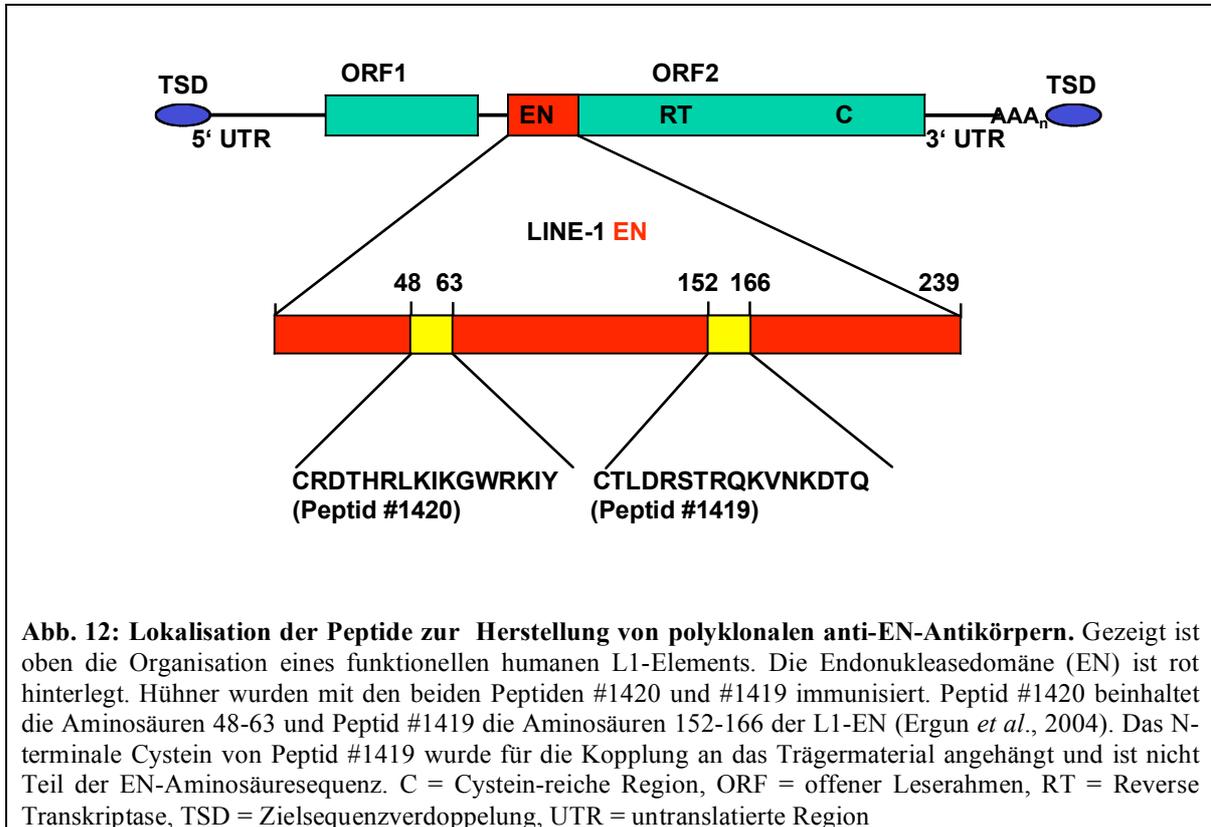
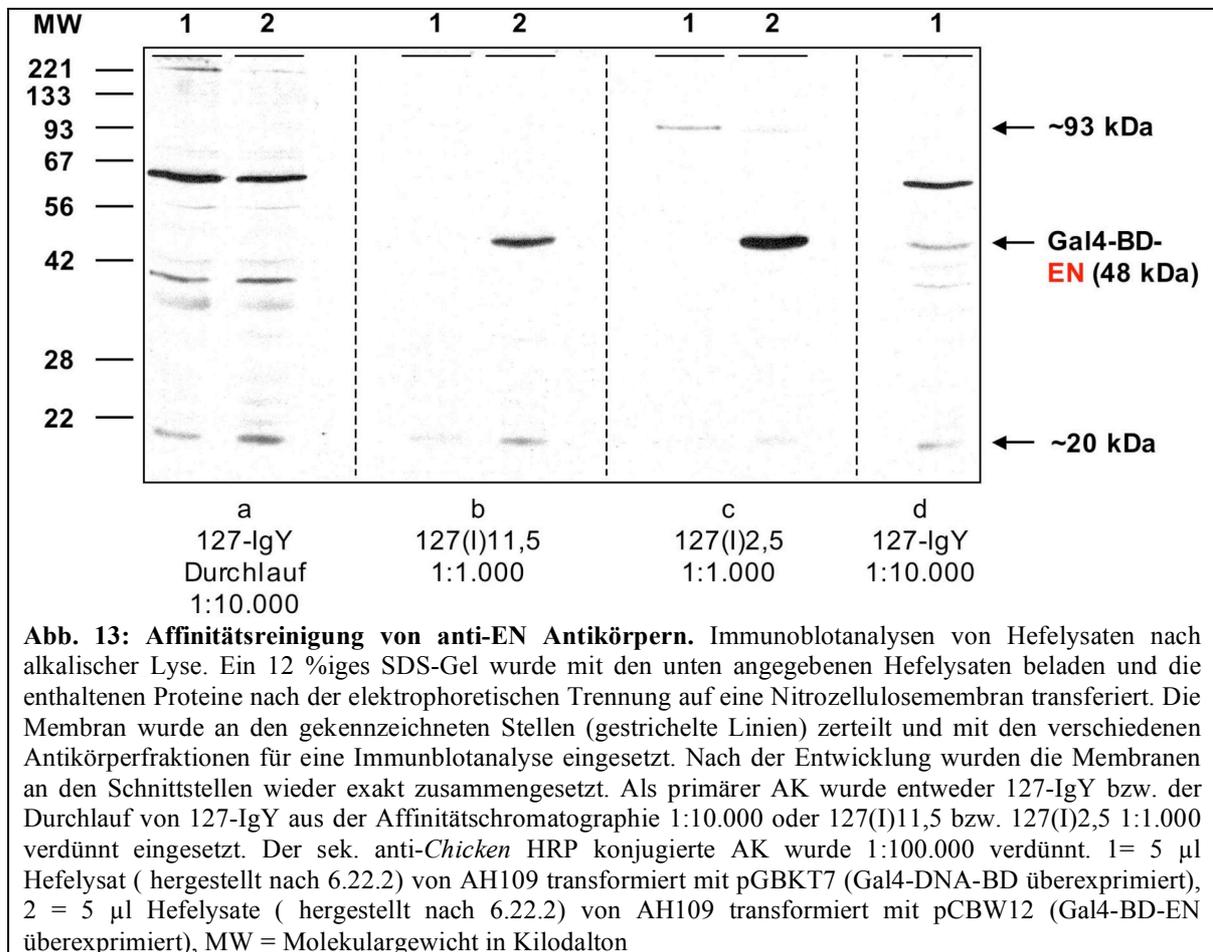


Abbildung 12 zeigt die Organisation eines funktionellen menschlichen L1-Elements und die genaue Position der beiden Peptide innerhalb der EN-Domäne des L1-ORF2p. Angegebene Aminosäurepositionen und -sequenzen beziehen sich auf das zur Retrotransposition befähigte LINE-Element mit der Bezeichnung L1.3 (Genbank Nr. L19088). Folgende Arbeiten wurden von der Firma EUROGENTEC auftragsgemäß durchgeführt: 1) Synthese der Peptide #1419 und #1420; 2) Kopplung der Peptide an KLH; 3) Vier Immunisierungen von je zwei Hühnern (Huhn 127 und Huhn 128) mit beiden Peptiden über einen Zeitraum von 7 Wochen; 4) Abschließende Lieferung von jeweils 25 ml Präimmuneigelb und 100 ml Immuneigelb pro Huhn, welches ab 2 Wochen nach der letzten Immunisierung gesammelt worden war.

7.1.2.1 Aufreinigung von anti-ORF2p Antikörpern

Aus dem Eigelb wurde unter Verwendung der Wasser-Verdünnungs Methode und anschließender PEG-Fällung die IgY-Fraktion präpariert (siehe 6.19.1). Die resultierenden Gesamt-IgY Präparationen aus den Hühnern 127 und 128 wurden als "IgY-127" bzw. "IgY-128" bezeichnet. Die zugehörigen Präimmunglobuline wurden dementsprechend im Folgendem als "prä127" und "prä128" bezeichnet. Um die Spezifität der isolierten Antikörper zu prüfen wurden Immunblotanalysen mit Extrakten aus Hefezellen durchgeführt, in denen die L1-EN Domäne als Gal4-BD Fusionsprotein exprimiert wurde (Blot nicht gezeigt). Die Immunblotanalysen zeigten erhebliche unspezifische Kreuzreaktionen. Daher wurden die IgY-Präparationen "IgY-127" und "IgY-128" bis auf eine kleine Kontrollmenge für eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie eingesetzt, um die spezifischen anti-ORF2p Antikörper aus den Gesamt-IgY Präparationen zu isolieren. Je 2,5 mg der lyophilisierten Peptide #1419 und #1420 wurden, wie in 6.19.2 beschrieben, an CnBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Die beiden Ansätze wurden vereinigt und mit der so hergestellten Affinitätsmatrix wurde eine Säule für die anschließende Chromatographie gepackt. Um die Effizienz der Methode zu prüfen, wurden zunächst nur 2,5 ml der insgesamt 10 ml Antikörper-Präparation "IgY-127" für die Affinitätschromatographie eingesetzt (Durchführung siehe 6.19.3). Entsprechend der pH-Werte (2,5 und 11,5) der verwendeten Elutionspuffer wurden die beiden gewonnenen Eluate als "127(I)2,5" für das Niedrig-pH Eluat, und "127(I)11,5" für das Hoch-pH Eluat, genannt. Immunblotanalysen mit Extrakten von Gal4-BD-EN exprimierenden Hefezellen zeigten nun eine deutlich erhöhte Signalstärke der aufgereinigten Antikörper (Abb. 13b und c) im Vergleich zu "IgY-127" (siehe Abb. 13d). Trotz der 10-fach höheren Antikörperkonzentration ist im Falle der beiden Eluate "127(I)2,5" und "127(I)11,5" (Abb. 13b und c) mit Ausnahme der unspezifischen ~20 kDa und ~93 kDa Banden, nur noch die spezifische 48 kDa Bande erkennbar, die vom Gal4-BD-EN Fusionsprotein herrührt. Weiterhin sollte kontrolliert werden, ob die spezifischen gegen die EN-Domäne gerichteten Antikörper quantitativ aus der Gesamt IgY-Fraktion isoliert werden konnten. Zu diesem Zweck wurde der Durchlauf aus der Affinitätschromatographie, der alle Antikörper enthält die nicht an die Immunaaffinitätsmatrix adherierten, auf Anwesenheit von anti-EN Antikörpern kontrolliert. Vergleicht man die Spezifität der Antikörperpräparation 127-IgY (Abb. 13d), mit der des (Abb. 13a), so zeigt sich, dass die GAL4-BD-EN Fusion im dem Durchlauf nicht mehr nachgewiesen werden kann. Dieses

Ergebnis zeigt klar, dass nahezu sämtliche L1-EN spezifischen Antikörper mittels der durchgeführten Affinitätschromatographischen Aufreinigung aus der Gesamt-IgY Fraktion isoliert werden konnten. Die etablierte Methode der Affinitätschromatographie erwies sich somit als geeignet, anti-EN Antikörper mit hoher Spezifität quantitativ aus einem Immunglobulingemisch zu isolieren.



Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden aus dem Rest der Präparationen "IgY-127" und "IgY-128" anti-EN-Peptid spezifische Antikörper über die Affinitätsmatrix isoliert. Niedrig-pH- und Hoch-pH-Antikörpereluate von Huhn 127 wurden als "127 (II) 2,5" bzw. "127 (II) 11,5" bezeichnet. Entsprechend wurden die Bezeichnungen "128-2,5" und "128-11,5" für die Eluate von Huhn 128 verwendet. Sämtliche Experimente zum immunologischen Nachweis von ORF2-Proteinen, welche die EN-Domäne einschließen, wurden, wenn nicht anders angegeben, mit dem Antikörpereluat "128-2,5" durchgeführt.

7.1.2.2 Spezifischer Nachweis von rekombinantem L1-ORF2p durch den anti-EN Antikörper

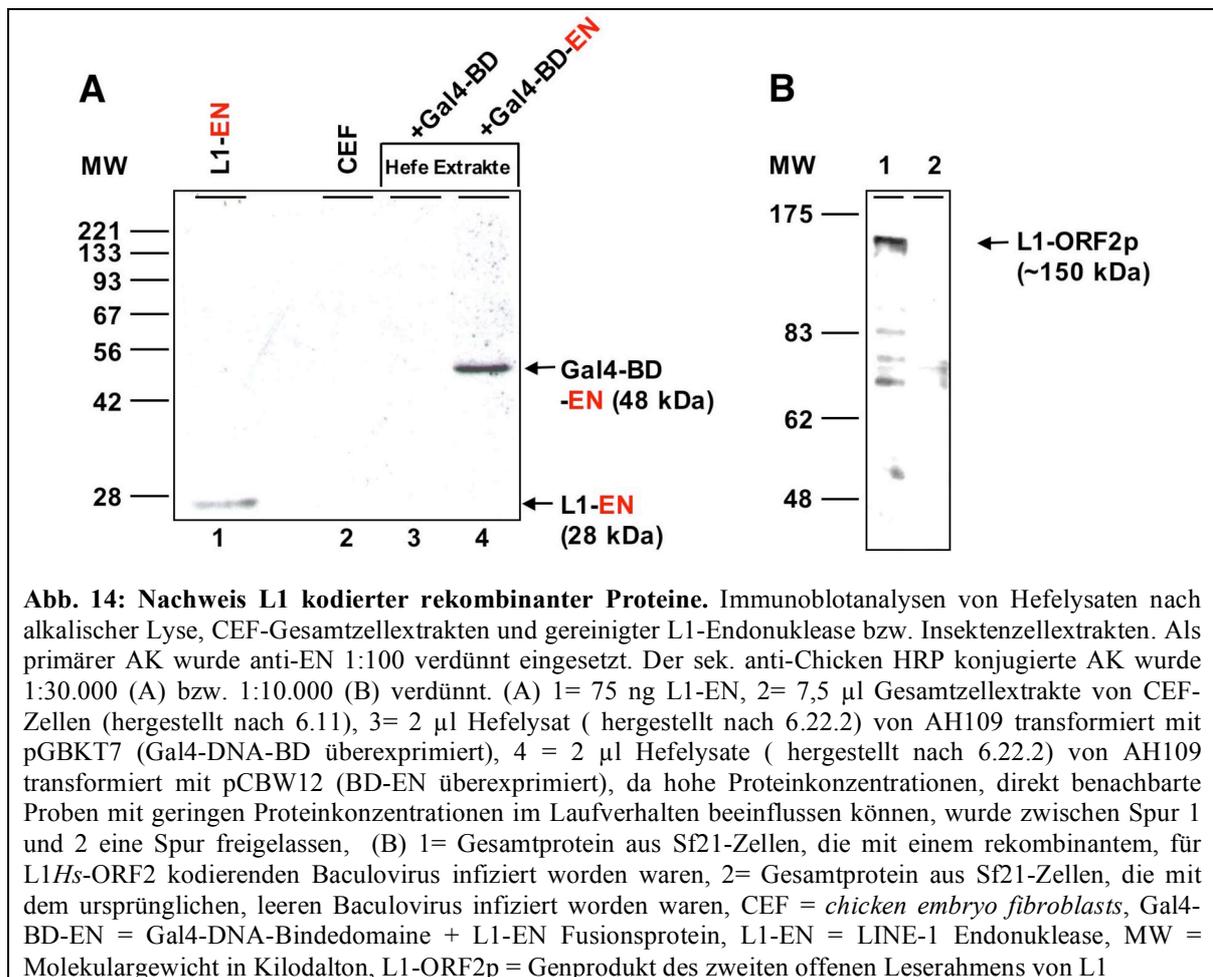
Bei der Herstellung von Antiseren durch Immunisierung mit Peptiden müssen gewisse Besonderheiten berücksichtigt werden. Durch die Verwendung der Peptide als lineare Epitope ist die Bindung des Antikörpers an das denaturierte Protein oft sehr spezifisch. Im nativen Protein mit seinen komplexen Sekundär- und Tertiär-Strukturen sind diese Peptide, gegen welche die Antikörper gerichtet sind, jedoch zum Teil maskiert, wodurch die Bindung des Antikörpers verhindert sein kann.

Spezifität und Titer des von mir hergestellten anti-EN AK sollten zunächst anhand denaturierter Proteine untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde entweder die EN-Domäne oder das gesamte L1-ORF2p in verschiedenen Wirtszellen als rekombinantes Protein überexprimiert und die Expression mittels Immunblotanalysen mit anti-EN AK charakterisiert.

In *E. coli* überexprimiertes und affinitätschromatographisch aufgereinigtes L1-EN Protein (Schenkung von Jef D. Boeke und Gregory J. Cost, Johns-Hopkins-University, Baltimore) (Cost and Boeke, 1998) wurde spezifisch durch den anti-EN AK erkannt (Abb. 14A, Spur 1). Als Negativkontrolle bei der Immunblotanalyse mit anti-EN AK wurde Zellextrakt von Hühnerembryofibroblasten (CEF, *chicken embryo fibroblasts*) aufgetrennt, da das Genom des Haushuhns (*Gallus domesticus*) nicht für L1-Sequenzen kodiert. Das in *Gallus domesticus* kodierte non-LTR Retrotransposon CR1 ist nur entfernt mit den L1-Elementen der Säuger verwandt und unterscheidet sich daher auch in der ORF2p-Sequenz stark von L1 (Malik *et al.*, 1999; Silva and Burch, 1989). Wie erwartet wurde daher von anti-EN AK in CEF-Extrakt kein Protein detektiert (Abb. 14A, Spur 2). Proteinextrakte von Hefezellen, die Gal4-BD bzw. Gal4-BD-EN Fusionsproteine exprimieren (siehe 6.22.2) dienen als Negativ- bzw. Positivkontrolle auf die Spezifität des anti-EN AK. Während das Gal4-BD-EN Fusionsprotein mit einem berechneten Molekulargewicht von 48 kDa ein spezifisches Signal erzeugte, wurde in dem Hefeextrakt, der nur Gal4-DNA-BD beinhaltet, kein Protein vom Antikörper erkannt (Abb. 14A, Spuren 3 und 4).

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, dass der anti-EN AK auch das vollständige ORF2p (~150 kDa) in denaturierter Form erkennt. Zu diesem Zweck wurde in Kooperation mit Olga Piskareva und Vadim Schmachtscheko an der russischen Akademie der Wissenschaften (Department of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russland), der komplette L1*HS*-ORF2 in ein Baculovirus-Expressionskonstrukt

kloniert und in der Insektenzelllinie Sf21 exprimiert (Piskareva *et al.*, 2003). Sf21-Zellextrakt wurde auf ein 9% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mittels Immunblotanalyse mit dem anti-EN AK auf ORF2p-Expression untersucht. In den Zellextrakten mit dem L1*Hs*-ORF2 Baculovirus-Expressionskonstrukt wurde ein Protein detektiert (Abb. 14B, Spur 1), das in dem Sf21-Zellextrakt mit dem leeren Baculovirusvektor nicht erscheint (Abb. 14B, Spur 2) und dessen MW mit ca. 150 kDa exakt dem des ORF2p entspricht. Da sich die beiden Zellextrakte nur in der Expression des L1-ORF2p unterscheiden sollten, darf man davon ausgehen, dass es sich bei dem 150 kDa Protein um das überexprimierte L1-ORF2p handelt. Bei den schwächeren Signalen mit MWs zwischen ca. 65 - 85 kDa (Abb. 14B, Spur 1), handelt es sich vermutlich um unvollständige oder degradierte ORF2-Genprodukte, da keine entsprechende Reaktion in den Proteinextrakten der Kontrollzellen stattfand, welche nur mit dem leeren Ursprungsbaculovirus infiziert worden waren (Abb. 14B, Spur 2). Es konnte somit gezeigt werden, dass der anti-EN AK die rekombinant exprimierte Endonukleasedomäne sowohl allein, als auch im Kontext des kompletten L1-ORF2 Proteins im denaturierten Zustand erkennt und spezifisch detektiert.



Um zu prüfen, ob der anti-EN AK das vollständige ORF2p in seiner nativen Konformation erkennt, sollte rekombinantes ORF2p in HeLa-Zellen exprimiert werden, um es mit den anti-EN AK im Immunfluoreszenzmikroskop nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit dem episomalen Retrotranspositions-Reporterplasmid pJM101/L1.RP (siehe auch Vektorkarte von pJM101 L1.3 im Anhang) transfiziert (entsprechend der Transfektion von HeLa-Zellen für den L1-Retrotranspositionstest siehe 6.1.1.13), welches das funktionelle L1_{RP}-Element, unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors trägt (Kimberland *et al.*, 1999). Als Negativ-Kontrolle für ORF2p-Expression wurden HeLa-Zellen mit dem episomalen Vektor pCEP4 (Invitrogen, Vektorkarte siehe Anhang) transfiziert, der sich von pJM101/L1RP ausschließlich durch die Abwesenheit der L1-Retrotranspositions-Reporterkassette unterscheidet. 50% der transfizierten Zellen pro Ansatz wurden nach 48 h einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Die anderen 50% wurden jeweils für weitere 38 Tage unter Hygromycin-Selektion (200µg/ml) auf Anwesenheit des L1-Expressionsplasmids selektioniert, bevor auch diese Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-EN AK auf Anwesenheit von L1 ORF2p untersucht wurden (siehe 6.16.1). Für diesen Versuch wurde anti-EN AK in einer Verdünnung von 1:50 und der sekundäre Cy3-markierte anti-Huhn AK in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

Sowohl in HeLa-Zellen, die mit dem leeren Vektor pCEP4 transfiziert wurden (Abb. 15b, d und f), als auch in untransfizierten HeLa-Zellen (Daten nicht gezeigt) ist nur eine schwache Hintergrundfärbung zu erkennen, die sehr wahrscheinlich auf die Expression endogener L1-Elemente zurückzuführen ist.

Im Gegensatz dazu führte die Transfektion mit pJM101/L1.RP nach nur 48 Stunden in vielen Zellen zu einer stark erhöhten Immunfärbung des Zytoplasmas (Abb. 15a und c). Abb. 15e zeigt, dass nach 38 Tagen Selektion auf Anwesenheit des transfizierten L1-Reporterkonstrukts in jeder Zelle der transfizierten HeLa-Kultur eine starke Fluoreszenz des Zytoplasmas nach Anfärbung mit dem anti-EN AK nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu führte die gleiche Selektion auf Anwesenheit des leeren episomalen Ursprungsvektors pCEP zu keiner anti-EN-spezifischen Immunfluoreszenz (Abb. 15f). Da sich pJM101/L1.RP von pCEP4 ausschließlich durch die Anwesenheit des aktiven L1_{RP}-Elements unterscheidet, kann man schlussfolgern, dass der beobachtete Unterschied in der Immunfluoreszenz durch die Interaktion des aufgereinigten anti-Peptid AK "128-2,5" mit dem überexprimierten ORF2p des L1_{RP}-Elements hervorgerufen wurde. Um klar zu demonstrieren, dass die Immunfluoreszenzsignale eindeutig auf die Interaktion des

aufgereinigten anti-Peptid AKs zurückzuführen sind, wurden die beiden folgenden Kontrollexperimente durchgeführt: pJM101/L1.RP-transfizierte, Hygromycin-resistente HeLa-Zellen wurden mit dem anti-EN-Antikörpereluat inkubiert, welches vorher mit den Peptiden 1419 und 1420 präabsorbiert wurde (Abb. 15h). Außerdem wurden bei der Immunfluoreszenzfärbung der primäre AK durch PBS ersetzt, um klar zu zeigen, dass der primäre anti-EN AK und nicht etwa der sekundäre AK für die Färbung der HeLa-Zellen verantwortlich ist (Abb. 15g). Da in beiden Fällen keine Fluoreszenzreaktion festgestellt werden konnte, spricht dies für die spezifische Erkennung von ORF2p durch den anti-EN AK.

Überexpression von L1 ist mit einem starken Anstieg von Doppelstrangbrüchen der DNA assoziiert (Gasior *et al.*, 2006; Gilbert *et al.*, 2002) und kann in Folge zu erhöhten Apoptoseraten (Haoudi *et al.*, 2004) oder eingeschränkter Proliferation (Gire *et al.*, 2004; Houtgraaf *et al.*, 2006) führen. Diese toxische Wirkung auf Zellen beruht im Wesentlichen auf der Aktivität der Endonuklease des L1-ORF2p, da Mutation im katalytischen Zentrum der L1-EN zu einer starken Reduktion der Toxizität des L1-ORF2p führen, während Mutationen in der RT-Domäne nur geringen Einfluss auf die Toxizität hatten (Wallace *et al.*, 2008). Da gezeigt wurde, dass die Expression zytotoxischer Proteine zu erhöhter roter Autofluoreszenz absterbender Zellen führen kann (Walsh *et al.*, 1998), musste geprüft werden, ob die starke Fluoreszenz (Abb. 15c und e) möglicherweise auf Toxizität des überexprimierten L1-ORF2p anstatt auf der Erkennung von ORF2p durch den AK beruht. Für diesen Test wurden HeLa-Zellen mit einem inaktiven L1-Reporterplasmid H230A transfiziert, das die Aminosäuresubstitution (H230A) im katalytischen Zentrum der Endonukleasedomäne trägt und in-vitro keine Endonukleaseaktivität zeigt, was zu einer 200fach verringerten Retrotranspositionsrate führt (Feng *et al.*, 1996). Nach der Transfektion und 38-tägiger Hygromycin-Selektion auf Anwesenheit des inaktiven L1.2A-Reporterkonstruktes wurde eine starke Immunreaktion beobachtet, die der des aktiven L1.RP-Konstruktes entspricht (Abb. 15e). Außerdem unterschieden sich die Zellen, die L1.2A Mutante exprimierten in ihrer Generationszeit nicht von den pJM101/L1.Rp transfizierten Zellen. Insgesamt zeigen diese Resultate, dass die aufgezeichneten Fluoreszenzsignale durch die Interaktion des neuen anti-Peptid AK mit dem überexprimierten ORF2p hervorgerufen wurden und, dass diese Signale nicht durch sterbende Zellen, aufgrund möglicher toxischer Effekte der L1 kodierten Proteine oder Insertionsmutagenese, verursacht wurden.

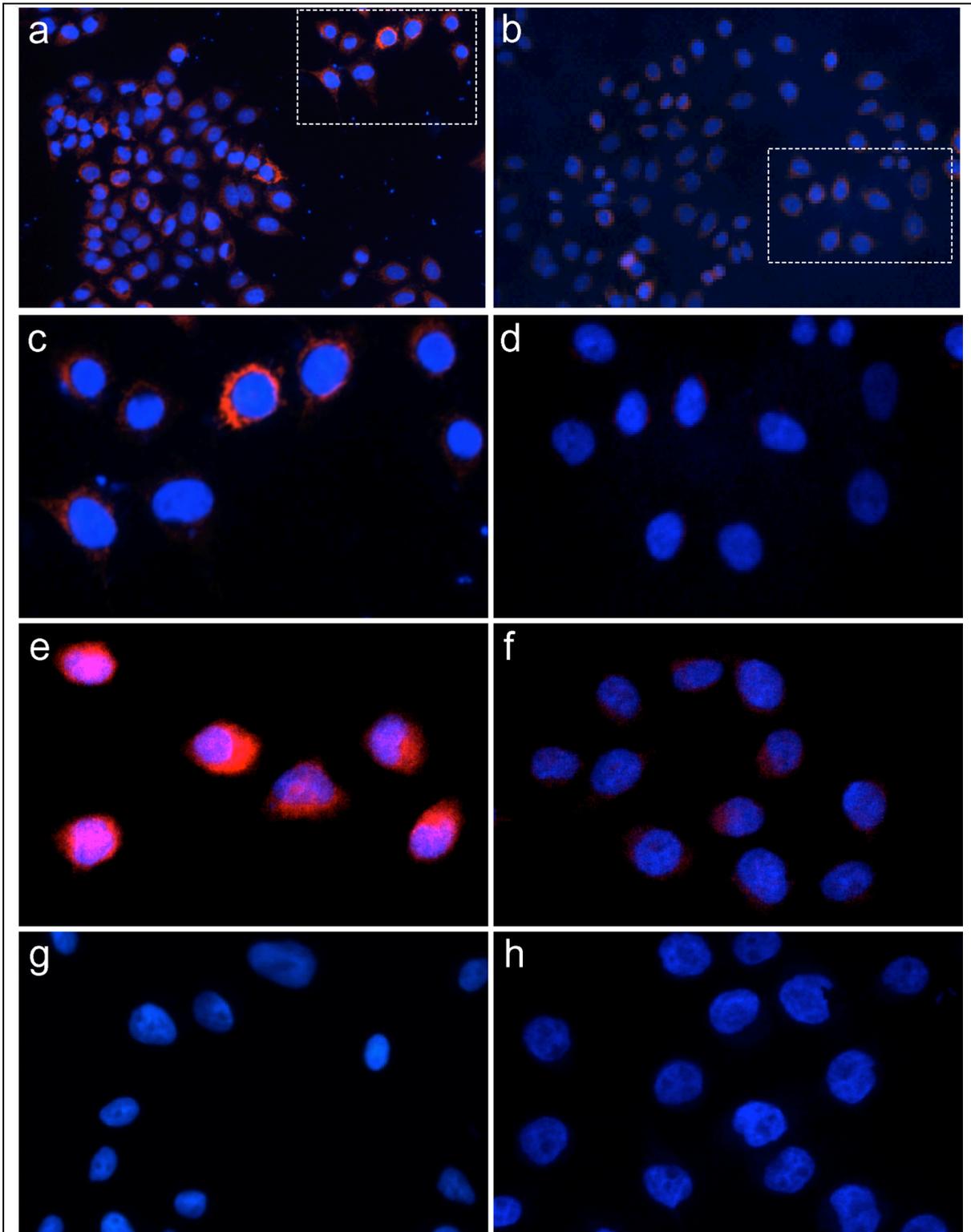
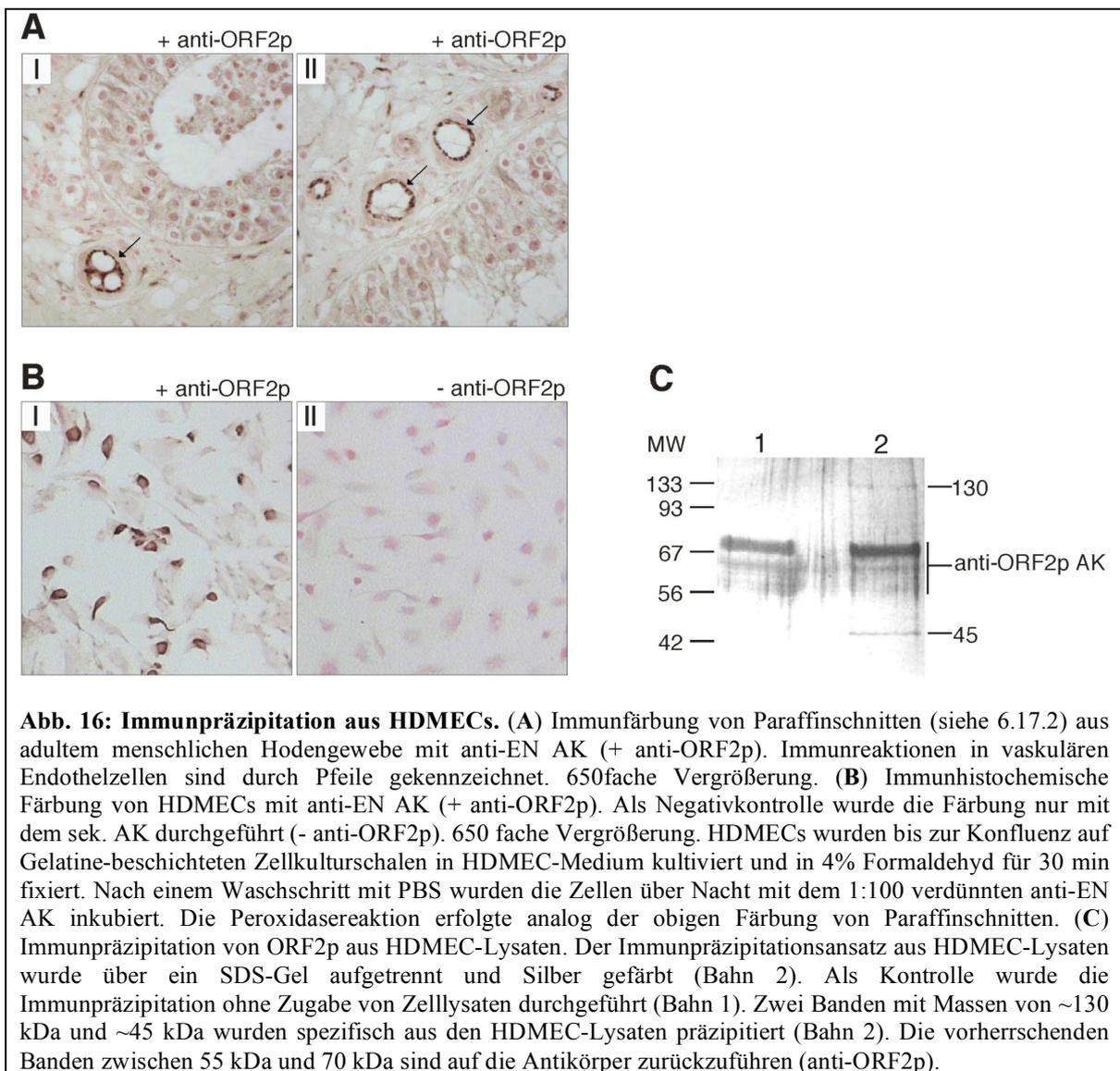


Abb. 15: Nachweis von transient exprimiertem ORF2p im Zytoplasma von HeLa-Zellen mittels Immunfluoreszenz. Die Zellen wurden entweder mit pJM101/L1.RP (Aufnahmen *a*, *c*, *e*, *g*, und *h*) oder mit dem leeren Ursprungsvektor pCEP4 (Aufnahmen *b*, *d* und *f*) transfiziert. Färbung und Fluoreszenzaufnahmen der Präparate wurde 48 h nach der Transfektion (Aufnahmen *a*, *b*, *c*, und *d*) und nach 38 d der Hygromycin-Selektion vorgenommen (Aufnahmen *e*, *f*, *g*, und *h*). Vergrößerungen der Details in den gestrichelten Rahmen sind in den Bildern *c* und *d* zu erkennen. Als Negativkontrollen wurde die Immunfluoreszenzfärbung an pJM101/L1.RP transfizierten HeLa-Zellen mit präabsorbiertem anti-EN Antikörper (Aufnahme *h*) und ohne primären Antikörper (Aufnahme *g*) durchgeführt.

7.1.2.3 Nachweis der Spezifität des anti-EN Antikörpers durch Immunpräzipitation und anschließende MALDI-ToF Analyse

Um zu evaluieren, ob der aufgereinigte anti-EN AK für den Nachweis von nativem L1-ORF2p in immunhistochemischen Experimenten geeignet ist, wurden im Kooperation mit der AG Ergün (Institut für Anatomie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) histologische Gewebeschnitte des menschlichen Hodens mit dem anti-EN AK angefärbt (Abb. 16A). Es war überraschend, dass in allen untersuchten Präparaten eine starke Färbung vaskulärer Endothelzellen nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zur gängigen Lehrmeinung, wonach L1-kodierte Genprodukte nur in der Keimbahn und einigen wenigen somatischen Zelltypen exprimiert werden, die für das Keimepithel spezifisch sind (Branciforte and Martin, 1994; Martin, 1991; Martin and Branciforte, 1993). Da sich vaskuläre Endothelzellen der untersuchten Hodengewebeschnitte mit den Antikörpern anfärben ließen (Abb. 16A), konnte erwartet werden, dass auch in Zellkultur wachsende, vaskuläre Endothelzelllinien, wie z. B. HDMECs (*Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*), L1-ORF2p exprimieren. Um dies zu bestätigen, wurde eine immunzytochemische Färbung von auf Gelatinebeschichteten Deckgläsern wachsenden HDMECs durchgeführt (Abb. 16B). Etwa 30 % der semikonfluenten, primären Zellen wurden durch den anti-EN AK angefärbt (Abb. 16B, Bild I). Die Färbung ist vor allem im Zytoplasma sehr deutlich erkennbar und scheint bei vielen Zellen auch Kern-assoziiert zu sein. Da die ungefärbten Endothelzellen nicht in Kolonien wachsen, sondern verstreut vorliegen, kann man davon ausgehen, dass diese nicht klonal sind. Um zu überprüfen, ob die Färbung in Abb. 16B, Bild I auf den primären AK zurückzuführen ist, wurde im Kontrollexperiment (Abb. 16B, Bild II) der primäre AK durch 1 x PBS ersetzt. Der Vergleich zeigt eindeutig, dass die Färbung in Abb. 16B (Bild I) durch den anti-EN AK hervorgerufen wurde. Da eine Vielzahl der L1-Kopien im humanen Genom jedoch an ihrem 5'-Ende verkürzt ist oder interne Mutationen aufweist, die zu inaktiven und nicht-funktionellen Genprodukten führen, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den in HDMECs nachgewiesenen L1-ORF2 kodierten Proteinen um inaktive Produkte des L1-ORF2p handelt. Um zu evaluieren, welche Proteine vom anti-EN AK in den primären Endothelzellen erkannt werden, sollten aus HDMEC-Gesamtproteinextrakten mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) diejenigen Proteine isoliert und anschließend mittels Massenspektrometrie genauer untersucht werden, an die der anti-EN AK bindet. Gleichzeitig sollte durch dieses Vorgehen die

Spezifität des AK für L1-ORF2p verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden 25mg der Antikörperpräparation "128-2,5" kovalent an CnBr-aktivierte Sepharose gekoppelt (siehe 6.19.2). Diese Immunitätsmatrix wurde auf zwei gleich große Ansätze aufgeteilt. Der eine Ansatz wurde gemäß Abschnitt 6.20 mit dem Proteinextrakt aus 10^6 HDMEC-Zellen (zur Verfügung gestellt von AG Ergün, Institut für Anatomie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) inkubiert und anschließend gewaschen während die andere Hälfte der Immunitätsmatrix als Negativkontrolle diente und nicht mit Proteinextrakt sondern nur mit SP-Puffer inkubiert wurde. Alle anderen Schritte der Aufarbeitung waren in beiden Fällen identisch. Nach dem Waschen wurden die Ansätze mit je 20 μ l Laemmli-Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und gemäß 6.13 über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Silberfärbung des Gels (siehe 6.14.3) sichtbar gemacht.



Bei den mit anti-ORF2p AK gekennzeichneten Proteinbanden (Abb. 16C) mit einem geschätzten Molekulargewichten zwischen etwa 55 - 70 kDa, die sowohl aus dem IP-Experiment ohne Zelllysate (Abb. 16C, Spur 1), als auch aus dem Experiment mit HDMEC-Zelllysate hervorgehen (Abb. 16C, Spur 2), handelt es sich eindeutig um Peptide des anti-EN AK. Zwei weitere Proteine mit Molekulargewichten von ca. 130 kDa und 45 kDa traten ausschließlich als Konsequenz der Immunpräzipitation des HDMEC-Proteinextraktes auf (Abb. 16C, Spur 2). Offensichtlich bindet der anti-EN AK spezifisch an diese beiden HDMEC-Proteine. Zur weiteren massenspektrometrischen Analyse wurden die 130 kDa- und 45 kDa-Banden mit Hilfe eines Skalpell aus dem PAA-Gel ausgeschnitten.

7.1.2.4 Identifizierung der Peptidsequenzen von anti-EN Antikörper immunpräzipitierten, zellulären Proteinen durch MALDI-ToF Analysen

Mit Hilfe der Methode der Matrix-unterstützten Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI) wurden in Kooperation mit Herrn Dr. J. Heukeshoven (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) die AS-Sequenzen der obigen, mit dem anti-EN AK präzipitierten zellulären Proteine identifiziert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 17 dargestellt. Die Spitzen der Intensitätskurven entsprechen spezifischen Peptiden, die aus dem tryptischen Verdau der ca. 130 kDa- bzw. 45 kDa Proteine hervorgegangen sind. Die relative Menge des jeweiligen Peptids wird durch das Integral der Fläche unter der jeweiligen Kurve wiedergegeben. Peptide, die durch den Selbstverdau von Trypsin generiert worden sind, wurden mit einem "T" gekennzeichnet. Mit Hilfe des MASCOT-Suchalgorithmus wurden die für die einzelnen Peptide ermittelten Werte ihrer Massen mit denen von bekannten Peptiden bzw. Proteinen verglichen, die in öffentlich zugänglichen Datenbanken vorliegen. Peptide, die Keratinen zugeordnet werden konnten, sind wahrscheinlich auf Kontamination durch die Experimentatoren während der Probenaufarbeitung zurückzuführen und wurden nicht in die weitere Analyse miteinbezogen. Im Falle des 45 kDa-Proteins konnten fünf der verbleibenden sechs Peptide einem unvollständigem L1-ORF2p eindeutig zugeordnet werden ($p < 0,05$), das durch eine bestimmte genomische L1PA2 Kopie (GenBank Nr. S23650) kodiert wird (Abb. 17B). Diese L1-Kopie wird in NTera2D1 Zellen sehr stark transkribiert (Hohjoh *et al.*, 1990). Die fünf identifizierten Peptide decken etwa 11 % des ORF2p des L1PA2- Elements ab. L1PA2 trägt zwei "Nonsense" Mutationen in der zentralen Region des ORF2 und einige

Deletionen von Einzelnukleotiden. Vergleicht man die Sequenzen der zugeordneten tryptischen Peptide, so stellt man fest, dass nur zwei von ihnen (Peptide # 4 und 5) in ihrer Sequenz mit denen aus ORF2p aktiver Elemente übereinstimmen, während die übrigen drei Peptide (# 1 - 3) Punktmutationen tragen. Die substituierten Aminosäuren sind in Abb. 17A blau hinterlegt.

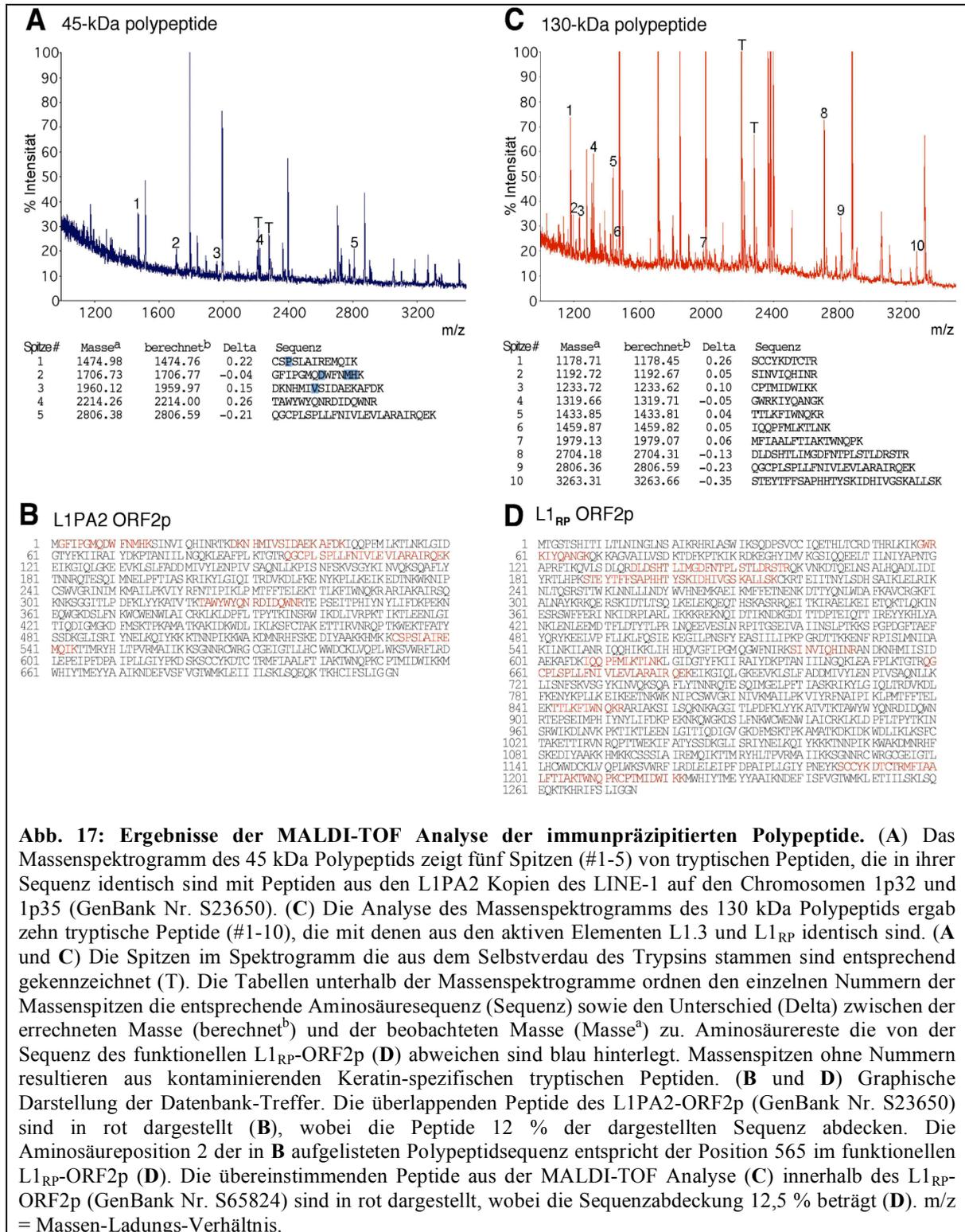


Abb. 17: Ergebnisse der MALDI-TOF Analyse der immunpräzipitierten Polypeptide. (A) Das Massenspektrogramm des 45 kDa Polypeptids zeigt fünf Spitzen (#1-5) von tryptischen Peptiden, die in ihrer Sequenz identisch sind mit Peptiden aus den L1PA2 Kopien des LINE-1 auf den Chromosomen 1p32 und 1p35 (GenBank Nr. S23650). (C) Die Analyse des Massenspektrogramms des 130 kDa Polypeptids ergab zehn tryptische Peptide (#1-10), die mit denen aus den aktiven Elementen L1.3 und L1_{RP} identisch sind. (A und C) Die Spitzen im Spektrogramm die aus dem Selbstverdau des Trypsins stammen sind entsprechend gekennzeichnet (T). Die Tabellen unterhalb der Massenspektrogramme ordnen den einzelnen Nummern der Massenspitzen die entsprechende Aminosäuresequenz (Sequenz) sowie den Unterschied (Delta) zwischen der errechneten Masse (berechnet^b) und der beobachteten Masse (Masse^a) zu. Aminosäurereste die von der Sequenz des funktionellen L1_{RP}-ORF2p (D) abweichen sind blau hinterlegt. Massenspitzen ohne Nummern resultieren aus kontaminierenden Keratin-spezifischen tryptischen Peptiden. (B und D) Graphische Darstellung der Datenbank-Treffer. Die überlappenden Peptide des L1PA2-ORF2p (GenBank Nr. S23650) sind in rot dargestellt (B), wobei die Peptide 12 % der dargestellten Sequenz abdecken. Die Aminosäureposition 2 der in B aufgelisteten Polypeptidsequenz entspricht der Position 565 im funktionellen L1_{RP}-ORF2p (D). Die übereinstimmenden Peptide aus der MALDI-TOF Analyse (C) innerhalb des L1_{RP}-ORF2p (GenBank Nr. S65824) sind in rot dargestellt, wobei die Sequenzabdeckung 12,5 % beträgt (D). m/z = Massen-Ladungs-Verhältnis.

Bei der Suche in der Ensembl Datenbank des menschlichen Genoms (*proteinview*, *contigview* (Hubbard et al., 2002)) konnten anhand dieser Peptide, neben dem vollständigen L1PA2, zwei übereinstimmende Kopien des 5'-verkürzten L1PA2-Elements identifiziert werden. Die beiden Kopien liegen auf Chromosom 1p32 und 1p35 und stimmen mit der Sequenz, die von Hohjoh und seinen Mitarbeitern für das L1PA2-Element veröffentlicht wurde, überein (Hohjoh *et al.*, 1990).

Die Analyse von 10 tryptischen Peptiden des 130 kDa-Proteins ergab, dass deren Massen identisch waren mit denen von Peptiden der ORF2-Proteine von rk-L1-Elementen ($p < 0,05$), zu denen z.B. L1_{RP} gehört (Abb. 17C). L1_{RP}-ORF2 kodiert für ein ca. 150 kDa Protein, das 1275 Aminosäuren umfasst. Die zehn tryptischen Peptide, die wir in unserer MS-Analyse identifizieren konnten, decken etwa 13 % des L1_{RP}-ORF2p ab (Abb. 17D). Diese Peptide stimmen auch überein mit den Genprodukten der acht aktivsten Vertreter aller bisher getesteten menschlichen L1-Elemente und der L1-Konsensussequenz, die aus den 90 rk-Elementen abgeleitet wurde (Brouha *et al.*, 2003). Aufgrund der AS-Sequenzen der identifizierten tryptischen Peptide des ~130 kDa-Proteins, könnte es sich bei diesen um das vollständige ORF2p eines oder mehrerer funktioneller L1-Elemente des menschlichen Genoms handeln.

7.1.3 Expression von endogenen LINE-1 kodierten Proteinen in humanem Gewebe

7.1.3.1 Nachweis der Koexpression von ORF1p und ORF2p im menschlichen Keimbahngewebe mittels Immunhistochemie

Ca. 10^6 Kopien von L1 liegen im menschlichen Genom vor und decken etwa 17% des Genoms ab. Damit ist L1 dasjenige der mobilen genetischen Elemente, das den größten Anteil am menschlichen Genom ausmacht. Folgende Argumente beweisen, dass L1-Retrotransposition in der Keimbahn des Menschen stattfindet: 1) L1-Insertions-Polymorphismen innerhalb der menschlichen Population können nur durch Retrotranspositionereignisse in der Keimbahn hervorgerufen werden (Konkel *et al.*, 2007; Witherspoon *et al.*, 2006); 2). Mehr als 89 unterschiedliche Fälle von genetischen Erkrankungen wurden bereits identifiziert, die durch L1-vermittelte Retrotranspositionereignisse in Keimzellen bzw. im frühen Stadium der Embryonalentwicklung hervorgerufen wurden (Hancks and Kazazian, 2012). Da sich die gleichzeitige Anwesenheit beider funktioneller L1-kodierten Proteine, ORF1p und ORF2p,

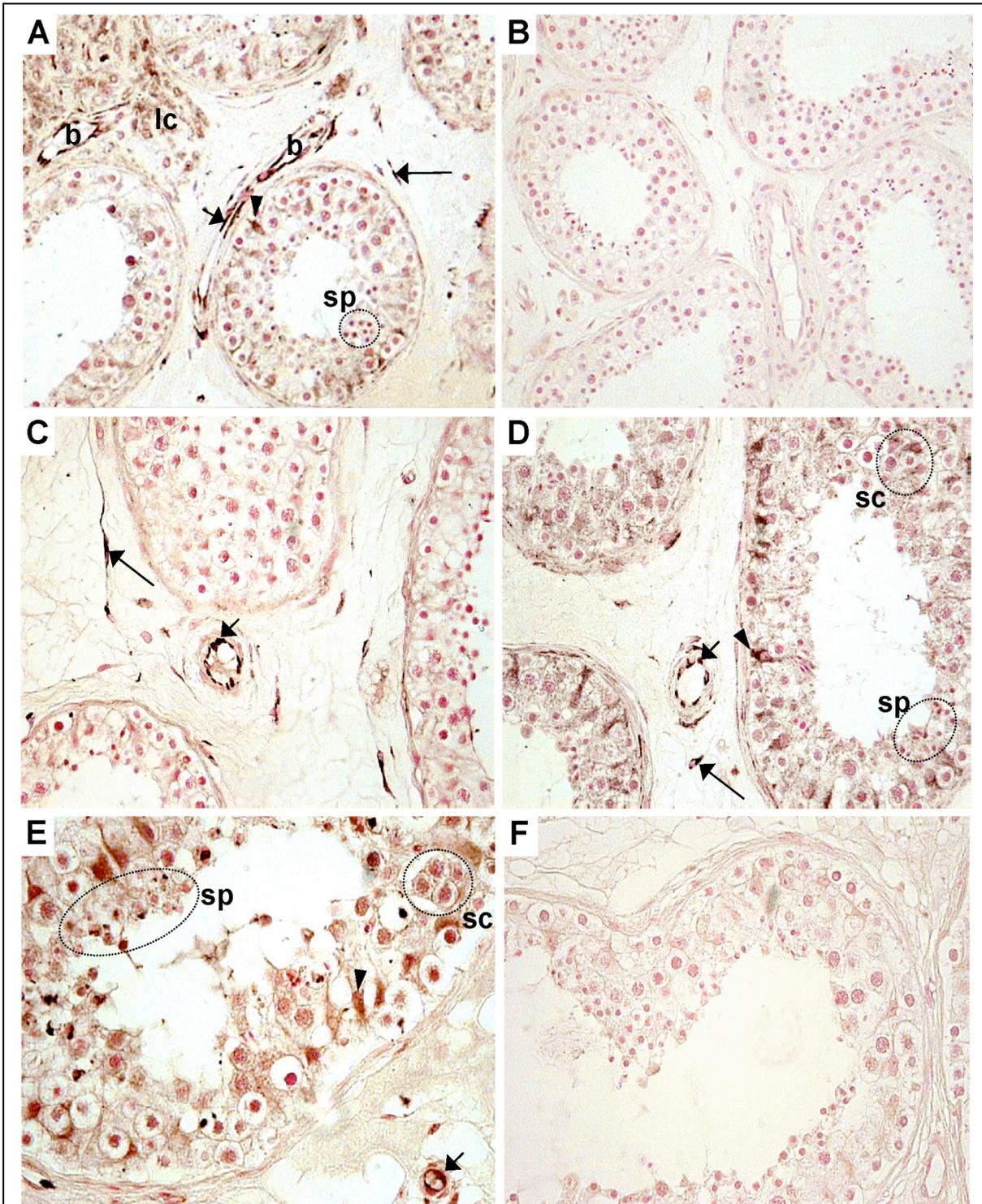


Abb. 18: Immunoperoxidase Nachweis von ORF1 und ORF2 Expression in adultem menschlichen Hodengewebe. (A-D) Immunfärbungen von Paraffinschnitten (siehe 6.17.2) aus adultem menschlichen Hoden mit anti-EN AK. Immunreaktionen wurden beobachtet in Sertolizellen (Pfeilköpfe), Leydigzellen (lc), Endothelzellen (kurze Pfeile) und interstitiellen Zellen (lange Pfeile). Gepunktete Ovale zeigen entweder Gruppen von immungefärbten unreifen Spermatiden mit Residualkörperchen (sp) oder von Spermatozyten II (sc). Blutgefäße sind mit b gekennzeichnet. (B) Die Immunreaktion des anti-EN AK wurde durch Präabsorption mit an Sepharose-Beads immobilisiertem Peptid 1420 blockiert. Die Färbung wurde von der Präabsorption mit an Sepharose-Beads immobilisiertem Peptid 1419 (C) oder nur mit Sepharose-Beads (D) nicht beeinflusst. (E) Immunoperoxidase Nachweis der ORF1 Expression in adultem Hodengewebe mit AH40.1 AK. (F) Als Negativkontrolle wurde die Immunfärbung ohne den primären AH40.1 AK durchgeführt. Vergrößerungsfaktor = 650.

als essentiell für den Vorgang der Retrotransposition erwiesen hat, kann man postulieren, dass beide Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt während der menschlichen Ontogenese innerhalb von Keimzellen sowie während der frühen Embryonalentwicklung vorliegen. Die Expression beider L1-kodierter Proteine wurde sowohl in adultem (Abb. 18), als auch in fötalem Hodengewebe (Abb. 19), dem Ort der männlichen Keimzellentwicklung, untersucht. In Kooperation mit der AG Ergün (Inst. f. Anatomie, UKE) wurden mittels immunhistochemischer Untersuchungen mit dem anti-EN AK sowie dem anti-ORF1p AK "AH40.1" (Leibold *et al.*, 1990) solche Zellen identifiziert, die L1-kodierte Proteine exprimieren.

Innerhalb der *Tubuli seminiferi* zeigten Sertolizellen, einige Spermatozyten II, unreife Spermatiden und Residualkörperchen sowohl mit dem anti-EN AK (Abb. 18A und D) als auch mit dem AH40.1 AK gegen ORF1p (Abb. 18E) eine starke Immunreaktion. In den Spermatogonien an der Basis der *Tubuli seminiferi*, Spermatozyten I, peritubulären Myofibroblasten, vaskulären glatten Muskelzellen und im Interstitium konnte keine Färbung beobachtet werden. Unerwartet wurde auch in einigen somatischen Zelltypen eine starke Immunfärbung identifiziert. In Endothelzellen sowohl von kleinen Kapillaren, als auch größeren Blutgefäße und im Zytoplasma von Leydigzellen, zeigte sich wiederum eine deutliche Immunreaktion mit beiden AK (Abb. 18A, C, D und E). Einige interstitielle Zellen, die *Tubuli seminiferi* und Blutgefäße umschließen konnten zwar mit dem anti-EN AK angefärbt werden (Abb. 18A, C und D), zeigten aber keine Reaktion mit dem AH40.1 AK (Abb. 18E). Nach Inkubation des anti-EN AK mit an Sepharose-Beads immobilisiertem Peptid 1420, konnte keine spezifische Immunfärbung mehr nachgewiesen werden (Abb. 18B). Im Gegensatz dazu blieb die Immunreaktion des anti-EN AK durch Präabsorption mit an Sepharose-Beads immobilisiertem Peptid 1419 (Abb. 18C) oder nur mit Sepharose-Beads (Abb. 18D) unverändert. Dieses Ergebnis zeigt, dass der anti-EN AK hauptsächlich gegen die Epitope des Peptids 1420 gerichtet ist. Außerdem wurden Kontrollschnitte aus derselben Serie entweder nur mit sekundärem AK (Abb. 18F) oder präabsorbiertem AH40.1 AK (Daten nicht gezeigt) behandelt und hierbei zeigte sich keine spezifische Immunfärbung. Zusammengefasst ergibt sich, dass dieselben Zelltypen, welche im adulten menschlichen Hodengewebe mit dem anti-EN AK eine deutliche Immunreaktion zeigen auch mit dem anti-ORF1p AK AH40.1 gefärbt werden konnten.

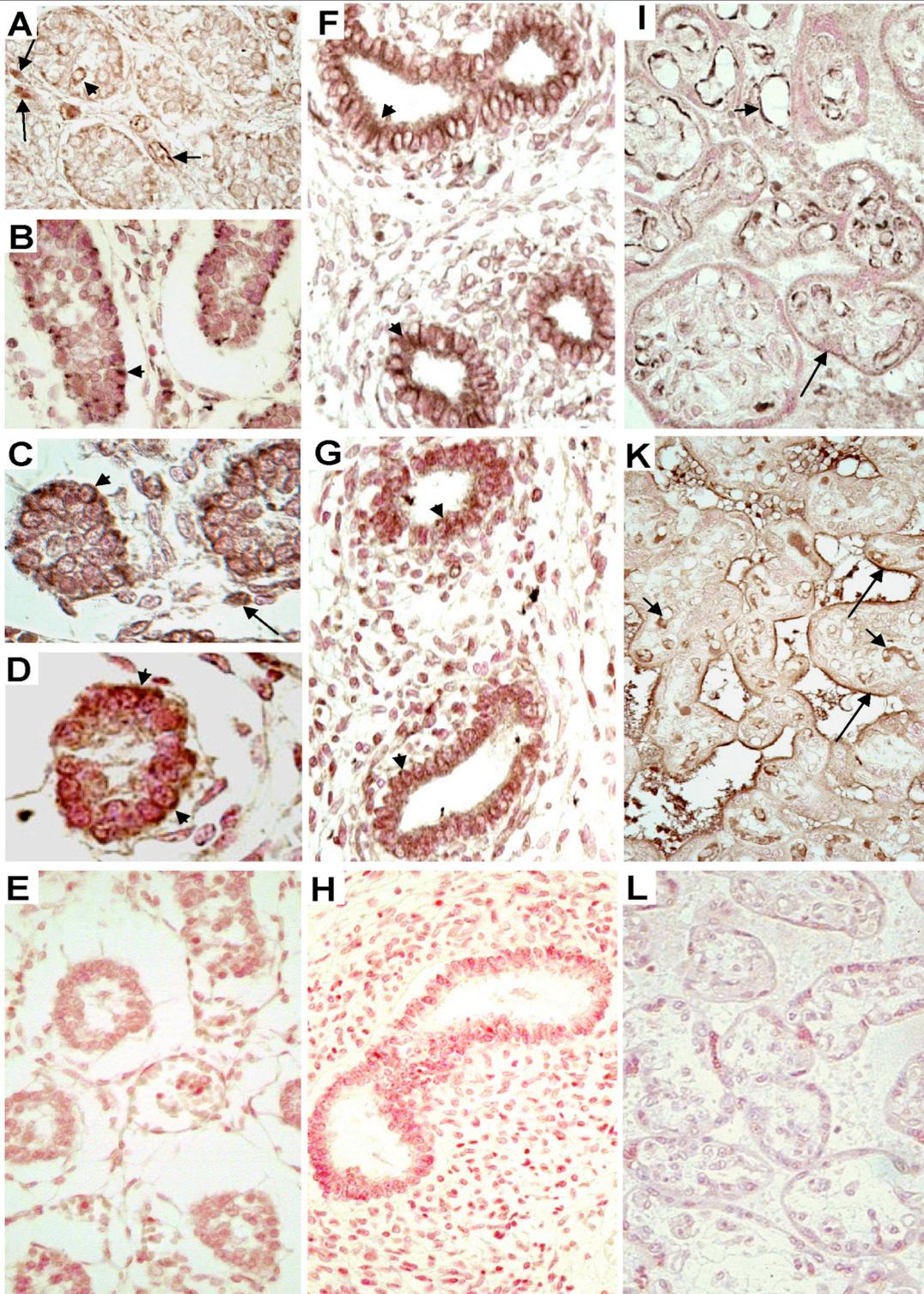


Abb. 19: Immunlokalisierung von ORF1p und ORF2p in fötalem menschlichem Gewebe. Hodengewebe eines 18 Wochen alten Fötus (A) und eines 28 Wochen alten Fötus (B-D), sowie Nebenhoden- (F und G) und Plazenta-Gewebe (I und K) eines 28 Wochen alten Fötus wurden mit anti-EN AK (A-C, F und I) oder AH40.1 AK (D, G und K) gefärbt. Immunreaktionen von ORF1p und ORF2p wurden in Präsertmatogonien (Pfeilköpfe in A-D), fötalen Leydigzellen (lange Pfeile in A und C), vaskulären Endothelzellen (kurze Pfeile in A), im Ephithel des Nebenhodens (Pfeilköpfe in F und G), Synzytiotrophoblasten (lange Pfeile) und vaskulären Endothelzellen (kurze Pfeile) der Plazenta (I und K). Als Kontrollen wurden Immunfärbungen an Serienschnitten von fötalem Hoden (E), fötalem Nebenhoden (H) und Plazentagewebe (L) mit an Sepharose-Beads immobilisierten Peptiden 1419 und 1420 präabsorbiertem anti-EN AK durchgeführt. Vergrößerungsfaktor = 650 (A, B, E-L) und 1000 (C, D).

Um weitere Einblicke in die zelltyp-spezifische und zeitliche Regulation der L1 Expression in der Keimbahn zu erlangen, wurden Paraffinschnitte von 18- und 28-Wochen alten menschlichen Föten untersucht. Hodengewebe der Föten wurde durch Immunperoxidasefärbung (siehe 6.17.2) mit anti-EN AK und AH40.1 AK auf die Expression beider L1 kodierter Proteinen hin analysiert (Abb. 19). Als Negativkontrolle wurden Serienschnitte desselben Gewebes mit dem anti-EN AK angefärbt, nachdem dieser mit den Peptiden 1419/1420 (Abb. 19E) präabsorbiert worden war. Sowohl mit dem anti-EN AK als auch mit dem anti-ORF1p AK AH40.1 konnte eine Immunreaktion im Zytoplasma von Prä spermatogonien, in Leydig-Zellen und in vaskulären Endothelzellen ausgereifter Blutgefäße nachgewiesen werden (Abb. 19A-D). Endothelzellen der kleinen und unreifen Kapillaren ließen sich nicht anfärben. Andere somatische Zelltypen des fötalen Hodens, wie vaskuläre glatte Muskelzellen, peritubuläre Zellen und Zellen des interstitiellen Bindegewebes zeigten weder mit dem anti-EN AK noch mit dem AH40.1 AK eine Immunreaktivität (Abb. 19A-D). Die Inkubation eines Serienschnittes mit dem anti-EN AK, der mit den Peptiden 1419 und 1420 präabsorbiert worden war, diente als Negativkontrolle und führte zu keiner Immunfärbung (Abb. 19E). Alle nachgewiesenen immunreaktiven somatischen Zelltypen des Hodengewebes, zeichnen sich durch den Besitz von Rezeptoren für die Steroidhormone Androgen und/oder Progesteron aus (Ergun *et al.*, 1997). Diese Beobachtung inspirierte mich, auch andere fötale Gewebe zu untersuchen, die Zielzellen für obige Steroide besitzen, wie z. B. Plazenta und Nebenhoden.

7.1.3.2 Nachweis der Koexpression von ORF1p und ORF2p in somatischen fötalen Geweben

Wie im vorhergehenden Kapitel für die Analyse des Hodengewebes beschreiben, wurden jetzt Paraffinschnitte des fötalen Nebenhodens und der Plazenta mit anti-EN- sowie anti-ORF1p- (AH40.1) Antikörpern gefärbt (Abb. 19F, G, I und K). Als Negativkontrolle wurden Serienschnitte beider Gewebe mit anti-EN AK angefärbt, der vorher an den Sepharose-gekoppelten Peptiden 1419 und 1420 präabsorbiert worden war. Diese Versuche zeigten Koexpression von ORF1p und ORF2p in den Epithelzellen des Nebenhodens (Abb. 19F und G) sowie in Synzytiotrophoblasten und vaskulären Endothelzellen der Plazenta (Abb. 19I und K). Tatsächlich besitzt jeder dieser drei Zelltypen Rezeptoren für Androgen oder Progesteron. Mit keinem der beiden L1-

spezifischen Antikörpern konnte eine Immunreaktion in interstitiellem Gewebe, vaskulären glatten Muskelzellen, peritubulären Zellen des Nebenhodens oder in Zytiotrophoblasten der Plazenta nachgewiesen werden (Tab. 2). Serienschnitte, die mit präabsorbiertem anti-EN AK (Abb. 19H und L) bzw. AH40.1 AK (Daten nicht gezeigt) gefärbt wurden zeigten keine Immunreaktion.

analysiertes Gewebe/Zelltyp	Expression ¹ von	
	ORF1p	ORF2p
Hoden		
Erwachsener (40-70 Jahre)		
Spermatogonien	—	—
Spermatozyte I. Ordnung	—	—
Spermatozyte II. Ordnung	+	+
unreife Spermotide mit Residualkörperchen	+	+
Sertolizellen	++	+++
Leydigzellen	++	++
<i>Covering cells</i>	++	++
vaskuläre Endothelzellen	++	+++
Myofibroblasten	—	—
interstitielle Zellen	—	—
vaskuläre glatte Muskelzellen	—	—
Fötus (18/28 Wochen)		
Prä-spermatogonien (primordiale Geschlechtszellen)	+	++
Leydigzellen	+	+
vaskuläre Endothelzellen	+	++
peritubuläre Zellen	—	—
interstitielle Zellen	—	—
vaskuläre glatte Muskelzellen	—	—
Nebenhoden, Fötus (28 Wochen)		
Epithelzellen	+	++
vaskuläre Endothelzellen	+	+
peritubuläre myoide Zellen	—	—
interstitielle Zellen	—	—
vaskuläre glatte Muskelzellen	—	—
Plazenta		
Synzytiotrophoblasten	++	+
vaskuläre Endothelzellen	++	+++
Zytiotrophoblasten	—	—
interstitielle Zellen	—	—
vaskuläre glatte Muskelzellen	—	—

Tab. 2: Gewebe- und Zelltypspezifische Expression von L1-ORF1p und L1-ORF2p.

¹ Gewebeschnitte wurden untersucht auf Expression von L1-ORF1p and L1-ORF2p durch Immunfärbung mit AH40.1 und anti-EN Antikörpern. —, keine nachweisbare Expression; Immunreaktivität wurde unterteilt in: + (detektierbar), ++ (stark) und +++ (sehr stark).

7.1.3.3 Nachweis der Koexpression von ORF1p und ORF2p in somatischem adulten Gewebe

Nachdem die Expression von L1-ORF1p und ORF2p bereits in vaskulären Endothelzellen der Plazenta und Hodengewebe sowie kultivierten, primären Endothelzellen (HDMEC) nachgewiesen werden konnte, sollte L1-Expression nun im Endothel von großen Blutgefäßen näher untersucht werden. Hierzu wurden Paraffinschnitte aus der inneren Brustarterienwand mit dem AH40.1 AK (Abb. 20A) sowie dem anti-EN AK gefärbt (Abb. 20B). Die dargestellten Bildausschnitte zeigen die Arterienwand mit der nahe dem Lumen liegenden *Tunica adventitia* und der weiter außen gelegenen *Tunica media* aus glatten Muskelzellen, welche die Kontraktion der Arterie ermöglichen. Dazwischen befinden sich $CD34^+$ mesenchymale Zellen, die sowohl ORF1p als auch ORF2p exprimieren (Abb. 20A und B). Die Negativkontrolle ohne den primären anti-EN AK zeigte keine erkennbare Immunreaktion (Abb. 20C). Beim $CD34$ -Molekül handelt es sich um ein stark negativ geladenes Proteoglykan der Muzinfamilie. Es ist ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 105 bis 120 kDa, wobei das Durchschnittsgewicht bei etwa 116 kDa liegt. Exprimiert wird $CD34$ hauptsächlich in hämatopoetischen Stammzellen, verschiedenen embryonalen Geweben und einigen Endothelien und spielt vermutlich eine Rolle bei der Inhibierung der Zelldifferenzierung und bei der Zell-Zell Adhesion. Da $CD34$ -Expression demnach stark mit dem Differenzierungsgrad korreliert und vor allem in Vorläuferzellen und Stammzellen beobachtet wird, stützt der Nachweis der Koexpression von beiden L1-kodierten Proteinen in $CD34^+$ Zellen die Hypothese, dass die L1-Retrotransposition mit dem Differenzierungsgrad der Zelle verknüpft ist, um die Verbreitung durch Retrotransposition in Keimzellen zu erreichen aber in den ausdifferenzierten, somatischen Zellen möglichst zu unterbinden.

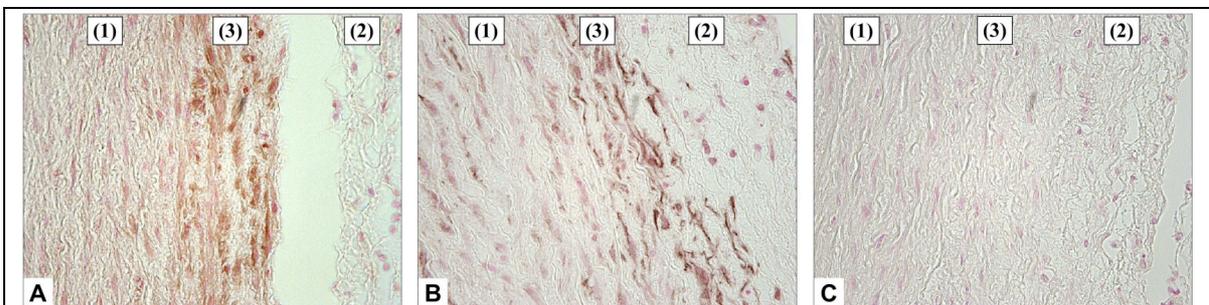


Abb. 20: Immunoperoxidase Nachweis von ORF1 und ORF2 Expression in $CD34^+$ mesenchymalen Zellen der inneren Brustarterie. (A) Immunfärbungen von Paraffinschnitten (siehe 6.17.2) der Wand der inneren Brustarterie mit dem AH40.1 AK, (B) Immunoperoxidase Nachweis mit anti-EN AK, (C) Als Negativkontrolle wurde die Immunfärbung ohne den primären anti-EN AK durchgeführt. (1) *Tunica media* (glatter Muskel), (2) *Tunica adventitia*, (3) mesenchymale Zellen ($CD34^+$).

7.1.4 Intrazelluläre Lokalisation von ORF1p und ORF2p

Verschiedene Beobachtungen haben ergeben, dass sich bereits im Zytoplasma der Wirtszelle ein RNP-Komplex bildet, in dem sich L1-RNA und L1-Proteine bereits zu einer Vorstufe des Präintegrationskomplexes vereinen, welcher die L1-Retrotransposition im Kern initiiert (Hohjoh and Singer, 1996). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass sowohl ORF1p als auch ORF2p im RNP-Komplex mit der L1-RNA *in-cis* assoziiert sind, wobei ORF1p möglicherweise eine besondere Rolle bei der richtigen Positionierung von ORF2p vor der Initiierung der RT-Reaktion spielt (Kulpa and Moran, 2005; Kulpa and Moran, 2006). Ungeklärt ist jedoch weiterhin wie und wo die RNP-Partikel gebildet werden und ob ORF1p und ORF2p zu irgendeinem Zeitpunkt getrennt voneinander in der Zelle vorliegen. Insbesondere für den zweiten Teil der vorliegenden Dissertation ist die Frage von Bedeutung, ob die L1-Proteine/RNP-Partikel an besondere Strukturen in der Zelle gebunden oder mit zellulären Proteinen assoziiert sind.

Um diese Fragen zu beantworten wurden ORF1p- (siehe 7.1.1) und ORF2p-spezifische AK (siehe 7.1.2) für die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der beiden L1-kodierten Proteine herangezogen. Die Lokalisation der Proteine sollte in der embryonalen Keimzelltumor-Zelllinie 2102Ep (Andrews *et al.*, 1984) bestimmt werden, da die ersten RNP-Komplexe aus dieser Zelllinie isoliert werden konnten (Hohjoh and Singer, 1996) und sich diese Zellen durch außergewöhnlich große Mengen an endogenem ORF1p auszeichnen. Da 2102Ep-Zellen als Modellsystem für männliche Keimzellen angesehen werden (Andrews *et al.*, 1980; Andrews *et al.*, 1984), und ich im Rahmen dieser Dissertation bereits ORF1p-Expression in männlichen Keimzellen nachweisen konnte (siehe Kapitel 7.1.3.1), schien die 2102Ep-Zelllinie sehr gut geeignet, um die intrazelluläre Lokalisation endogen exprimierter ORF1- und ORF2-Proteine zu untersuchen.

2102Ep-Zellen wurden auf Deckgläsern fixiert und mit anti-ORF1p-, anti-EN- und anti-Lap2- AK gefärbt (siehe 6.16.2). Bei Lap2 handelt es sich um hydrophiles Protein, das für das Anheften der nukleären Lamina an die innere Kernmembran sorgt. In Immunfluoreszenzexperimenten nutzt man diese Eigenschaft um die Umriss des Zellkern sichtbar zu machen. Durch die Färbung der nukleären Lamina lässt sich eine zytoplasmatische Lokalisation deutlich von einer nukleären Lokalisation unterscheiden.

Die gefärbten Präparate der 2102Ep-Zellen wurden mit dem Laser Scan Mikroskop (LSM) untersucht. Mit der LSM 5-Software wurde eine Projektion, des mit dem LSM aufgenommenen z-Stapels angefertigt, d. h. die aufgenommen Ebenen wurden miteinander

verrechnet um daraus ein dreidimensionales Bild zu generieren. Sowohl ORF1p (Abb. 21b und e) als auch ORF2p (Abb. 21a und d) präsentieren sich in den embryonalen Karzinom-Zellen in ausgeprägt granulären Strukturen, was auf eine Konzentration der Proteine in größeren Aggregaten hindeutet. Die Überlagerung der Immunfluoreszenzen von ORF1p und ORF2p (Abb. 21f) zeigt durch eine orangene Färbung die überlappende Lokalisation der beiden L1-Proteine sowohl im Kern als auch im Zytoplasma an. Im Vergleich mit der Zellkern-spezifischen Lap2-Färbung wird deutlich, dass die Immunfluoreszenz, die durch L1-Proteine hervorgerufen wird zwar auch im Zytoplasma der Zellen deutlich zu erkennen ist, sich aber überwiegend im Zellkern manifestiert (Abb. 21c - f). Dies steht im Gegensatz zu bisherigen Beobachtungen (Goodier *et al.*, 2004), wonach ORF1p hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist und wurde durch weiterführende Versuche unserer Arbeitsgruppe zur nukleären Lokalisation von ORF1p bestätigt (Kirilyuk *et al.*, 2008).

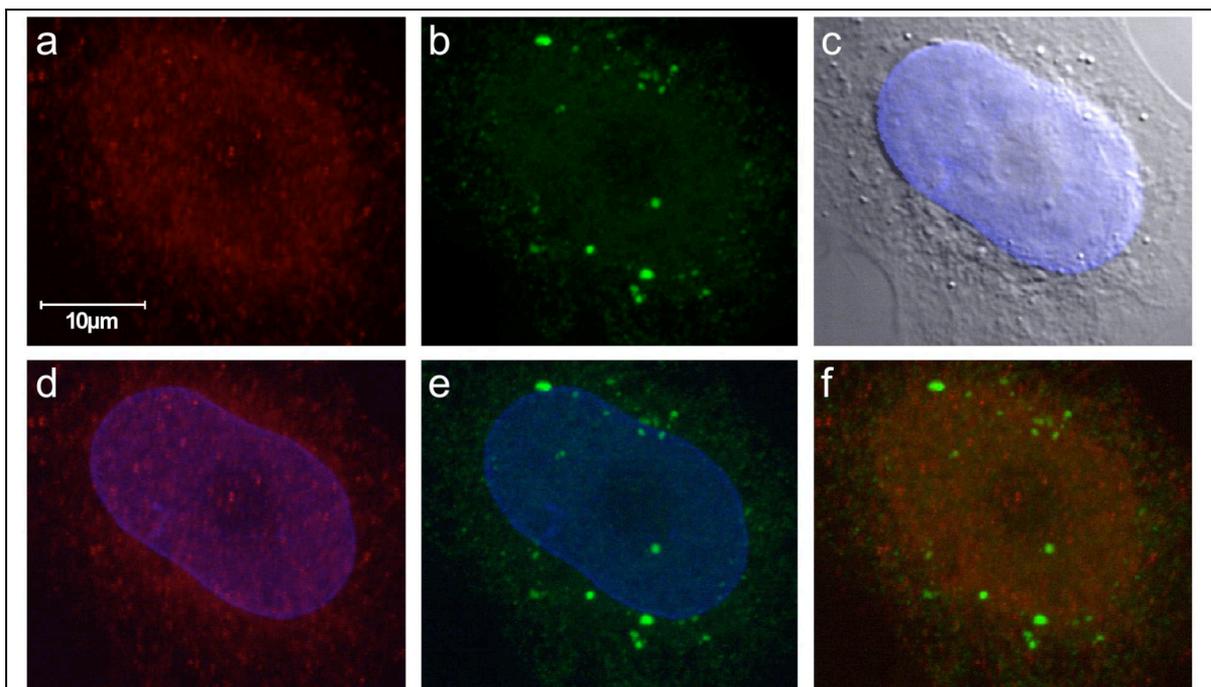


Abb. 21: Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von endogenem ORF1p und ORF2p in 2102Ep-Zellen mittels Immunfluoreszenz. 2102Ep-Zellen wurden mit folgenden Antikörpern (AK) parallel markiert: anti-ORF1p AK (Verdünnung 1:500)/ Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG (Verdünnung 1:200); anti-EN AK (Verdünnung 1:15)/ Cy3 markierter anti-Huhn AK (Verdünnung 1:200); anti-Lap2 AK (Verdünnung 1:200)/ Cy5 markierter anti-Maus AK (Verdünnung 1:200). Objektiv: Plan-Apochromat 63 x/ 1,4 Öl, DIC. In den Einzelkanal-Auswertungen zeigt sich die ORF2p spezifische Färbung (Aufnahme a) und die ORF1p spezifische Färbung (Aufnahme b), sowie die Überlagerung dieser beiden Kanäle (Aufnahme f) und die Lap2 spezifische Färbung überlagert mit einer Phasenkontrastaufnahme der Zellen (Aufnahme c), mit der ORF2p spezifischen Färbung (Aufnahme d) und der ORF1p spezifischen Färbung (Aufnahme e).

Zusammenfassend konnte die Kolo­kalisierung von endogenem ORF1p und ORF2p mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern von 2102Ep-Zellen nachgewiesen werden.

7.2 Identifizierung von wirtskodierten Interaktionspartnern des LINE-1 Replikationsapparates

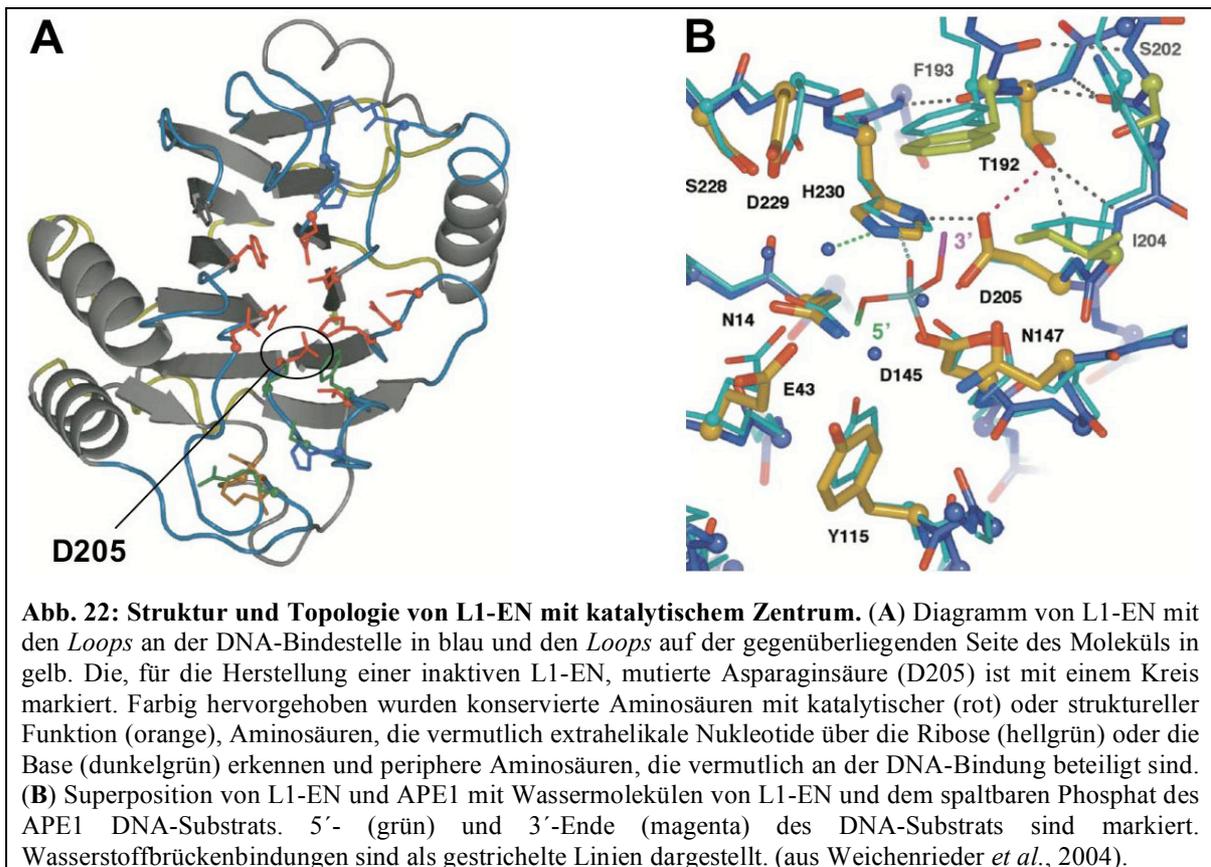
Es existieren eine Reihe von Argumenten, die für eine Beteiligung wirtzell-kodierter Proteine an der L1-Retrotransposition sprechen. Bereits im Jahre 1996 wurde geschlussfolgert, dass der Aufbau der L1-RNPs höchstwahrscheinlich die Beteiligung von Wirtsproteinen erfordert (Hohjoh and Singer, 1996). *In-vitro* TPRT Reaktionen, die nach Zugabe von L1-ORF2p, L1-RNA und einem geeigneten DNA-Substrat durchgeführt wurden, waren überraschend ineffizient und kaum nachweisbar, da vermutlich wichtige Kofaktoren für die TPRT fehlten (Cost *et al.*, 2002). Im L1-Retrotranspositionstest verwendete (siehe 6.1.1.13), markierte L1-Elemente, retrotransponieren effizient in das Genome von HeLa-Zellen (Moran *et al.*, 1996; Ostertag *et al.*, 2000), nicht jedoch in das Genom von vielen anderen getesteten menschlichen Zelllinien. Dies führt zu der Vermutung, das HeLa-Zellen Wirtsfaktoren für die L1-Retrotransposition zur Verfügung stellen, die essentiell für einen effizienten Replikationsprozess sind.

7.2.1 Herstellung von "bait"-Konstrukten für Hefe 2-Hybrid Analysen

Zur Identifizierung von Wirtsproteinen, die mit Komponenten der L1-Retrotranspositions­maschinerie interagieren und möglicherweise die Aktivität oder Zielspezifität von L1 beeinflussen, sollten einzelne funktionelle Domänen und der L1-ORF1 in Hefe 2-Hybrid Analysen überexprimiert werden. Von besonderem Interesse war hierbei L1-EN, welche eine zentrale Rolle im TPRT-Modell spielt und daher am ehesten eine Interaktion mit Wirtsproteinen erfolgreich vermitteln kann.

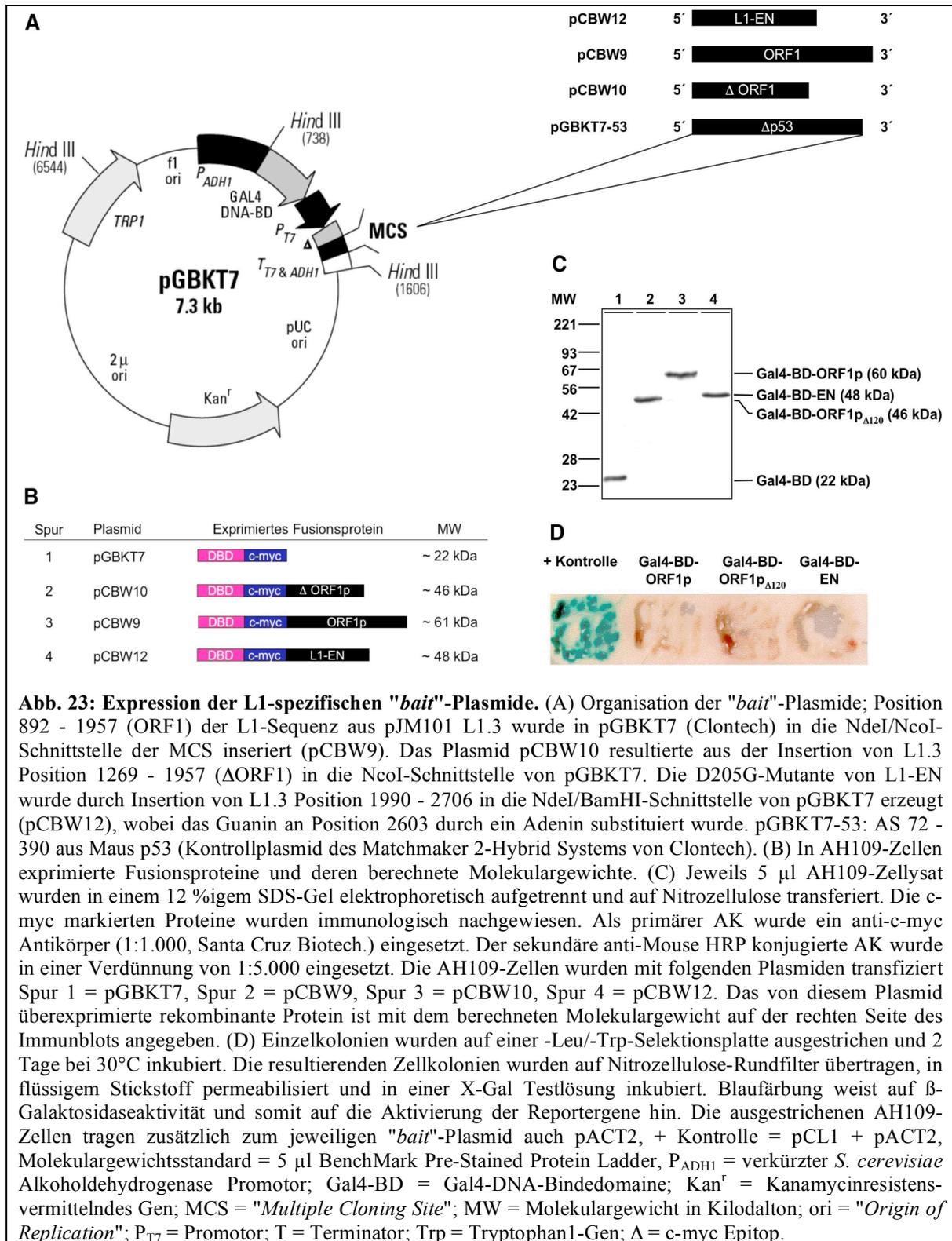
Da sich die Expression der aktiven L1-Endonuklease als toxisch für *S. cerevisiae* erwiesen hat, wurde für die Expression des „bait“-Proteins eine enzymatische inaktive EN-Mutante mit einer AS-Substitution D205G im katalytischen Zentrum herangezogen (Feng *et al.*, 1996). Abbildung 22 zeigt die zentrale Position von D205 in der DNA-Bindestelle von L1-EN, das eine Wasserstoffbrückenbindung zu H230 ausbildet und so den pK_a -Wert von

H230 auf das für die DNA-Spaltung erforderliche Niveau hebt (Repanas *et al.*, 2007; Weichenrieder *et al.*, 2004).



Die für die inaktive EN_{D205G}-Domäne kodierende DNA (Feng *et al.*, 1996) wurde freundlicherweise vom Boeke Labor (Johns Hopkins University) zur Verfügung gestellt und über eine präparative PCR (siehe 6.8.1) unter Verwendung der Mutagenese-Primer GS 51 und GS 52 amplifiziert. Primer GS 51 bindet an Nt 1 - 26 des ORF1 und fügt eine 5' NdeI-Restriktionsschnittstelle ein während GS 52 die Nt 717-694 des OFR1 bindet und hierbei ein 3' gelegenes Stoppkodon und eine BamHI-Schnittstelle einfügt. Das resultierende PCR-Produkt wurde entsprechend der Herstelleranleitung in den TA-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) ligiert. Das resultierende Plasmid wurde als pCBW1 bezeichnet. Der für EN kodierende Bereich wurde über einen BdeI/BamHI-Doppelverdau von pCBW1 präpariert und in den mit NdeI und BamHI verdauten „*bait*“-Vektor pGBKT7 (BD Clontech) inseriert. Das resultierende Hefe-Expressionsplasmid pCBW12 beinhaltet das *TRP1*-Reportergen für Selektion in Hefestämmen und vermittelt eine Kanamycin-Resistenz für die Selektion in Bakterien (Abb. 23A). Das EN-Gen wurde an seinem 5'-Ende mit einer Erkennungssequenz für den anti-c-myc Antikörper sowie mit der DNA-Bindedomäne des Gal4-Gens fusioniert. Der ADH1-Promotor kontrolliert die

Expression der gesamten Kasette in *S. cerevisiae* (Abb. 23A und B). L1-Sequenzen in den pGBKT7-Derivaten wurden durch analytischen Restriktionsverdau und Sequenzanalysen überprüft.



Für die Klonierung des vollständigen L1-ORF1 bzw. des 5'-verkürzten ORF1_{Δ120} wurden präparative PCR mit den Oligonukleotiden GS 9 und GS 10 bzw. GS 11 und GS 10 (ORF1_{Δ120}) unter Verwendung von pJM101 L1.3 (Vektorkarte siehe Anhang) als Matrize durchgeführt. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden in den Vektor pCR 2.1 kloniert, was zu den Plasmiden pCBW6 und pCBW2 führte. Anschließend wurden die unterschiedlichen ORF1-Fragmente in den "bait"-Vektor pGBKT7 umklontiert (Abb. 23A). Die resultierenden Plasmide pCBW9 und pCBW10 erlauben in Hefe die Expression des myc-markierten vollständigen L1-ORF1p als N-terminales Fusionsprotein mit der Gal4-BD bzw. des um die ersten 120 Aminosäuren verkürzten ORF1p als Fusion mit Gal4-BD (Abb. 23A und B). Die Expression der Fusionsproteine wurde mittels Immunblotanalysen verifiziert (Abb. 23C). Zu diesem Zweck wurden Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes AH109 (BD-Clontech) mit den Plasmiden pGBKT7, pCBW9, pCBW10 und pCBW12 transformiert (siehe 6.21.4), und die Transformanten für die Herstellung von denaturierten Proteinextrakten durch alkalische Lyse (siehe 6.22.2) eingesetzt. Diese wurden nach SDS-PAGE auf Nitrozellulose transferiert und mit anti-c-myc Antikörpern auf Anwesenheit der unterschiedlichen Gal4-BD Fusionsproteine untersucht (Abb. 23C). Die im SDS-PAGE ermittelten Molekulargewichte der vier unterschiedlichen Fusionsproteine entsprechen den berechneten Werten von ca. 22 kDa für die Gal4-BD (Proteinprodukt des Vektors pGBKT7), ca. 46 kDa für das Gal4-BD Fusionsprotein mit verkürzten L1-ORF1p (Proteinprodukt des Vektors pCBW9), ca. 60 kDa für Gal4-BD-ORF1p (Proteinprodukt des Vektors pCBW10) und etwa 48 kDa für das Fusionsprotein mit L1-EN (Proteinprodukt des Vektors pCBW12) recht genau. Die Mengen der exprimierten Fusionsproteine (pCBW9, -10, 12) in den jeweiligen Zellysaten unterschieden sich nicht von der Gal4-BD-Proteinmenge in pGBKT7-transfizierten Hefezellen (Abb. 23C, Spuren 1-4). Daher kann man davon ausgehen, dass sich keines der drei Fusionsproteine durch mögliche toxische Effekte auszeichnet, die mit den 2-Hybrid-Analysen interferieren könnten.

Für die 2-Hybrid Studien im *S. cerevisiae*-Stamm AH109 wurde in der vorliegenden Arbeit das Matchmaker 2-Hybrid System 3 (BD Clontech) verwendet. Dieses System nutzt die, durch die Trennung der DNA-Binde- und der Aktivierungsdomäne des GAL4-Proteins verursachte, Inaktivierung des Transkriptionsfaktors aus. Erst eine mögliche Interaktion zwischen einem Genbank-Protein und dem "Köder"-Protein (*bait*) bringt die DNA-Binde- und die Aktivierungsdomäne des GAL4-Proteins wieder in räumliche Nähe zu einander. So entsteht wieder eine funktionsfähige Einheit und die 3'-gelegenen Reportergene werden transkribiert (Abb. 24A). Im Matchmaker System 3 wird durch die Verwendung der

unterschiedlichen Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ*, die unter der Kontrolle der drei unabhängigen GAL4-5'-Aktivierungssequenzen und TATA-Boxen GAL1, GAL2 und MEL1 stehen (Abb. 24B), die Anzahl von falsch positiven Resultaten im Vergleich zu anderen Systemen drastisch reduziert (Literatur zur Abb.: (James *et al.*, 1996)). Bei der Durchführung von 2-Hybrid Studien muss nämlich berücksichtigt werden, dass manche "bait"-Proteine die Fähigkeit besitzen, die Transkription der Reportergene (Abb. 24B) ohne Interaktion mit einem GAL4-AD Fusionsprotein zu aktivieren. Besonders häufig wird dieses intrinsische Aktivierungspotential bei Nukleinsäure-bindenden Proteinen beobachtet, zu denen auch L1-ORF1p gehört (Hohjoh and Singer, 1997; Kolosha and Martin, 1997). Um die von mir hergestellten "bait"-Konstrukte auf ihr intrinsisches Potential zur Aktivierung der Reportergenexpression zu testen, wurde ein X-Gal Filtertest (siehe 6.23) durchgeführt (Abb. 23D). Zu diesem Zweck wurden AH109-Zellen mit jeweils einem der Plasmide pCBW9, pCBW10, pCBW12 oder pCL1 und pACT2 kotransformiert (siehe 6.21.4) und auf Minimalmedium-Platten (-Leu/-Trp) auf Anwesenheit beider Plasmide selektioniert. pCL1 ist ein Plasmid, das als Positivkontrolle, bei auf Gal4-basierenden, Hefe 2-Hybrid Systemen dient, und das vollständige, wildtyp Gal4-Protein kodiert (Fields and Song, 1989). Von den Doppeltransformanden wurde je eine Einzelkolonie frisch ausplattiert und für einen X-Gal-Filtertest eingesetzt (siehe 6.23). Die starke Blaufärbung der mit dem Kontrollplasmid transfizierten Hefezellen weist auf eine Aktivierung des β -Galaktosidase Reportergens hin (Abb. 23D). Im Gegensatz dazu zeigen die mit pACT2 und den "bait"-Konstrukten pCBW9, pCBW10 oder pCBW12 kotransfizierten Zellen die für den Hefestamm AH109 typische Rotfärbung. Dieses Ergebnis zeigt, dass keines der drei untersuchten Gal4-Fusionsproteine alleine in der Lage ist, die Transkription der Reportergene zu aktivieren, die unter der Kontrolle des Gal4-RE (*Gal4 responsive element*) stehen (Abb. 23D). Somit sind alle drei hergestellten "bait"-Konstrukte für Analyse von Protein-Protein Interaktionen im Hefe 2-Hybrid System geeignet.

7.2.2 Amplifizieren einer Hoden cDNA-Genbank

Mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems sollte die Gesamtheit aller Proteine, die von einer cDNA-Bibliothek kodiert werden, nach Protein-Protein Interaktion mit dem, durch das "bait"-Plasmid pCBW12 kodierte Köderprotein durchsucht werden (Abb. 24C).

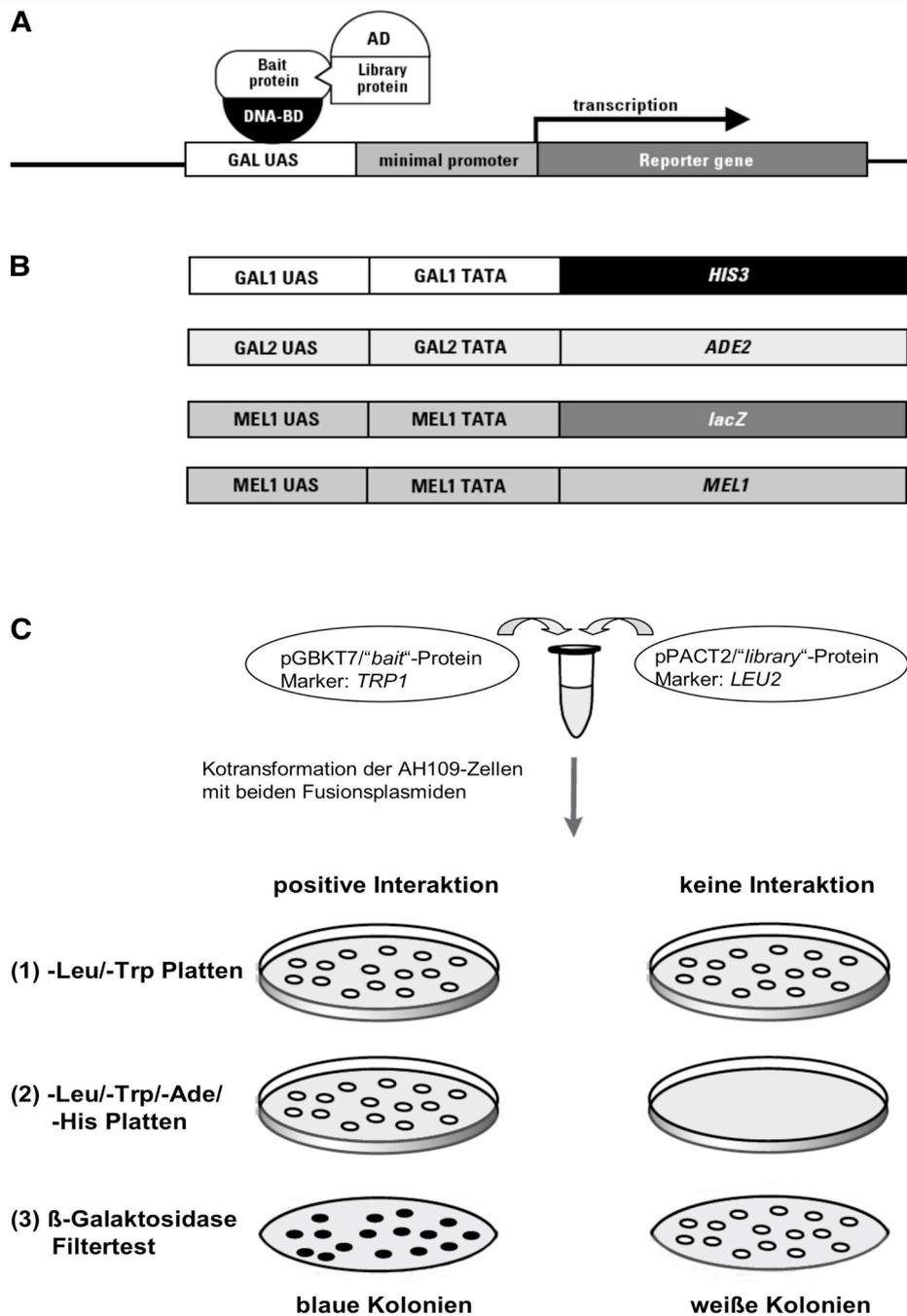


Abb. 24: Das Matchmaker 2-Hybrid System 3. Das Prinzip einer 2-Hybrid Analyse (A). Die DNA-BD umfasst die Aminosäurereste 1-147 des GAL4-Proteins und bindet an die 5' der Reportergene gelegene GAL UAS. Die AD mit den Aminosäureresten 768-881 des GAL4-Proteins aktiviert nach der Bindung des "library"-Proteins an das "bait"-Protein die Transkription der Reportergene.

Die Reporterstrukturen des Hefestammes AH109 (B). AH109 stammt von PJ69-2A ab und beinhaltet die Marker *ADE2* und *HIS3* (James *et al.*, 1996). *MEL1* ist ein endogenes GAL4-abhängiges Gen. Das *lacZ*-Reportergen wurde in PJ69-2A inseriert um den Stamm AH109 zu erzeugen. (A. Holtz, noch nicht publiziert). Die *HIS3*-, *ADE2*- und *MEL1/lacZ*-Reportergene sind jeweils unter der Kontrolle der heterologen GAL4-abhängigen UAS und Promotoren - GAL1, GAL2 und MEL1. (C) Flussdiagramm zur Durchführung einer 2-Hybrid Studie zum Test der Proteininteraktion zweier Proteine. Nach Kotransformation der AH109-Zellen mit "library"- und "bait"-Plasmiden lassen sich in Schritt (1) Doppeltransformatanten selektionieren. In Schritt (2) werden potentielle Interaktionspartner des "bait"-Proteins nach Aktivierung der Reportergene auf den -Leu/-Trp/-Ade/-His Selektionsplatten isoliert. Die Bestätigung der Interaktion erfolgt in Schritt (3) mit dem Galaktosidasetest durch ein weiteres unabhängiges Reportergen (*MEL1* oder *lacZ*). AD = Gal4-DNA-Aktivator-domäne, DNA-BD = Gal4-DNA-Bindungsdomäne, UAS = 5'-Aktivierungssequenz.

Nach Möglichkeit sollte die cDNA-Bibliothek aus einem Gewebe stammen, in welchem das L1-Köderprotein bekanntermaßen exprimiert wird, da davon ausgegangen wurde, dass eventuelle Interaktionspartner in denselben Gewebetypen exprimiert werden wie ihr Bindungspartner. Im Kapiteln 7.1.3.1 der vorliegenden Dissertation konnte bereits nachgewiesen werden, dass sowohl L1-ORF1p als auch L1-ORF2p im menschlichen Hodengewebe exprimiert wird. Da Retrotransposition funktioneller, endogener L1-Elemente in der männlichen Keimbahn stattfindet (Ostertag and Kazazian, 2001a), müssen neben den L1-kodierten essentiellen Proteinen, auch vom Wirt kodierte und für die Transposition benötigte Proteine, zu irgendeinem Zeitpunkt im Hodengewebe exprimiert werden. Um solche Wirtsproteine zu identifizieren, die mit L1-kodierten Proteinen interagieren, sollte die kommerziell erworbene Matchmaker cDNA-Genbank mit der Katalognummer HL4035AH Lot-Nummer 9030154 (BD Clontech) mittels 2-Hybrid Analysen getestet werden. Zur Herstellung der Genbank wurde vom Hersteller RNA aus dem Hodengewebe von 11 Männern im Alter von 11 - 61 Jahren isoliert und cDNA synthetisiert. Die resultierenden cDNA-Fragmente wurden dann in den Genbank-Vektor pACT2 (Vektorkarte siehe Anhang) kloniert. Die so hergestellte cDNA-Genbank, bestehend aus einer Vielzahl von Expressionsplasmiden, wurde in Bakterien des Stammes DH5 α transformiert. Um die Genbank zu amplifizieren, wurden die mit der Genbank transformierten Bakterien in einem Verhältnis von 1:1000 in LB-Medium verdünnt. Jeweils 400 μ l dieses Ansatzes wurden auf insgesamt 500 LB-Amp Platten (Durchmesser 150mm) ausplattiert. Etwa 10⁷ Bakterienkolonien wurden von den 500 Platten vollständig in LB-Medium suspendiert und mittels Zentrifugation pelletiert. Die cDNA-Genbank wurde mit 3,5 x 10⁶ unabhängigen Klonen geliefert (laut Produktbeschreibung von BD-Clontech). Entsprechend dem "*Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual*" sollen 2 - 3 Mal soviel Kolonien bei der Amplifikation der Genbank isoliert werden, wie ursprünglich vorhanden, um statistisch nahezu alle cDNA-Klone amplifizieren zu können. Von den 3,5 x 10⁶ gelieferten Klonen in der Genbank ausgehend, ist die Amplifikation mit 10⁷ resultierenden Kolonien somit erfolgreich durchgeführt worden. Durch eine Plasmid-Präparation mittels Qiagen-tip 10000 Säulen konnten aus den geernteten Bakterien insg. 8 mg Plasmid-DNA isoliert werden. Als Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliothek wurde die Länge und Variationsbreite der cDNA-Fragmente jeweils vor und nach der Amplifikation mittels PCR analysiert. Zu diesem Zweck wurden 20 zufällig ausgewählte Bakterienkolonien (*E. coli* BNN132) aus der ursprünglich erworbenen

cDNA-Genbank mit 20 weiteren Kolonien aus der selbst hergestellten, amplifizierten cDNA-Genbank verglichen. Mit diesen Kolonien wurden 2 ml Übernachtskulturen angeimpft, die für eine Plasmid-Minipräparation nach der STET-Methode eingesetzt wurden (siehe 6.2.1). Je 0,5 µl der resultierenden Plasmid-DNA Präparationen wurden für eine analytische PCR mit den Primern GS 6 und GS 7 eingesetzt (siehe 6.8.2), welche die MCS von pACT2 flankieren, wobei der leere Genbank-Vektor pACT2 als Referenz diente. Nach der Trennung über ein analytisches Agarosegel wurde die Größe der amplifizierten cDNA-Inserts durch Vergleich mit dem Größenstandard ermittelt. Vor der Amplifikation der cDNA-Bibliothek variierte die Länge der cDNA-Inserts zwischen 50 bp und 1500 bp mit einem arithmetischen Mittel von etwa 700 bp. Nach Amplifikation der Genbank umfassten die Insertlängen zwischen 0 bp und 2000 bp, wobei der Mittelwert ebenfalls bei ca. 700 bp lag. Durch die PCR-Analyse der cDNA-Bibliothek konnte nachgewiesen werden, dass die durchschnittliche Länge der klonierten cDNA-Fragmente mit 700 bp deutlich unterhalb der vom Hersteller angegebenen 2000 bp liegt. Die durchschnittliche Insertgröße blieb jedoch nach der Amplifikation der cDNA-Bibliothek stabil bei ca. 700 bp. Allerdings war die Größenverteilung der cDNA-Fragmente mit 0-2000 bp variabler als zuvor mit 50-1500 bp und es wurden Leervektoren nachgewiesen, die vor der Amplifikation nicht detektiert worden waren.

7.2.3 Isolierung möglicher Interaktionspartner im Hefe 2-Hybrid-System

Der Vektor pCBW12, der die enzymatisch-inaktive L1-EN (D205G)-Mutante exprimiert, wurde in Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes AH109 transformiert (siehe 6.21.4) und die Zellen wurden auf Trp-defizienten Minimalplatten auf Anwesenheit des Plasmids selektioniert. 5 ml -Trp Minimalmedium einer Vorkultur wurden mit einer Einzelkolonie der resultierenden Transformanden angeimpft, um damit am Folgetag eine 100 ml Vorkultur in Trp-defizientem Minimalmedium anzusetzen. Anschließend wurden diese pCBW12-tragenden Zellen mit der "Matchmaker" cDNA-Bibliothek transformiert (siehe 6.21.4) und für die Identifikation von Interaktionspartnern auf -Trp/-Leu/-Ade-His Selektionsplatten ausgestrichen. Auf den Selektionsplatten wurden als Positivkontrolle auf detektierbare Protein-Protein-Interaktionen pGBKT7-53/pGADT7-T Doppeltransformanden und als Negativkontrolle pCBW12/pACT2 ausgestrichen. pGBKT7-53 und pGADT7-T sind vom Hersteller mitgelieferte Kontrollplasmide und kodieren für Fusionsproteine von GAL4 DNA-BD und p53 (pGBKT7-53) sowie AD und

dem großen T-Antigen von SV40 (Vektorkarten siehe Anhang). p53 und das große T-Antigen zeigen in Hefe 2-Hybrid Analysen bekanntermaßen eine sehr starke Interaktion (Iwabuchi *et al.*, 1993; Li and Fields, 1993). Während im Falle der Positivkontrolle bereits nach 30 h die ersten Kolonien sichtbar wurden, zeigten sich bei der Negativkontrolle erst nach 10 Tagen ca. 10 Kolonien (Durchmesser <1 mm). Deshalb wurden in dieser und in allen folgenden Hefe 2-Hybrid Studien nur wesentlich größere Kolonien mit einem Durchmesser von mind. 2 mm isoliert. Um mit der cDNA-Genbank mit $3,5 \times 10^6$ unabhängigen Klonen (Herstellerangabe) statistisch nahezu jeden unabhängigen Klon mit L1-EN auf Interaktion zu testen, mussten entsprechend dem "*Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual*" etwa die 2-3 fache Anzahl, also ca. 10^7 Zellen mit der cDNA-Genbank transformiert werden. Daher wurde die Transformation der pCBW12-positiven AH109 Hefezellen mit der amplifizierten cDNA-Genbank solange wiederholt, bis 10^7 Hefezellen kotransformiert worden waren. Bestimmt wurde die Zahl der kotransformierten Zellen für jeden separaten Versuch, indem die auf -Trp/-Leu Platten selektierten und pCBW12/cDNA-Genbankplasmid positiven Kolonien gezählt wurden. Die eigentlichen 2-Hybrid Versuchsansätze mit den 10^7 Kotransformanden (pCBW12/cDNA-Genbankplasmid) wurden direkt auf -Trp/-Leu/-Ade-His Selektionsplatten auf Protein-Interaktion getestet.

Im Rahmen dieser 2-Hybrid Studie wurden unabhängig voneinander vier Ansätze durchgeführt (siehe 6.21.5). In diesen vier Versuchen wurden insgesamt etwa $1,3 \times 10^7$ transformierte Zellen auf mögliche Interaktionen zwischen einem Genbank-Protein und dem Köder-Protein analysiert. Als Ergebnis konnten einhundertachtunddreißig Kolonien identifiziert werden, deren Genbank-Konstrukte für Polypeptide kodieren, die potenzielle Interaktionspartner von L1-EN darstellen.

7.2.4 Ausschluss falsch positiver L1-EN Interaktionspartner

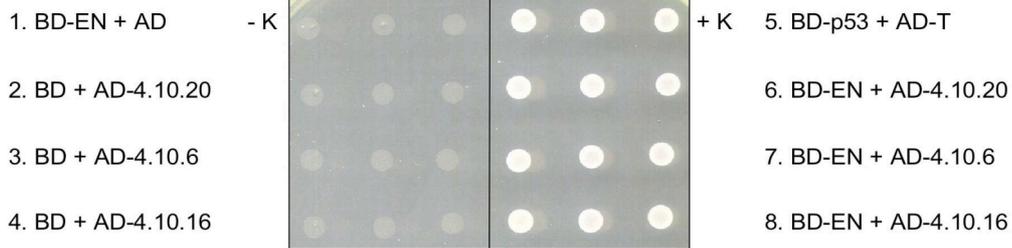
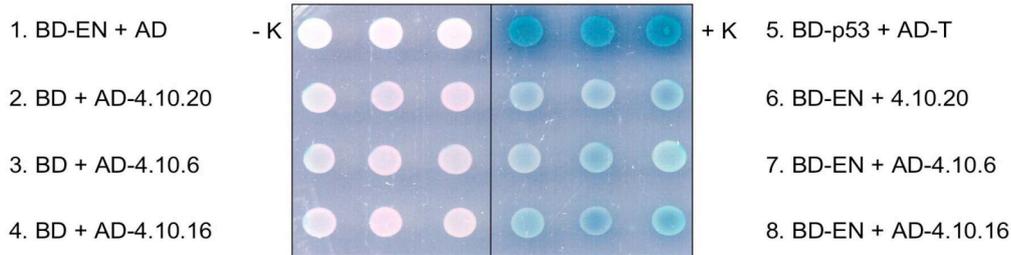
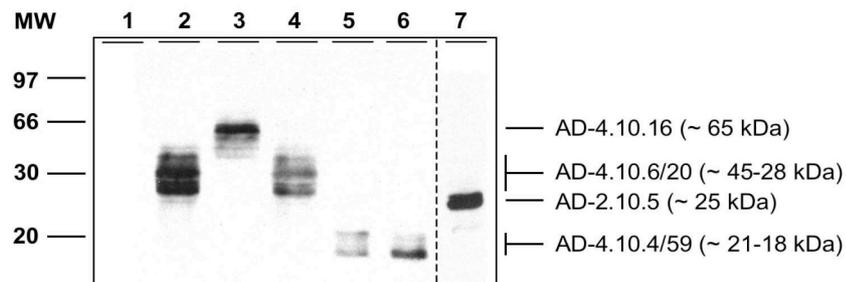
Die mit Hilfe der oben beschriebenen Hefe 2-Hybrid Analysen identifizierten potentiellen Interaktionspartner wurden weiteren Tests unterzogen, um falsch positive Kandidatenproteine auszuschließen. Zu diesem Zweck wurden die Wirtsproteine-exprimierenden pACT2-Derivate zunächst aus den AH109-Zellen isoliert (siehe 6.21.3) und zur Amplifikation der DNA und für weitere Analysen in *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 6.5.2).

7.2.4.1 Ausschluss potentieller Interaktionspartner aufgrund zu kurzer cDNA-Inserts

Die Länge der einzelnen cDNA-Fragmente wurde mittels einer PCR-Analyse bestimmt. Je 0,5 µl der jeweiligen Plasmid-DNA-Präparationen AH109-Zellen wurden für eine analytische PCR mit einer Hybridisierungstemperatur von 42 °C eingesetzt. Als Primer wurden die Oligonukleotide GS 69 und GS 7 verwendet, die auf den flankierenden Sequenzen der MCS von pACT2 binden. Nach der Trennung der PCR-Produkte auf einem analytischen Agarosegel zeigte sich, dass über 70 % der Inserts nur 100 bp bis 200 bp lang waren. Das PCR-Produkt des leeren Ausgangsplasmids pACT2 zeigte im analytischen Agarosegel eine Bande bei ca. 200 bp (rechnerisch 198 bp). Zu diesen 200 Nukleotiden müssen jedoch noch die 5'- und 3'- untranslatierten Bereiche, wie z. B. der PolyA-Schwanz hinzugerechnet werden. Zusätzlich wurde für ein funktionelles und mit Hilfe von Homologievergleichen identifizierbares Peptid eine sinnvolle Mindestgröße von etwa 30 Aminosäureresten postuliert. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren wurden daher nur Fragmente mit einer Mindestlänge von 400 bp in die weiteren Analysen einbezogen (entspricht einer cDNA-Länge von ca. 200 bp), um bei den späteren Sequenzanalysen und Bindungsexperimenten auf Proteinebene möglichst brauchbare Ergebnisse zu erzielen. Insgesamt erfüllten 23 der cDNA-Kandidaten diese Voraussetzung.

7.2.4.2 Ausschluss potentieller Interaktionspartner aufgrund intrinsischer Reportergenaktivierung

Die 23 Kandidatenproteine sollten auf ihre intrinsische Fähigkeit zur Aktivierung der Reportergene (Abb. 24) in AH109-Zellen untersucht werden, um auszuschließen, dass die kodierten Polypeptide auch ohne Interaktion mit dem L1-EN-AD-Fusionsprotein in der Lage sind die Transkription der Reportergene zu initiieren. Hierfür wurden die pACT2-Derivate in *E. coli* Übernachtskulturen amplifiziert (siehe 6.1.2.1) und die Plasmid-DNA extrahiert (entsprechend 6.2.2). 1 µg der jeweiligen Plasmid-DNA Präparation wurde zusammen mit 1 µg pCBW12 bzw. mit 1 µg pGBKT7, je 1 µg pGBKT7-53 und pGADT7-T (Positivkontrolle) oder je 1 µg pCBW12 und pACT2 (Negativkontrolle) in AH109-Zellen kotransformiert (siehe 6.2.1.4). Anschließend wurde die Aktivität der Reportergenexpression in den pGBKT7-Doppeltransformanden mit der Aktivität in den pCBW12-Doppeltransformanden verglichen.

A**B****C****Abb. 25: Nachweis der Expression und der Interaktion von menschlichen Wirtsproteinen mit L1-EN in Hefe.**

EN interagiert mit Wirtsproteinen im Hefe 2-Hybrid-System. Es wurden jeweils drei unabhängige Transformanden der Kandidaten 4,10.6, 4.10.16 und 4.10.20 auf Prototrophie für Adenin und Histidin (**A**) sowie auf α -Galaktosidase Aktivität (**B**) getestet. Zum Nachweis der Interaktion wurden die einzelnen cDNA-Kandidaten (z.B. AD-4.10.16) mit dem leeren "Bait"-Vektor pGBKT7 (BD) (Reihen 2-4) und zusammen mit dem "Bait"-Plasmid pCBW12 (BD-EN) (Reihen 6-8) in AH109 transformiert. Gal4-BD-EN exprimierender pCBW12 wurde mit dem leeren Genbankvektor pACT2 kotransformiert um auf Selbstaktivierung der Reportergene durch die BD-EN Fusion zu testen (Reihe 1: BD-EN +AD). Als Positivkontrolle wurden pGBKT7-53 (BD-p53) mit pGADT7-T (AD-T) kotransformiert (5.), das GAL4-AD als Fusion mit "Large" T-Antigen exprimiert. Es wurden jeweils drei unabhängige Kolonien pro Ansatz als Übernachtskultur in -Trp/-Leu SD-Medium herangezogen und nach Erreichen der stationären Phase jeweils 10 μ l dieser Kultur entsprechend dem beschriebenen Schema aufgetropft. Für den Test auf Expression der *HIS3* und *ADE2* Reportergene (**A**) wurden -Trp/-Leu/-Ade/-His SD-Platten verwendet und für den Test auf α -Galaktosidase Aktivität (**B**) YPD-Platten mit 60 μ g/ml X- α -Gal als Substrat für die α -Galaktosidase. Nach 48 h im Brutschrank bei 30 °C wurden die Platten zur Auswertung photographiert. Die Expression der AD-Fusionsproteine wurde mittels eines Immunblots (**C**) von Hefelysaten nach alkalischer Lyse (jeweils 5 μ l) der drei cDNA-Kandidaten und AH109-Zellen (Negativkontrolle) nachgewiesen. Sowohl der primäre anti-HA AK als auch der sekundäre anti-Ratte HRP konjugierte AK wurden 1:5.000 verdünnt eingesetzt (Spuren 1-6). Aufgrund des starken Signals in Spur 7, wurde nach dem Entfernen aller gebundenen AK die Nitrozellulosemembran für eine weitere Immunblotanalyse eingesetzt, mit primären und sekundären AK 1:20.000 verdünnt (angezeigt durch die gestrichelte Linie). Als Molekulargewichtsstandard diente der LMW-Standard von Amersham. Das geschätzte MW der Fusionsproteine ist in Klammern angegeben. Beladungsplan: Spur 1 = AH109-Zell-extrakt (- Kontrolle); Spur 2 = 4.10.6 Extrakt; Spur 3 = 4.10.16 Extrakt; Spur 4 = 4.10.20 Extrakt; Spur 5 = 4.10.4 Extrakt; Spur 6 = 4.10.59 Extrakt; Spur 7 = 2.10.5 Extrakt. AD = GAL4-Aktivierungsdomäne; BD = GAL4-DNA-Bindedomäne; BD-EN = Fusionsprotein aus BD und L1-EN, MW = Molekulargewicht in Kilodalton.

Abbildung 25 zeigt das Ergebnis des genetischen Tests von drei unabhängigen c-DNA-Kandidaten zum Nachweis der Interaktion mit L1-EN.

Als Negativkontrolle für die Reporteragenaktivierung (Abb. 25A und B, Reihe 1) dienten AH109-Zellen, die mit pCBW12 (BD-EN) und dem leeren Genbankvektor pACT2 (AD) kotransformiert wurden und erwartungsgemäß keine Expression der Reporterogene zeigen, da diese spezielle Kombination von Köderplasmid und leerem Genbankvektor eine Reporteragenaktivierung ausschließt. Dies wird durch das fehlende Wachstum in Abb. 25A und die fehlende Blaufärbung in Abb. 25B ersichtlich. Als Positivkontrolle auf Reporteragenaktivierung dienten AH109-Zellen, die mit den Plasmiden pGBKT7-53 (BD-p53) und pGADT7-T (AD-T) kotransformiert worden waren (siehe Vektorkarten im Anhang), da die spezifische Interaktion von p53 mit dem großen T-Antigen-Anteil des Fusionsproteins zur Aktivierung der Transkription der Reporterogene führt. Hierbei zeigte sich eine starke (Abb. 25A und B, Reihe 5), was durch das Wachstum auf den -Trp/-Leu/-Ade/-His SD-Platten in Abb. 25A und die intensive blaue Färbung in Abb. 25B sehr gut verdeutlicht wird. Die Proteine, die von den drei cDNAs der Genbankplasmide 4.10.20, 4.10.6 und 4.10.16 kodiert werden, sind bei Anwesenheit des kotransfizierten pCBW12 (siehe "*bait*"-Plasmide in Abb. 23A) ebenfalls in der Lage die Expression der Reporterogene *HIS3*, *ADE2* und *MEL1* in AH109 zu aktivieren (Abb. 25A und B, Reihen 6-8). Im Gegensatz dazu zeigte sich in Abwesenheit des Köder-Proteins (Abb. 25A und B, Reihen 2-4) weder eine Blaufärbung (Abb. 25A) noch waren die AH109-Zellen auf den Selektionsplatten lebensfähig (Abb. 25B). Diese Ergebnisse der Abbildungen 25A und B belegen, dass die Expression der L1-EN Mutante als BD-Fusion bei Anwesenheit der drei gezeigten Kandidatenproteine 4.10.20-AD, 4.10.6-AD und 4.10.16-AD essentiell für die Aktivierung der Reporterogene ist und da keines dieser drei AD-Fusionsproteine in Anwesenheit der Gal4-BD alleine eine Aktivierung der Reporteragenexpression verursachte, kann eine intrinsische Fähigkeit zur Reporteragenaktivierung bei den drei Kandidatenproteine ausgeschlossen werden. Von den insgesamt 23 cDNA-Kandidaten, die auf diese Weise auf Expression der Reporterogene *HIS3*, *ADE2* und *MEL1* in AH109 getestet wurden, konnten inklusive der in Abb. 25 gezeigten Beispiele, acht L1-EN Interaktionspartner verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese acht potentiellen Interaktionspartner wurden für weitergehende Untersuchungen herangezogen, während sich die übrigen fünfzehn Kandidaten als falsch positiv erwiesen (Daten nicht gezeigt).

Jeweils 50 ng Plasmid-DNA der Genbankklone, die für die acht potentiellen L1-EN Interaktionspartner kodieren, wurden in AH109-Zellen transformiert (siehe 6.21.4), um die

Expression der korrespondierenden cDNAs in Hefe zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Gesamtproteinextrakte (Herstellung gemäß 6.22.2) über SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 6.13) und für Immunblotanalysen mit einem anti-HA AK eingesetzt. Die Expression der Kandidaten-Fusionsproteine war in sechs der acht Ansätze hoch genug, um sie immunologisch nachzuweisen. Die Immunblotanalyse in Abb. 25C zeigt die Expression der sechs HA-markierten AD-Fusionsproteine, die von den Plasmiden 4.10.20, 4.10.6, 4.10.16, 4.10.4, 4.10.59 und 2.10.5 kodiert werden. Insbesondere bei den Kandidaten 4.10.6/20 (Abb. 25C, Spuren 2 und 4) und 4.10.4/59 (Abb. 25C, Spuren 5 und 6) zeigen sich mehrere spezifische Banden, was auf Degradation hinweisen könnte. Hierbei könnte die oberste Bande das vollständige Fusionsprotein repräsentieren, während die unteren Banden Degradationsprodukte darstellen. Insbesondere die Verbindungsstelle (*linker*) zwischen Kandidatenprotein und DNA-AD ist sehr anfällig für Proteasenverdau. Im Zellextrakt von untransformierten AH109-Zellen konnten erwartungsgemäß keine Proteine mit dem anti-HA AK nachgewiesen werden. Für die Kandidaten 2.6.5 und 4.6.6 konnte keine Expression im Immunblot nachgewiesen werden.

7.2.5 Analyse der cDNA-Sequenzen identifizierter L1-EN Interaktionspartner

Durch die Bestimmung der Länge der cDNA-Fragmente, die für die acht potentiellen Interaktionspartner kodieren, konnte bereits ausgeschlossen werden, dass es sich bei den identifizierten Kandidaten, nicht um einen einzigen Klon handelt, von dem mehrere Kopien isoliert wurden, da Länge der Inserts in einen Bereich von ca. 400 bp bis 2000 bp variierten. Die Bestimmung der cDNA-Sequenzen soll jedoch darüber hinaus die Frage klären, ob es sich hierbei um unterschiedlich lange Abschnitte derselben cDNA handelt, die von derselben Ursprungs-mRNA abstammen und somit für dasselbe Protein kodieren oder ob die cDNAs für unterschiedliche, potentielle Interaktionspartner kodieren.

Je 1 µg der acht Genbankplasmide wurde für die Sequenzanalyse der cDNA-Fragmente eingesetzt (siehe 6.6.5). Als Primer wurden die Oligonukleotide GS 6 und GS 69 verwendet, die auf den pACT2-Sequenzen binden, die jedes cDNA-Fragment flankieren. Die editierten cDNA-Sequenzen wurden durch *in-silico* Analysen mit Hilfe des BLAST (*basic local alignment search tool*) Algorithmus mit den Sequenzen des menschlichen Genoms aus öffentlich zugänglichen Datenbanken verglichen, die sowohl genomische

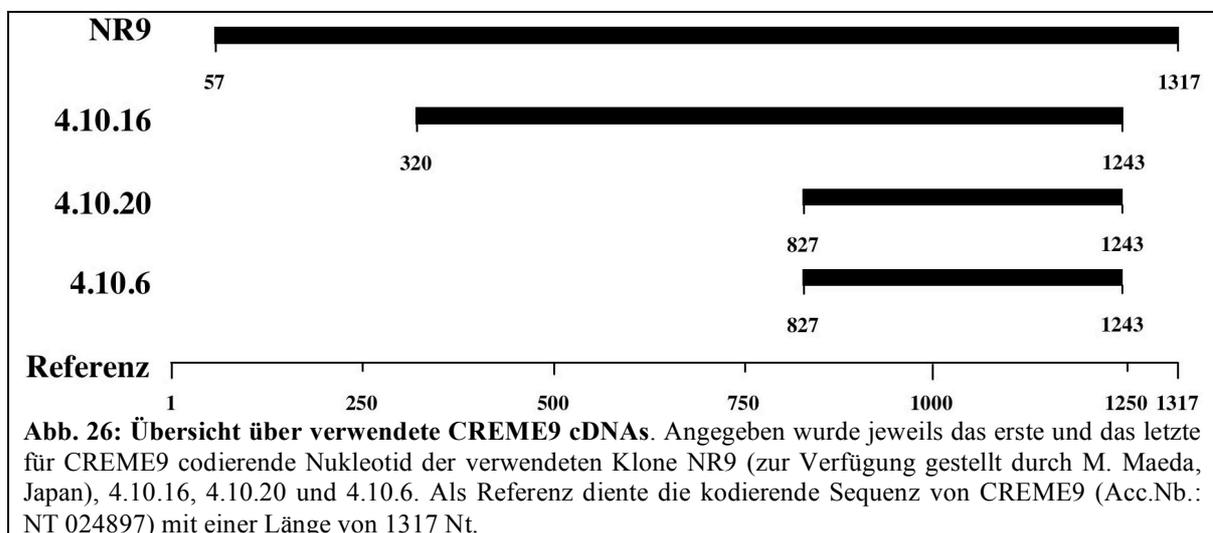
Sequenzen als auch ESTs (*Expressed Sequence Tag*) umfassten (Altschul *et al.*, 1990). Die Ergebnisse der Sequenzanalysen sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Klon	kodiertes Protein	Acc. No.
2.6.5	Keratin Protein K6 (K6irs2)	NM_080747
2.10.5	Ubiquitin konjugierendes Enzym (UBE2I)	U45328
4.6.6	Acrosin bindendes Protein	BC033010
4.10.4	unbekannt	AC078855
4.10.6	Zytokin Rezeptor ähnliches Molekül 9 (CREME9)	AF120151
4.10.16	Zytokin Rezeptor ähnliches Molekül 9 (CREME9)	AF120151
4.10.20	Zytokin Rezeptor ähnliches Molekül 9 (CREME9)	AF120151
4.10.59	unbekannt	AC078855

Tab. 3: Ergebnisse aus den Gendatenbankanalysen der cDNA-Sequenzen. Die Bezeichnungen der cDNA-Kandidaten erfolgt über einen dreiteiligen Zahlenkode, wobei die erste Zahl die fortlaufende Nummer der 2-Hybridanalyse, die zweite Zahl die Anzahl der Tage im Brutschrank bis zur Gewinnung der Kolonie und die letzte Zahl die fortlaufende Nummer des Kandidaten an dem jeweiligen Tag angibt. In der zweiten Spalte ist angegeben, welches Protein von dem cDNA-Kandidaten kodiert wird und die letzte Spalte gibt die zugehörige Zugangsnummer (*accession number*) an, unter welcher die vollständige cDNA oder genomische DNA-Sequenz in der Genbank zu finden ist.

Die Analysen ergaben, dass sowohl die cDNA-Sequenzen von 4.10.4 und 4.10.59 als auch von 4.10.6 und 4.10.20 vollständig übereinstimmen. Außerdem ergab ein Vergleich der Sequenzdaten von 4.10.6/4.10.20 mit 4.10.16, dass sich die Sequenzen überlappen und daher zwei unterschiedliche Fragmente derselben cDNA repräsentieren. Somit kodieren die acht unabhängig voneinander isolierten cDNA-Klone für fünf unterschiedliche Polypeptide, die potentielle Interaktionspartner von L1-EN darstellen. Die identischen Kandidaten 4.10.4 und 4.10.59 konnten keinem bisher bekanntem Gen oder EST zugeordnet werden. Der lesbare Teil der sequenzierten cDNAs von etwa 150 bp Länge, lässt zudem die Vermutung zu, dass es sich bei 4.10.4/4.10.59 um mehrere kurze cDNA-Fragmente handeln könnte, die paarweise alternierend am 5'- und 3'- Ende miteinander ligiert wurden. In diesem Falle ließe sich nicht bestimmen, welchem Fragment die Interaktion mit der L1-EN zuzuordnen wäre. Da sich mit diesem Kandidaten aus der Gendatenbankrecherche außerdem keine vollständige cDNA rekonstruieren ließ, wurde die weitere Analyse von 4.10.4/4.10.59 zugunsten eines aussichtsreicheren Kandidaten zurückgestellt. Die cDNA des Genbankplasmids 2.6.5 kodiert für Keratin 6 (K6irs2 = *keratin 6 protein inner root sheath type2*), das zu den Typ 2 Keratinen gehört und bisher

ausschließlich in Epthelzellen der inneren Hülle von Haarfolikeln nachgewiesen werden konnte (Langbein *et al.*, 2003; Porter *et al.*, 2001). Obwohl die Expression von Keratin 6 in der Keimbahn nicht ausgeschlossen werden kann, bleibt eine mögliche biologische Bedeutung der Interaktion von L1-EN mit Keratin 6 bei der L1-Retrotransposition zunächst noch unklar. Ubiquitin-konjugierende Enzyme, wie das von 2.10.5 kodierte UBE2I, werden als die am häufigsten, in Hefe 2-Hybrid-Analysen identifizierten, falsch positiven Kandidatenproteine diskutiert (persönliche Kommunikation Klaus Harbers). Aus diesem Grund wurde die weitere Analyse von Kandidat 2.10.5 direkt nach der Identifikation des UBE2I als kodiertem Protein eingestellt. Die cDNA-Sequenz des Genbankplasmids 4.6.6 kodiert für das Acrosin-bindende Protein (ACRBP), welches auch als sp32 oder OY-TES-1 beschrieben wurde. Dieses Protein liegt im Acrosom der Spermien vor und wird ausschließlich im menschlichen Hoden und verschiedenen Tumoren exprimiert (Ono *et al.*, 2001). Da L1-Expression in denselben Geweben beobachtet wird, wie ACRBP, L1-Retrotransposition in Keimbahnzellen stattfindet und wegen seiner nachgewiesenen Protein-bindenden Eigenschaften (Baba *et al.*, 1994; Okumura *et al.*, 2005), wird ACRBP als möglicher biologisch relevanter, potentieller EN-Interaktionspartner eingestuft und in zukünftige Untersuchungen mit einbezogen.



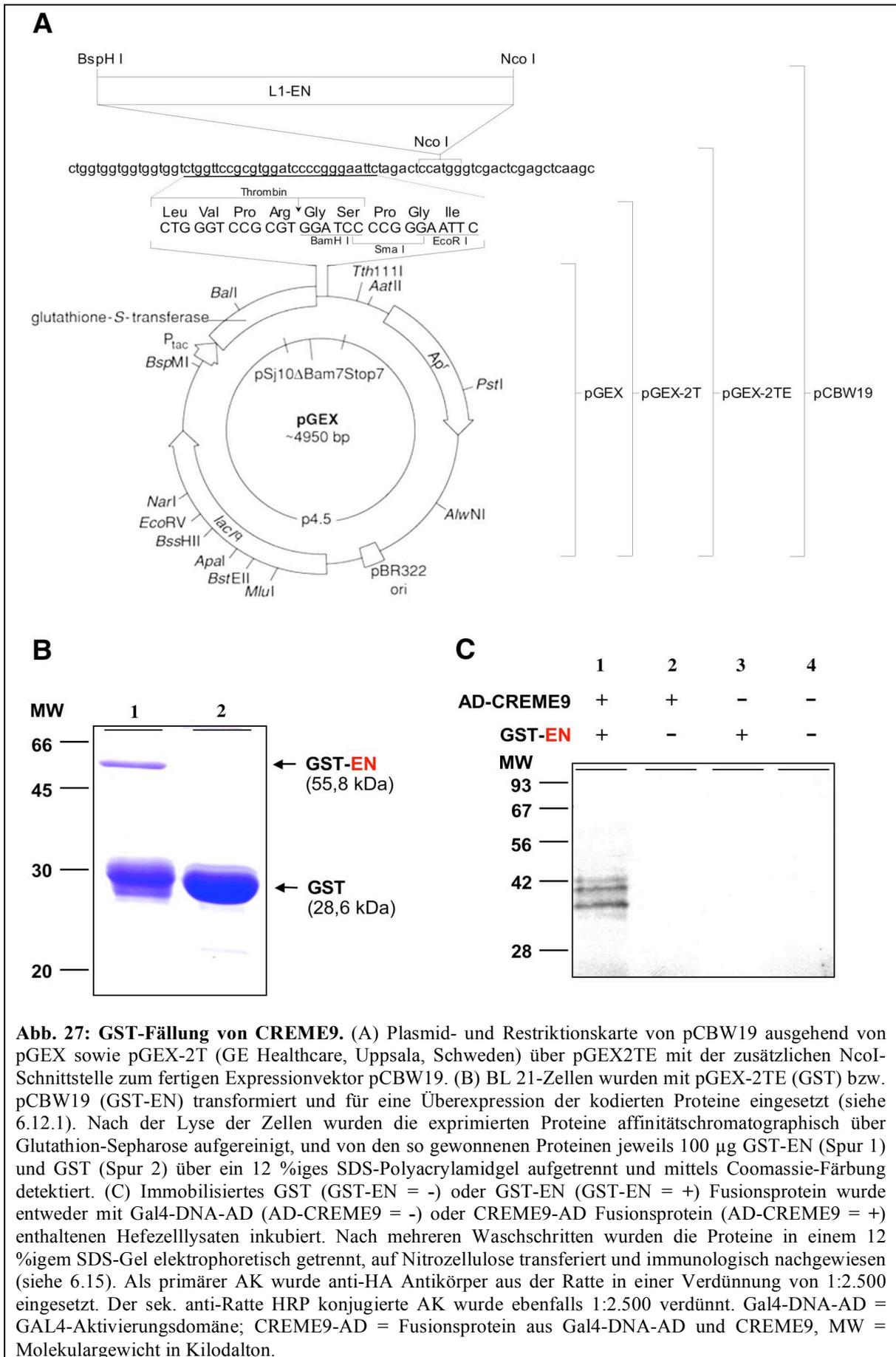
Die Sequenzanalyse der Genbankplasmide 4.10.6, 4.10.16 und 4.10.20 führten zur Identifikation eines weiteren potentiellen L1-EN Interaktionspartners, dem "*cytokine receptor-like molecule 9*" CREME9. Da es sich bei 4.10.6 und 4.10.20 um identische Plasmide handelt, wurden somit nur zwei unterschiedliche cDNA-Plasmide isoliert, die für zwei unterschiedliche, aber überlappende C-terminale Peptidsequenzen von CREME9

kodieren (Abb. 26). Die Funktion von CREME9 ist bisher unbekannt. Das Protein enthält eine Fibronectin Typ 3 Domäne (FN3), wie sie in ungefähr 2 % aller menschlichen Proteine vorkommt. Zu den Proteinen mit FN3-Domänen gehören sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Proteine, Transmembranproteine, Adhäsionsmoleküle und verschiedene lösliche und membranständige Zytokin- und Hormon-Rezeptoren. Eine vollständige Analyse der, in der Datenbank vorhergesagten, Aminosäuresequenz (NP_057070) ergab keinerlei Anzeichen für das Vorhandensein einer Transmembranregion, weshalb vermutet werden kann, dass es sich bei CREME9 entweder um ein zytosolisches Protein oder um ein Zellkernprotein handelt.

Die Sequenzanalysen führten zu der Entscheidung, dass die beiden potentiellen EN-Interaktionspartner ACRBP und CREME9 für weitergehende Studien zur biologischen Bedeutung ihrer Interaktion mit L1-EN herangezogen werden sollten.

7.2.6 Bestätigung der L1-EN/CREME9-Interaktion durch GST-Fällung

Nachdem mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems potentielle Interaktionspartner von L1-EN identifiziert worden waren, sollte die physikalische Interaktion der Kandidatenproteine mit der L1-EN Domäne unter Anwendung der GST-Fällung (siehe 6.12.4) überprüft werden. Zu diesem Zweck sollte L1-EN als GST-Fusionsprotein exprimiert werden. Hierfür wurde die L1-EN kodierende Sequenz aus pQF218 (Feng et al., 1996) als NcoI/BspHI-Fragment mit dem NcoI geschnittenen Vektor pGEX-2TE ligiert (siehe 6.6.4) und das resultierende Plasmid pCBW19 (Abb. 27A) durch Restriktions- und Sequenzanalysen kontrolliert. Anschließend wurden kompetente Bakterien vom Stamm BL21 mit den Plasmiden pCBW19 und pGEX-2TE transformiert (6.5.2). Letzteres diente bei der GST-Fällung als Negativkontrolle für die spezifische Interaktion von CREME9 mit L1-EN. Es wurden jeweils drei Transformanten in 3 ml-Schüttelkulturen inkubiert und für die Induktion der Proteinexpression durch IPTG eingesetzt (siehe 6.12.1). Um die Induktion der GST- bzw. GST-EN-Expression nachzuweisen wurden die Zellen in SDS-Probenauftragspuffer resuspendiert und der Proteinextrakt in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch Coomassie-Färbung konnten die überexprimierten Proteine mit einem MW von 28,6 kDa (GST) und 55,8 kDa (GST-EN) detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Für die Gewinnung großer Proteinmengen wurde jeweils derjenige pGEX-2TE- bzw. pCBW19-Klon mit der höchsten GST- bzw. GST-EN-Expression in einer 100 ml Schüttelkultur für eine IPTG induzierte Proteinüberexpression (siehe 6.12.1) eingesetzt.



GST Proteine und EN-GST Fusionsproteine wurden dem jeweiligen Bakterienlysat mittels affinitätschromatographischer Reinigung über Glutathion-Sepharose isoliert (siehe 6.12.3). Um die Effizienz der Affinitätschromatographie zu überprüfen, wurden jeweils 100 µg der eluierten Proteine (GST bzw. GST-EN) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung nachgewiesen. Die in diesem Gel beobachteten MWs stimmen mit den berechneten Werten 28,6 kDa für GST (Abb. 27B, Spur 2) und 55,8 kDa für GST-EN (Abb. 27B, Spur 1) überein. Die Tatsache, dass GST-EN Fusionsproteine nur ca. 10% der eluierten Proteinmenge ausmachen, während GST Proteine ohne EN-Anteil etwa 90% ausmachen (Abb. 27B, Spur 1), ist ein überraschendes Ergebnis. Eine mögliche Erklärung ist die typischerweise in Expressionsplasmiden integrierte Verbindungssequenz, der sogenannte "*linker*", welcher für eine Reihe von Aminosäureresten kodiert, die ein flexibles Peptid zwischen den beiden Domänen des Fusionsproteins (hier GST und L1-EN) bilden sollen, um sicherzustellen, dass sich beide Proteinanteile voneinander unbeeinflusst falten können. Dieser Linker liegt oft exponiert im Fusionsprotein vor und ist daher besonders anfällig für die Degradation durch Proteasen, während die beiden gefalteten Proteindomänen GST und L1-EN wesentlich widerstandsfähiger gegen Proteaseverdau sein sollten.

Die beiden potentiellen L1-EN Interaktionspartner, die Fusionsproteine CREME9-AD und ACRBP-SD, sollten aus den AH109-Zellen isoliert werden, die mit den Genbankplasmiden 4.6.6, 4.10.16 bzw. pACT2 transformiert worden waren. Zu diesem Zweck wurden je 30 ml des entsprechenden SD-Mediums (siehe 5.4.3) mit den unterschiedlich transformierten AH109-Zellen inokuliert und jeweils nach Erreichen einer OD_{600nm} von 1,2 abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mittels Glasperlen (entsprechend 6.22.1) aufgeschlossen. Die pACT2 transformierten Hefezellen, die nur die Gal4-DNA-AD exprimieren dienten in der folgenden GST-Fällung als Negativkontrolle. Um die Expression der Gal4-DNA-AD Fusionsproteine zu überprüfen wurden Proben des Überstandes aus dem obigen nativen Hefeaufschluss mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und über Immunblotanalysen mit einem anti-HA Antikörper nachgewiesen. Während das CREME9-AD Fusionsprotein auf diese Weise nachzuweisen war, ist es nicht gelungen, ACRBP-AD im Immunblot zu identifizieren (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund konnte die anschließende GST-Fällung zur Bestätigung der spezifischen Interaktion mit L1-EN nur mit CREME9 als Interaktionspartner durchgeführt werden.

Für die GST-Fällung wurden jeweils 5 mg gereinigtes und an Glutathion-Sepharose gebundenes GST bzw. GST-EN Fusionsprotein eingesetzt. Beide Ansätze wurden geteilt

und sowohl die GST- als auch die GST-EN-Ansätze mit jeweils 300 µl der Überstände aus dem obigen Gal4-DNA-AD und dem CREME9-AD Hefeaufschluss inkubiert (siehe 6.12.4). Im Anschluss an die erforderlichen Waschschriffe, wurden die an die Sepharose gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem anti-HA Antikörper immunologisch nachgewiesen. Es zeigte sich, dass CREME9-AD nur dann an die Sepharose bindet, wenn an dieser GST-EN als Bindungspartner immobilisiert wurde (Abb. 27C, Spur 1). Im Gegensatz dazu ist gebundenes GST alleine ohne die EN-Domäne nicht ausreichend, um die CREME9-Fällung zu ermöglichen (Abb. 27C, Spur 2). Vergleicht man Spur 1 und Spur 3 in Abb. 27C, so zeigt sich, dass das Gal4-DNA-AD nicht an GST-EN bindet, wenn der CREME9-Anteil fehlt. Auch die Abwesenheit eines EN-Anteils verhindert eine Bindung von CREME9-AD an das Sepharose-gekoppelte GST (Abb. 27C, Spur 2).

Vergleicht man außerdem die detektierten Molekulargewichte der in Abb. 27B, Spur 1 identifizierten Proteine (ca. 35 - 42 kDa) mit der berechneten Masse der CREME9-AD Fusion aus Genbankplasmid 4.10.16 so ergibt sich eine hohe Übereinstimmung. Der CREME9-Anteil der Fusion hat ein MW von ca. 34 kDa und die Gal4-AD inklusive des HA-Tags und Linkers ca. 18 kDa. Die unterste Bande in Abb. 27B, Spur 1 könnte somit der minimal detektierbaren Einheit von CREME9 entsprechen, welches die Bindung an die L1-EN vermittelt plus dem HA-Tag, welcher zur Detektion im Immunblot unverzichtbar ist. Allerdings wären alle detektierten Banden entweder am 5'- oder 3'-Ende degradiert, da ein Bande im Bereich von ca. 52 kDa, wie sie für eine vollständige CREME9-AD Fusion zu erwarten wäre, im gezeigten Immunblot nicht nachzuweisen war.

Insgesamt lässt sich die im genetischen Testsystem der 2-Hybridstudien aufgezeigte Interaktion von L1-EN mit dem menschlichen CREME9-Protein durch die in Abb. 27 dargestellten GST-Fällungsexperimente bestätigen.

7.2.7 Etablierung der induzierbaren Expression von CREME9

Im nächsten Schritt sollte die biologische Bedeutung der nachgewiesenen spezifischen L1-EN/CREME9-Interaktion untersucht werden. Proteine sind oft in funktionelle Einheiten, den so genannten Proteindomänen, unterteilt. Die bisher isolierten CREME9-Polypeptide sind zwar in der Lage die Protein-Protein Interaktion mit L1-EN zu vermitteln, andere wichtige biologische Funktionen von CREME9 könnten aber durchaus in den fehlenden Regionen von CREME9 lokalisiert sein (Vergleich Abb. 26). Um für alle nachfolgenden

Experimente die *in-vivo* Situation möglichst exakt nachzuvollziehen, ist das komplette CREME9 mit dem vollständigen Repertoire seiner biologischen Funktionen erforderlich. Deshalb war es notwendig, eine vollständige CREME9-cDNA zu klonieren. Als Ausgangsmaterial wurde eine 5'- verkürzte CREME9-cDNA (NR9), kloniert in den Vektor pGEM-T Easy von Promega freundlicherweise von M. Maeda (CHUGAI Research Institut for Molecular Medicine, Nagai Niihari Ibaraki, Japan) zur Verfügung gestellt (Abb. 26). Zum Zeitpunkt der vorgestellten Arbeiten war NR9 die längste verfügbare CREME9 cDNA. Für die Klonierung des vollständigen 5'-Endes der CREME9-cDNA einschließlich der Nukleotide -12 bis -1 der flankierenden Region (siehe Anhang), wurde Gesamt-mRNA aus 0,5 g menschlichen Hodengewebes nach der GIT-Methode (siehe 6.10.1) präpariert. Nach einer Standard-RT-Reaktion mit einem Oligo(dT)₁₅-Primer (siehe 6.10.2) wurden 10 % des Ansatzes für eine PCR-Amplifikation (siehe 6.8.1) mit den Primern GS 130 und GS 96 (siehe 5.2.5) eingesetzt. Von diesem Amplifikat wurden direkt 2 µl als Matrize für eine weitere Amplifikationsrunde mit den Primern GS 130 und GS 97 (siehe 5.2.5) verwendet und nach Ligation in einen TA-Klonierungsvektor in *E. coli* amplifiziert (siehe 6.6.4). Die Nukleotidsequenz des 5'-Endes der vollständigen CREME9-cDNA wurde mittels Sequenzanalyse kontrolliert, in einem Zwischenklonierungsschritt über die interne StuI-Schnittstelle an Nukleotidposition +389 von CREME9 (siehe unterstrichene Sequenz von pCBW23 im Anhang) mit dem 3'-Fragment von CREME9 aus NR9 ligiert, um sie dann durch einen präparativen Verdau mit den Restriktionsendonukleasen SphI und SpeI zu isolieren und in das ebenso geschnittene Plasmid pGEM-T Easy (Promega) zu inserieren. Das so entstandene Plasmid pCBW23 trägt die vollständige CREME9-cDNA im Vektor pGEM-T Easy (vollständige Nukleotidsequenz von pCBW23 im Anhang).

Um die Interaktion von L1-EN mit CREME9 in ihrer biologischen Bedeutung näher zu charakterisieren sollte der Einfluss der Expression von CREME9 auf die Retrotransposition von L1 untersucht werden. Da nicht bekannt ist, ob ein möglicher Einfluss von CREME9 nach dem Alles-oder-Nichts Prinzip funktioniert oder vielleicht sogar verschiedene Effekte in Abhängigkeit von der CREME9-Konzentration auftreten, wurde ein Expressionssystem gesucht, welches eine möglichst einfache und zugleich stufenlose Regulation der CREME9-Expression erlaubte. Entsprechend dieser Kriterien wurde das ARIAD-System für die folgenden Versuche ausgewählt. Es erlaubt eine konzentrationsabhängige, stufenlose Regulation der CREME9-Expression in Zellkulturen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen des heterodimerisierenden Rapamycin Analogons AP21967 (Pollock *et al.*, 2000).

Das Wirkprinzip von AP21967 ist in Abb. 6 schematisch dargestellt. Ähnlich wie bei dem bereits beschriebenen Hefe 2-Hybridsystem wurde auch hier ein Transkriptionsfaktor in seine beiden funktionellen Einheiten, DNA-Bindungsdomäne und Aktivierungsdomäne zerlegt. Erst nach Zugabe von AP21967 entsteht aus diesen beiden Teilen wieder eine funktionsfähige Einheit und die Transkription des interessierenden Transgens wird initiiert (Spencer *et al.*, 1993).

Um die vollständige CREME9-cDNA im ARIAD-System exprimieren zu können, wurde das Plasmid pCBW23 als Matrize für eine präparative PCR mit den Primern GS 185 und GS 186 (siehe 5.2.5) eingesetzt und das resultierende PCR-Fragment wurde entsprechend der Herstelleranleitung mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt, phosphoryliert und als CREME9-Insert für die folgende Klonierung verwendet. Der Vektor R850 (abgeleitet von Acc. Nb.: AJ224005, zur Verfügung gestellt von C. Stocking, Heinrich-Pette-Institut) basiert auf dem Plasmid pLH-Z₁₂I-PL (Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, USA), wobei zusätzlich eine Hygromycin-Reportergenkassette für die Selektion in eukaryontischen Zellen inseriert wurde (Abb. 6). Nach einem präparativen Restriktionsverdau mit HindIII wurden die kohäsiven Enden der DNA-Doppelhelix von R850 mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* aufgefüllt (siehe 6.6.2) und das obige CREME9-Insert direkt in den Vektor hinein kloniert. Sowohl das Insert als auch die Übergänge zwischen Insert und Vektor wurden sequenziert, sorgfältig kontrolliert und das resultierende Plasmid als pCBW24 für die nachfolgende Expression eingesetzt (Vektorkarte siehe Anhang).

Wie unter 6.1.1.8 beschrieben wurden insgesamt neun HeLa-Zellklone etabliert, welche die nötigen Transkriptionsfaktoren stabil exprimieren sollten. Um zu testen, welcher dieser neun Klone die höchste Expression eines Zielproteins induziert, wurde der retrovirale Vektor R873 (zur Verfügung gestellt von C. Stocking, noch nicht publiziert) in Phoenix-gp Zellen verpackt (siehe 6.1.1.6) und die neun etablierten HeLa-Zellklone mit den resultierenden Virusisolaten transduziert. R873 ist ein Derivat des in Abb. 6 dargestellten Vektors pLH-Z₁₂I-PL, der die AP21967 abhängige Expression eines verkürzten LNGFR-Proteins erlaubt, bestehend aus der Transmembrandomäne und der extrazellulären Domäne von LNGFR (Fehse *et al.*, 1997). Zusätzlich wurde das Hygromycin-Resistenzgen in R873 durch einen eGFP-Selektionsmarker ersetzt. Die Transduktionseffizienz einzelner Klone variierte zwischen 40 % und 80 %. Die Ansätze wurden geteilt und während die Expression des verkürzten LNGFR-Proteins bei der einen Hälfte der Ansätze nach 5 Tagen entsprechend der Herstellerempfehlung durch Zugabe von 100 nM AP1967

(Endkonzentration im Medium) induziert wurde (siehe 6.1.1.9), blieb die andere Hälfte der Zellen unbehandelt. Am Folgetag wurden die Zellen beider Ansätze für die durchflusszytometrische Analyse mit anti- Δ LNGFR Antikörpern und einem PE-gekoppelte sekundären Antikörper fluoreszenzmarkiert (siehe 6.1.1.10). Nach der Kompensation der unspezifischen Fluoreszenz mit unmarkierten Zellen wurden sowohl die induzierten als auch die nicht induzierten Zellen im Durchflusszytometer analysiert (siehe 6.1.1.11). Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 28 graphisch dargestellt.

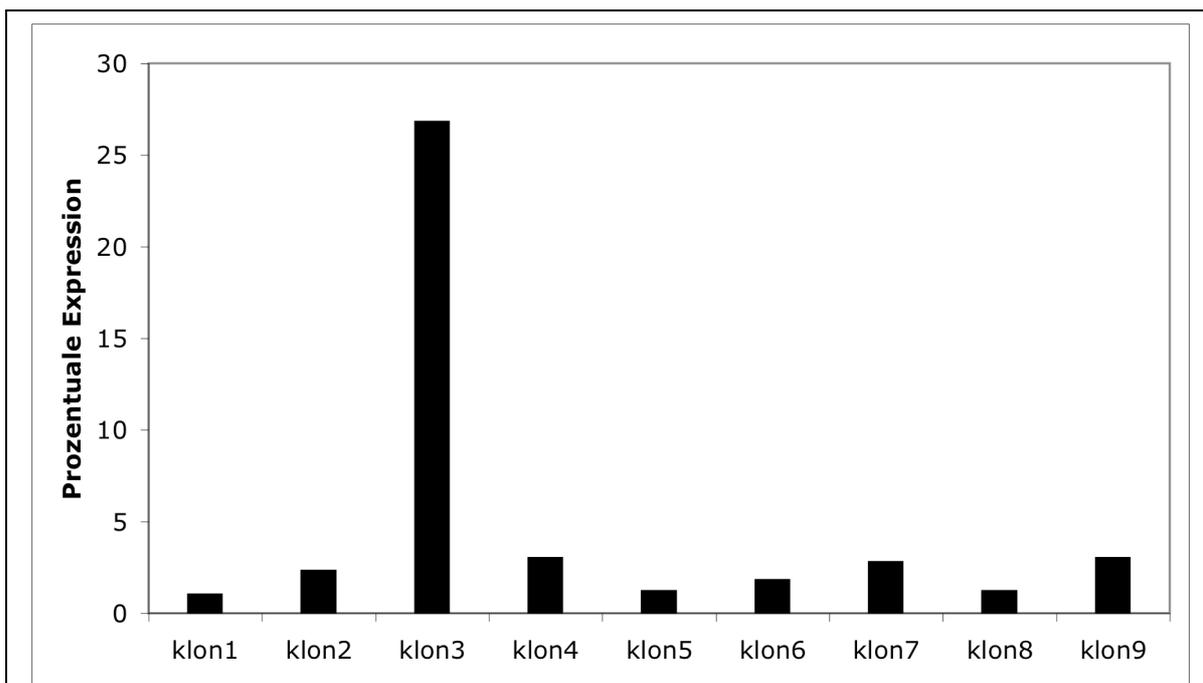


Abb. 28: Graphische Darstellung der Δ LNGFR-Expression. Neun etablierte HeLa-Zellklone, welche die benötigten Transkriptionsfaktoren für das ARIAD-System stabil exprimieren sollten, wurden mit R873 (einem Δ LNGFR tragendem Zielplasmid) transduziert (siehe 6.1.1.7). Nach der Transduktion wurden die Ansätze geteilt. In einer Hälfte der Zellen wurde durch Zugabe von 100 nM AP1967 die Δ LNGFR-Expression induziert, während die andere Hälfte der Zellen unbehandelt blieb. Nach fünf Tagen wurden die Zellen beider Ansätze aller neun Klone fluoreszenzmarkiert (primärer anti- Δ LNGFR AK 1:100, sekundärer PE-gekoppelter AK 1:200). Nach Kompensation gegen unmarkierte Zellen, wurde der prozentuale Anteil der Zellen, welche nach Induktion der Δ LNGFR-Expression mit AP1967 eine spezifische Fluoreszenz zeigten, für alle neun analysierten Klone graphisch dargestellt. Hiefür wurden alle Zellen erfasst, die eine höhere Fluoreszenz aufwiesen als 99 % der nicht induzierten, PE-gefärbten Zellen.

Die Intensität der, nach Anregung des Fluorochroms PE emittierten Strahlung der AP2167 induzierten Zellen wurde mit der Intensität der emittierten Strahlung von den nicht induzierten Zellen verglichen. Der prozentuale Anteil der induzierten Zellen, die eine höhere Strahlungsemission aufwiesen als 99 % der nicht induzierten Zellen sind in dem Diagramm (Abb. 28) für jeden der neun HeLa-Zellklone aufgetragen, welche die benötigten Transkriptionsfaktoren des ARIAD-Systems stabil exprimieren sollten. Als einziger der neun HeLa-Zellklone zeigt Klon 3 eine signifikante Anzahl von Zellen mit erhöhter Signalintensität in der Durchflusszytometrie. Damit konnte gezeigt werden, dass

sich die Expression des verkürzten LNGFR-Proteins in Klon 3 durch Zugabe von 100 nM AP2167 induzieren lässt. Rechnet man den Anteil der Zellen mit nachweisbarer Expression des verkürzten LNGFR-Proteins auf den Anteil der mit R873 transduzierten Zellen von ca. 40 % um, ergibt sich für den HeLa-Zellklone 3 (HeLa-R874) eine messbare Antwort auf die Induktion mit AP2167 in knapp 80 % der transduzierten Zellen. Als Ergebnis dieses Experiments steht nun ein induzierbares System in HeLa-Zellen zur Verfügung, mit welchem eine funktionelle Analyse von Transgenen im L1-Retrotranspositionstest möglich ist.

7.2.8 Einfluss von CREME9 auf die L1-Retrotranspositionsrate

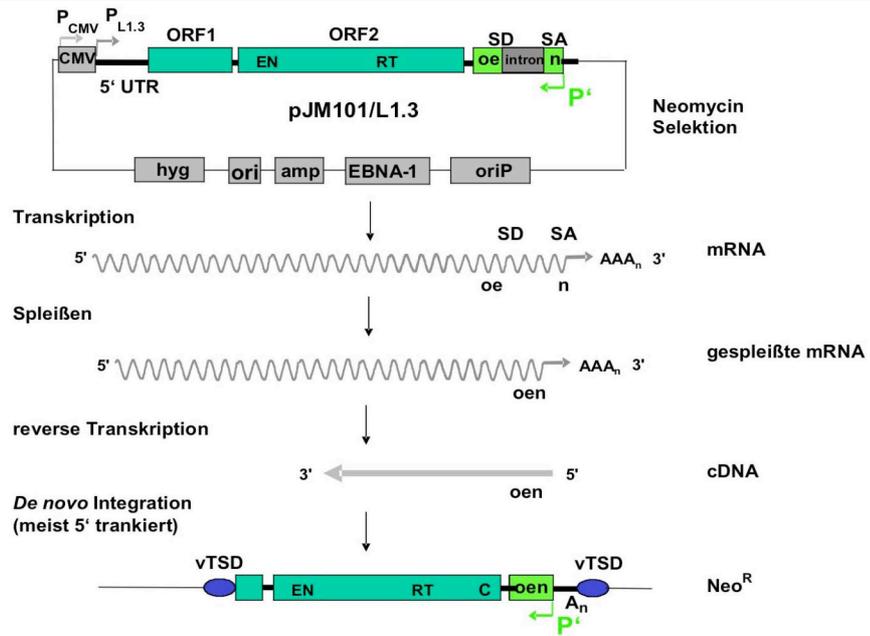
Der L1-Retrotranspositionstest (RTP-Test) verwendet ein markiertes, funktionelles L1-Reporterelement, um in HeLa-Zellen Retrotranspositionseignisse sichtbar zu machen (siehe Abb. 29A). Auf diese Weise lässt sich die Retrotranspositionsfrequenz unterschiedlicher Elemente miteinander vergleichen. Man kann dieses System aber auch dazu verwenden, um über Änderungen in der Retrotranspositionshäufigkeit die Reaktion von L1 auf äußere Einflüsse zu analysieren. Hier wurde der RTP-Test benutzt um zu untersuchen, ob eine erhöhte CREME9-Expression zu einer Änderung der L1-Retrotranspositionsfrequenz führt.

Für diesen Test wurde der retrovirale Vektor pCBW24 (Vektorkarte siehe Anhang) in Phoenix-gp Zellen verpackt (siehe 6.1.1.6), und die AP2167 sensitive Zelllinie HeLa-R874 mit den resultierenden Virusisolaten transduziert (HeLa (R874 + pCBW24)). Als Negativkontrolle dienten HeLa-R874 Zellen, die mit dem leeren Vektor R850 transduziert wurden (HeLa (R874 + R850)). Die Transduktionseffizienz lag in beiden Fällen bei etwa 30 %. Die Ansätze wurden acht Tage expandiert und dann wurden die transduzierten Zellen aufgrund ihrer eGFP Expression mittels des Zellsortierers angereichert (siehe 6.1.1.12). Durch diesen Schritt wurde der Anteil transduzierter Zellen auf über 95 % erhöht. Die Zellen wurden nochmals drei Tage expandiert und anschließend für einen Retrotranspositionstest eingesetzt (siehe 6.1.1.13). Im Gegensatz zum normalen RTP-Test wurde, einen Tag vor Beginn der G418-Selektion, die Expression von CREME9 durch Zugabe von AP2167 induziert. Sowohl bei den HeLa (R874 + pCBW24) als auch bei den HeLa (R874 + R850) Zellen wurde AP2167 in Konzentration von 0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM zugegeben, wobei jeweils Dreifachansätze (n = 3) parallel im RTP-Test getestet wurden. Die resultierenden G418 resistenten Kolonien, welche jeweils einem

unabhängigem Retrotranspositionereignis entsprechen, wurden gezählt und graphisch ausgewertet. Dazu wurde jeweils der arithmetische Mittelwert der Dreifachansätze berechnet und die Zahl der Kolonien nach Zugabe von 0 nM AP2167 als Ausgangswert, sowohl bei den HeLa (R874 + pCBW24) als auch bei HeLa (R874 + R850) Zellen, auf 100 % gesetzt. Für die AP2167 Konzentration von 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM wurde die jeweilige prozentuale Retrotranspositionsrate, in Bezug auf den obigen Ausgangswert von 100 % nach Zugabe von 0 nM AP2167, berechnet.

Unabhängig von der Anwesenheit des CREME9, zeigen sowohl die HeLa (R874 + pCBW24) als auch die HeLa (R874 + R850) Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an AP2167 eine deutliche Reduktion der Retrotranspositionsrate (Abb. 29B). Allerdings zeigt sich diese Reduktion der Retrotranspositionsrate erst ab einer AP2167 Konzentration von 10 nM, während bei Konzentrationen von bis zu 1 nM AP2167 weder bei HeLa (R874 + pCBW24) noch bei HeLa (R874 + R850) Zellen signifikante Änderungen der Retrotranspositionsrate zu beobachten sind. Scheinbar wird CREME9 erst ab einer AP2167 Konzentration von über 1 nM signifikant exprimiert oder die Menge an exprimiertem CREME9 muss einen bestimmten Schwellenwert überschreiten, um einen Effekt auf die L1-Retrotranspositionsrate zu erzielen. Nach Zugabe von 10 nM und 100 nM AP2167 zeigen sich nämlich deutliche Unterschiede zwischen den HeLa (R874 + pCBW24) Zellen (Abb. 29C, blaue Kurve) und den HeLa (R874 + R850) Zellen (Abb. 29C, rote Kurve). Bei einer AP2167 Konzentration von 10 nM ist die Retrotranspositionsrate der CREME9 exprimierenden HeLa (R874 + pCBW24) Zellen um ca. 70 % gegenüber den HeLa (R874 + R850) Zellen reduziert (HeLa (R874 + pCBW24) = 18 Kolonien, HeLa (R874 + R850) = 57 Kolonien). Bei einer AP2167 Konzentration von 100 nM beträgt die Reduktion der Retrotranspositionsrate der CREME9 exprimierenden HeLa-R874 Zellen bereits ca. 80 % (HeLa (R874 + pCBW24) = 5 Kolonien, HeLa (R874 + R850) = 26 Kolonien). Obwohl die Konzentration von AP2167 mit 100 nM also nochmals um das Zehnfache erhöht wurde und somit auch die CREME9-Expression in vergleichbarem Maße gesteigert worden sein sollte, ist im Vergleich zu den Resultaten mit 10 nM AP2167 nur noch eine geringfügige Reduktion der Retrotranspositionsrate zu beobachten. Dies spricht für die These, dass der Einfluss von CREME9 nicht linear mit seiner Konzentration wächst, sondern auf dem Erreichen von definierten Schwellenkonzentration beruht.

A



B

AP2167 Konzentration	0 nM	0,1 nM	1 nM	10 nM	100 nM
HeLa (R874 + R850)	 118 119 119 Ø = 119	 139 103 107 Ø = 116	 85 92 128 Ø = 102	 67 55 51 Ø = 58	 19 27 33 Ø = 26
HeLa (R874 + pCBW24)	 109 126 135 Ø = 123	 118 80 145 Ø = 114	 116 100 96 Ø = 104	 19 23 13 Ø = 18	 4 7 5 Ø = 5

C

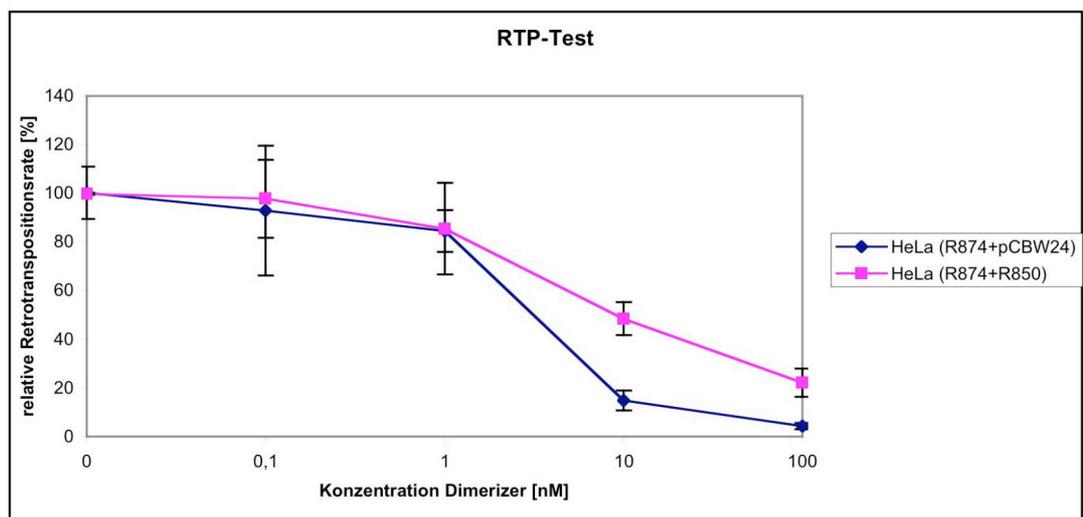


Abb. 29: Ergebnisse des Retrotranspositions-Tests. Der Einfluss von CREME9 auf die L1-Retrotranspositionsfrequenz wurde im RTP-Test überprüft. Verglichen wurde die Zahl der Retrotranspositionereignisse in HeLa (R874 + pCBW24) und HeLa (R874 + R850) Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen AP2167. (A) Funktionsweise des L1-Retrotranspositionstests (nach Moran *et al.*, 1996). (B) Tabelle mit jeweils einem Beispielfoto einer Platte aus dem RTP-Test, den zugehörigen Kolonienzahlen aus dem RTP-Test von jeweils drei unabhängigen Ansätzen pro verwendeter AP2167-Konzentration. (C) Graphische Darstellung der relativen Retrotranspositionsfrequenz bezogen auf den Ausgangswert von 0 nM AP2167, $\bar{\emptyset}$ = arithmetischer Mittelwert

Um auszuschließen, dass die Reduktion der Retrotranspositionsfrequenz auf einen direkten Einfluss von AP2167 auf die Proliferation der Zellen beruht, wurden HeLa-Zellen unter Zugabe unterschiedlichen Konzentration von AP2167 expandiert. Nach 10 Tagen wurden die Zellen gezählt und die Ergebnisse mit denen von unbehandelten HeLa-Zellen verglichen (Ergebnisse nicht gezeigt). Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen beobachtet werden. Somit können toxische Effekte durch AP2167 auf das Ergebnis des RTP-Tests ausgeschlossen werden.

Mit diesem Ergebnis konnten erste Hinweise darauf erbracht werden, dass eine der möglichen Funktionen von CREME9 die negative Regulation der LINE-1 Retrotransposition ist. Möglicherweise verändert die Protein-Protein Interaktion zwischen CREME9 und EN die Zielsequenzerkennung oder die Geschwindigkeit mit der die Ziel-DNA von L1-EN geschnitten wird.

8 Diskussion

8.1 Die Spezifität der Immunreaktionen gegen L1 kodierte Proteine

Obwohl klar gezeigt werden konnte, dass ORF2 essentiell für die Retrotransposition von L1 ist (Feng *et al.*, 1996; Moran *et al.*, 1996), waren bis zum Zeitpunkt meines Eintritts in dieses Dissertationsprojektes, alle Versuche L1-ORF2 kodierte Proteine nachzuweisen, erfolglos (Ostertag and Kazazian, 2001a). In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen Polypeptide der Endonukleasedomäne des humanen L1 erzeugt um ORF2p über immunologische Methoden nachzuweisen. Für den Nachweis von p40, dem L1-ORF1 kodierten Protein stand mit dem polyklonalen AH40.1 Antikörper ein gut verifiziertes Serum zur Verfügung (Leibold *et al.*, 1990), das für die initialen Arbeiten an Gewebeschnitten von menschlichen Hoden eingesetzt wurde. Aufgrund der nachlassenden Reaktivität und zur Neige gehender Mengen, des zur Verfügung stehenden AH40.1 Antikörpers, wurde frisches Antiserum gegen ORF1p im Kaninchen erzeugt.

Zur Kontrolle der Spezifität des anti-EN Antikörpers wurde eine Immunpräzipitation aus HDMEC Lysaten durchgeführt, wodurch im Anschluss zwei Polypeptide mit einem geschätzten Molekulargewicht von 45 kDa und 130 kDa isoliert werden konnten. Das rechnerische Molekulargewicht eines kompletten ORF2p beträgt 149 kDa und liegt damit etwas über dem, des größeren Fragments. Wegen des hohen Molekulargewichts des immunpräzipitierten Polypeptids ist es jedoch unmöglich, eine genaue Aussage zum Molekulargewicht nur anhand der Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Polyacrylamidgel zu machen. Es wäre auch denkbar, dass ein immunpräzipitiertes vollständiges ORF2p aufgrund von starken Sekundärstrukturen und einer ungewöhnlichen Proteinfaltung etwas schneller als normal im Gel wandert. Deshalb könnte das Polypeptid, welches sich im Bereich der 133 kDa Bande des Molekulargewichts-Standards bewegt (Abb. 16C) tatsächlich identisch mit dem von ORF2-kodiertem vollständigen Protein von 149 kDa sein.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der beiden obigen Polypeptide führte zu einer starken Übereinstimmung der resultierenden tryptischen Peptide mit ORF2 Proteinen aus den öffentlichen Datenbanken. Obwohl alle Daten zu den Aminosäuresequenzen der übereinstimmenden tryptischen Peptide des 130 kDa Fragments identisch mit denen eines funktionalen ORF2p sind, besteht trotzdem die Möglichkeit, dass

hierbei um das Produkt einer nicht rk-L1 Kopie handelt, da die übereinstimmenden Peptide nur etwa 13 % der ORF2p Sequenz abdecken. Die tryptischen Peptide, welche durch die massenspektrometrische Analyse identifiziert wurden, sind zudem nicht spezifisch für die so genannten "hot" (hochaktiven), rk-L1 Elemente (Brouha *et al.*, 2003), da sie hauptsächlich in hochkonservierten Bereichen des ORF2p liegen und auch in den sehr viel weniger aktiven Mitgliedern der Ta (L1PA1) Familie vorkommen. Damit unterscheiden sie sich auch nur durch eine einzige Aminosäuresubstitution von den entsprechenden kodierenden Regionen nicht mehr aktiver L1PA2 und L1PA3 Familien der L1 Elemente (Smit *et al.*, 1995). Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei dem isolierten 130 kDa Fragment um ein funktionelles ORF2p handelt könnte eine Mutation in einem anderen Bereich des zugrunde liegenden L1 die Replikationsfähigkeit dieser Kopie negativ beeinflussen.

Der spezifische Fingerabdruck der tryptischen Peptide aus der massenspektrometrischen Analyse des 45 kDa Fragments weist starke Übereinstimmungen mit denen eines mutierten ORF2p von nicht-funktionellen L1PA2 Elementen auf den Chromosomen 1p32 und 1p35 auf (Hohjoh *et al.*, 1990), welches den C-terminalen Bereich des ORF2p repräsentiert. Erstaunlicherweise fehlen in den unvollständigen und mutierten ORF2 Proteinen dieser Elemente die Bereiche, die der anti-EN Antikörper bindet, mit dem die Immunpräzipitation durchgeführt wurde. Da Zinkfinger-Proteine in der Lage sind Protein-Protein Interaktionen zu vermitteln (Frankel *et al.*, 1988; Matthews and Sunde, 2002), wäre es denkbar, dass das 45 kDa Fragment während der Immunpräzipitation über die Cysteinreiche Domäne im C-terminalen Bereich des ORF2p an genau diese Domäne des 130 kDa Fragments gebunden hat und auf diesem Wege kopräzipitiert wurde. Falls diese Hypothese zutrifft und das 45 kDa Fragment nicht direkt von dem anti-EN Antikörper gebunden wird, würde dies bedeuten, dass die immunhistochemische Färbung der HDMECs (Abb. 16B) ausschließlich auf die Erkennung des 130 kDa ORF2p Polypeptides zurückzuführen wäre. Es lässt sich jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen, dass EN-Domänen anderer Herkunft, einschließlich ORF2-spezifischer Polypeptide, zumindest teilweise für die immunhistochemische Färbung der Schnitte aus Hoden, Nebenhoden oder Plazenta verantwortlich sind. Mit den vorliegenden Daten konnte gezeigt werden, dass Immunpräzipitation in Verbindung mit massenspektrometrischen Analysen ein wertvolles Hilfsmittel ist, mit dem sich der Expressionsstatus von sowohl rk-L1 als auch mutierten und inaktiven L1 Elementen in individuellen Zelltypen untersuchen lässt.

Der erste direkte Hinweis auf eine *in vivo* Translation von ORF2 wurde von der Gruppe um Maxine Singer erbracht, die einen L1 Expressionsvektor in die Teratokarzinom-Zelllinie Ntera2D1 einbrachte, in dem ORF2 durch eine lacZ Reporter-kassette ersetzt worden war (McMillan and Singer, 1993). Nach der Transfektion der Zellen konnten β -Gal exprimierende Zellen detektiert werden, was auf eine Translation von ORF2 hinweist. Obwohl die Translationsrate von ORF2 anstieg sobald die Translation von ORF1 gedrosselt wurde, führte die Beendigung der ORF1 Translation zu einem Absinken der ORF2p Expression. Die Tatsache, dass die Fingerabdruck-Analyse der Peptide aus dem Trypsinverdau ausschließlich in ORF2- und nicht in ORF1-spezifischen Peptiden resultierte ist konsistent mit der Annahme, dass ORF1 und ORF2 getrennt translatiert werden (McMillan and Singer, 1993). Die Autoren präsentierten einige Hinweise darauf, dass die Translation des L1 ORF2 an einem intern gelegenen Startpunkt initiiert wird. Als Mechanismus wurde eine Form des "*internal ribosomal entry*" (IRS) oder des "*ribosomal shunting*" vermutet (McMillan and Singer, 1993; Ostertag and Kazazian, 2001a). Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Translation von L1-ORF2 nicht über einen IRS-Mechanismus sondern über eine Neuintiierung am ersten Methionin Codon des L1-ORF2 initiiert wird. Weder ORF1 noch die nicht-kodierende 63 bp "*Spacer*"-Region spielen für die ORF2 Translation eine Rolle. Allerdings ist die 5'-CAP-Struktur der L1-mRNA für eine effiziente Translation von entscheidender Bedeutung (Alisch *et al.*, 2006; Dmitriev *et al.*, 2007).

Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen (Bratthauer and Fanning, 1992), konnten in der vorliegenden Arbeit auch einige Zelltypen in nicht-transformierten Hoden von ausgewachsenen Individuen mit dem AH40.1 Antikörper immunologisch gefärbt werden (siehe Übersicht in Tab. 2). Dies könnte hauptsächlich auf unterschiedliche und inzwischen optimierte Fixier- und Färbemethoden zurückzuführen sein. Während in den früheren Studien Formalin zur Fixierung verwendet wurde, welches eine reduzierte Färbung zur Folge hat (Bratthauer and Fanning, 1992), wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit Bouin'scher Lösung gearbeitet, wodurch die Struktur der Antigene weit weniger beeinflusst und somit die Empfindlichkeit der Nachweisreaktion wesentlich erhöht wird (Kilic, 2001).

Im Hoden von Erwachsenen konnte ORF2p in sämtlichen vaskulären Endothelzellen beobachtet werden, während der Nachweis von ORF1p auf mikrovaskuläre Endothelzellen beschränkt blieb. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre ein niedrigeres Expressionslevel von ORF1p im Vergleich zu ORF2p. Dies steht aber im Widerspruch zu der bisher

gehegten Hypothese, dass ORF2p bis zu eintausendfach niedriger exprimiert wird als ORF1p (Goodier *et al.*, 2004). Möglicherweise weist der, für diese Versuche verwendete, Antikörper AH40.1 (Leibold *et al.*, 1990) eine geringere Affinität auf, als der anti-EN Antikörper und hat zusätzlich nunmehr fast fünfzehn Jahre nach seiner Herstellung bereits viel von seiner Reaktivität eingebüßt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die vergleichsweise hohe ORF2p-Expression auf 5'-verkürzte L1-Elemente zurückzuführen ist. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass solche 5'-verkürzte L1-Elemente zwar kein ORF1p mehr, aber dennoch intaktes ORF2p produzieren können (Dewannieux *et al.*, 2003).

8.2 Die Expression von L1-Proteinen wird gewebe- und entwicklungsspezifisch reguliert

Es konnten bislang keine Faktoren zweifelsfrei identifiziert werden, die eine Replikation des L1 eindeutig auf die Keimbahn begrenzen. Allerdings wurde postuliert, dass das Expressionsmuster von A3F (auch APOBEC3F, *apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like protein 3F*) ein Hinweis auf ein Keimbahn spezifisches Bollwerk gegen L1-Retrotransposition sei (Stenglein and Harris, 2006). Die A3-Proteine sind eine Gruppe von Zn^{2+} -abhängigen DNA Cytidin-Deaminasen von denen bisher sieben verschiedene Proteine A3A - A3H (ohne A3E) identifiziert wurden (Jarmuz *et al.*, 2002; OhAinle *et al.*, 2006). Eine Reihe von Untersuchungen ergab, dass die Replikation von L1 durch die menschlichen Proteine A3A, A3B, A3C und A3D inhibiert wird (Bogerd *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2006; Hulme *et al.*, 2007; Khatua *et al.*, 2010; Kinomoto *et al.*, 2007; Muckenfuss *et al.*, 2006; Stenglein and Harris, 2006). Die inhibitorischen Effekte von A3F, A3G und A3H auf die L1-Replikation werden in der Literatur widersprüchlich beschrieben (Bogerd *et al.*, 2006; Kinomoto *et al.*, 2007; Muckenfuss *et al.*, 2006; Niewiadomska *et al.*, 2007). Die Inhibition der L1-Replikation funktioniert jedoch weitgehend unabhängig von der Cytidin-Deaminase Aktivität der A3 Proteine. Da A3F-, A3D- und A3G-Protein nur im Zytosol von menschlichen Zellen nachgewiesen wurde, wohingegen A3B-Protein im Zellkern lokalisiert ist, scheinen die inhibitorischen Effekte unabhängig von der Lokalisation der A3 Proteine innerhalb der Zelle zu sein (Koito and Ikeda, ; Koito and Ikeda, 2011; Stenglein and Harris, 2006). Untersuchungen von knapp 50 verschiedenen menschlichen Geweben konnten eine starke

A3F-Expression in den Samenkanälen von Hodengewebe (Uhlen *et al.*, 2005), Hodengewebe und Eierstöcken (Jarmuz *et al.*, 2002; Koning *et al.*, 2009; OhAinle *et al.*, 2006) sowie embryonalen Stammzellen (Bogerd *et al.*, 2006) zeigen. Dies deutet auf eine physiologische Rolle der A3-Deaminasen beim Schutz dieser Zellen und Gewebe vor den potentiell negativen Effekten einer L1-Aktivierung hin (Schumann *et al.*, 2010). Ausgehend von der Hypothese, dass die A3 Proteine ein Abwehrmechanismus gegen Retroviren und Retroelemente bilden, würde man erwarten, dass A3 Proteine in den Geweben exprimiert werden, in denen auch L1-Expression stattfindet. Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Expression beider offener Leserahmen von L1 in verschiedenen Zelltypen innerhalb der Samenkanälen von Hodengewebe, in denen auch A3F-Protein nachgewiesen werden konnte, würde im Einklang mit dieser Hypothese stehen. Es gab verschiedene Hinweise darauf, dass Mitglieder aus der Familie der SOX Transkriptionsfaktoren, RUNX3 und der ubiquitäre Transkriptionsfaktor YY1 an der Regulation der L1-Transkription beteiligt sein könnten (Becker *et al.*, 1993; Tchénio *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003). Methyl-CpG bindende Proteine, die den Methylierungsstatus von DNA erkennen, scheinen ebenfalls starken Einfluss auf die L1 Expression zu haben (Yu *et al.*, 2001). MeCP2, ein starker Repressor der Transkription von methylierten L1 Elementen (Muotri *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2001), wird nämlich in fast jedem Gewebe von Säugern exprimiert, fehlt aber in Keimzellen von Menschen und Mäusen völlig (Muller *et al.*, 2000). Auch Untersuchungen an menschlichen embryonalen Stammzellen, die zeigten, dass exprimierte L1-Elemente mehrheitlich innerhalb von Genen lokalisiert sind, unterstützen die These einer epigenetischen Kontrolle der L1-Expression (Macia *et al.*, 2010). Die vorliegenden Ergebnisse aus dieser Arbeit bestätigen diese Vermutung, denn sie zeigen die Anwesenheit von sowohl ORF1- als auch ORF2-Translationsprodukten in unterschiedlichen Stadien der männlichen Keimbahnentwicklung (nochmals zusammengefasst in Tab. 2). In der fötalen Entwicklung (Woche 18) konnte die Koexpression der beiden offenen Leserahmen sowohl in basal als auch zentral im Lumen organisierten Prä spermatogonien des embryonalen Hodens nachgewiesen werden, während in der späteren fötalen Entwicklung (Woche 28) die Koexpression auf die Zellschicht des basalen Tubulus beschränkt blieb. Es ist unklar, ob die L1-Expression bereits während der Migration der Prä spermatogonien beginnt oder erst nach der Besiedelung der Samenkanälchen. Immunfärbungen deuten darauf hin, dass ORF1p (Bratthauer *et al.*, 1994) und auch ORF2 Proteine (Abb. 19A bis D) im Zytoplasma der L1 exprimierenden Zellen lokalisiert sind.

Im Hodengewebe ausgewachsener Individuen konnte mittels Immunfärbung der Nachweis von Translationsprodukten beider ORFs in Spermatozyten und unreifen Spermatiden erbracht werden, aber in Spermatogonien, den Stammzellen des Keimepithels fehlte jeder Nachweis (Abb. 18 und zusammengefasst in Tab. 2). Somit scheint die Expression von L1 angeschaltet zu werden nachdem die ruhenden Spermatogonien sich zu unreifen Spermatozyten differenziert haben, die anschließend in die Meiose I eintreten. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen früherer Forschungen, wonach sowohl die komplette L1-RNA als auch ORF1-Protein zwar in Spermatozyten aus dem Hoden von noch nicht geschlechtsreifen Mäusen vorhanden sind, aber in den Spermatogonien dieser Tiere völlig fehlen (Branciforte and Martin, 1994). Letztlich konnte vor Kurzem in Mäusen, die eine humane L1-GFP-Retrotranspositionsreporterkassette als Transgen trugen, *de novo* Retrotransposition in Keimzellen nachgewiesen werden (Ostertag *et al.*, 2002). Somit konnte L1-Retrotransposition eines markierten L1-Elements erstmalig in einem lebenden Organismus gezeigt werden. Zusätzlich zur *de novo* Retrotransposition in Keimzellen konnten wenig später mehrere unabhängige Retrotranspositionereignisse während der frühen Embryonalentwicklung der Maus nachgewiesen werden (Prak *et al.*, 2003), was sich ebenfalls mit den hier gemachten Beobachtungen zur Expression beider L1-Proteine im embryonalen Gewebe von Menschen deckt (Tab. 2). Allerdings bestätigen einige Fälle von Tumorerkrankungen im Menschen, die auf L1-Retrotranspositionereignisse in Onkogene zurückzuführen sind (Tab. 1), die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, dass eine L1-Retrotransposition in somatischen Zellen durchaus stattfinden kann (Miki, 1998). Zusammengefasst implizieren die Ergebnisse dieser Arbeit deshalb, dass L1 kodierte Proteine in differenzierenden und proliferierenden Zellen des Keimepithels hochreguliert und besonders stark exprimiert werden. Wenn man davon ausgeht, dass diese Proteine funktional sind, würde ihre Anwesenheit in diesen Zellen die Voraussetzung für eine erfolgreiche Retrotransposition schaffen, die an die folgenden Generationen vererbt wird. Somit könnten Spermatozyten und unreife Spermatiden Zelltypen darstellen, in denen zumindest ein Teil der vererbten Retrotranspositionereignisse stattfinden, die bisher zu einer L1-Kopienzahl von etwa 1 Million im menschlichen Genom geführt haben.

8.3 Funktionelle Bedeutung von L1 kodierten Proteinen für den Wirtsorganismus

Eine mögliche Begründung für die Beobachtung, dass in einigen Zellen zwar ORF2p aber nicht ORF1p detektiert werden konnte, wäre die Expression von 5'- verkürzten L1 Kopien, die zwar einen vollständigen ORF2 kodieren aber nur einen Teil des ORF1 beinhalten. Solche Elemente mit einem funktionellen *orf2* aber einem unterbrochenen *orf1* Gene, wären zwar nicht mehr in der Lage ihre eigene Transposition zu bewerkstelligen (Moran *et al.*, 1996) oder prozessierte Pseudogene zu produzieren, jedoch wäre für eine Mobilisierung von *Alu*-Elementen ein funktionelles ORF2p ausreichend (Dewannieux *et al.*, 2003). Daher wäre die Synthese von ORF2 Proteinen aus unvollständigen L1 Elementen auch eine mögliche Quelle von RT, die sowohl in somatischen Zellen als auch in der Keimbahn die Retrotransposition von SINE Elementen katalysieren könnte. So tragen nicht nur rk-L1 zu Verbreitung retrotransposabler Elemente im Wirtsorganismus bei, sondern auch L1 Kopien, denen zwar ein funktioneller ORF1 fehlt, die jedoch einen funktionellen ORF2 besitzen.

Das Polypeptid welches im Rahmen dieser Arbeit durch Immunpräzipitation aus HDMEC Lysaten isoliert wurde hatte ein rechnerisches Molekulargewicht von nur 130 kDa. Wie bereits im ersten Kapitel der Diskussion erläutert wurde, könnte es sich bei diesem Polypeptid zwar durchaus um eine vollständiges ORF2p gehandelt haben, aber ebenso gut auch um ein verkürztes ORF2p. Aufgrund der Lage der RT-Domäne etwa mittig innerhalb des ORF2p sollte auch ein 130 kDa Fragment des ORF2p eine funktionelle RT beinhalten. Die L1 kodierte RT-Aktivität wiederum scheint eine wichtige Rolle bei Proliferation und Differenzierung von transformierten Zellen sowie der Tumorgenese zu spielen. Das funktionelle Abschalten der L1-Expression durch RNAi in der menschlichen Melanoma-Zelllinie A-373 führte zu einer reduzierten Proliferationsrate bei gleichzeitig vermehrter morphologischer Differenzierung der Zellen. Hierbei konnte eine Veränderung des Expressionsmusters wichtiger Markergene der Zelldifferenzierung nachgewiesen werden, sowie ein deutlich reduziertes Tumorstadium im Mausmodell (Oricchio *et al.*, 2007). Weitere Versuche in Mäusen deuten darauf hin, dass eine Reduktion der RT-Aktivität in Embryonen zum Stopp der weiteren Entwicklung im 1- bis 4-Zellstadium führen (Pittoggi *et al.*, 2003). Dieser Entwicklungsstopp der Embryonen geht ebenfalls einher mit einer umfassenden Änderung des Expressionsmusters wichtiger Gene und führte zur

Schlussfolgerung, dass die Expression von L1 für die frühe Embryonalentwicklung essentiell sei (Beraldi *et al.*, 2006). Geht man davon aus, dass das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte 130 kDa Polypeptid ein unvollständiges Fragment von ORF2p eines nicht-replikationskompetenten L1 darstellt, jedoch eine funktionelle RT besitzt, ergeben sich völlig neue Implikationen. Mit der Expression eines solchen L1-ORF2 ließe sich die RT-Aktivität für die Embryonalentwicklung zur Verfügung stellen, ohne die schädlichen Risiken durch Mutation zu riskieren, welche RT-kompetente L1 für die Zellen darstellen.

Die in Kapitel 7.1.3 gezeigte Expression von ORF1- und ORF2-kodierten Proteinen in verschiedenen somatischen Zelltypen, wie Sertoli-, Leydig- und Epithelzellen des Nebenhodens, in Synzytiotrophoblasten der Plazenta und in vaskulären Endothelzellen stimmt mit den Ergebnissen der früheren Studien in Mäusen überein. Hier wurde L1Md-ORF1p außer im Zytoplasma von embryonalen Spermatozyten, Spermatozyten und Spermatischen auch in Leydigzellen und Synzytiotrophoblasten der Plazenta gefunden (Branciforte and Martin, 1994; Trelogan and Martin, 1995). Aufgrund der Immunreaktionen in Leydigzellen des Hodengewebes und in Thecazellen des Ovars von Mäusen postulierten Trelogan und Martin (Trelogan and Martin, 1995) einen möglichen Zusammenhang zwischen der L1 Expression und der Produktion von Steroidhormonen. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden, da die Expression von L1 Proteinen außer in Leydigzellen und Synzytiotrophoblasten auch in somatischen Zelltypen nachgewiesen wurde, die keine Steroidhormone produzieren. Jedoch zeichnen sich alle somatischen Zelltypen, die in den vorliegenden immunhistochemischen Experimenten gefärbt werden konnten, durch das Vorhandensein von Rezeptoren aus, die entweder auf Androgene oder Progesteron ansprechen (Ergun *et al.*, 1997). Weitere Untersuchungen könnten klären, ob es eine klare Verbindung zwischen der Anwesenheit dieser Steroidrezeptoren und der verstärkten Expression von L1 in bestimmten somatischen Zellen gibt.

Synzytiotrophoblasten bilden die entscheidende Barriere zwischen embryonalem und mütterlichen Blut. Gleichzeitig sind Synzytiotrophoblasten der Sitz fast aller synthetischen und endokrinen Leistungen der Plazenta (Hinrichsen, 1993). Die Entstehung und Regeneration der Synzytiotrophoblasten wird durch die Proliferation und synzytiale Verschmelzung von Trophoblasten gewährleistet (Boyd and Hamilton, 1970). Obwohl es seit mehreren Jahren bekannt ist, dass die hohe Expression endogener menschlicher Retroviren eines der spezifischen Charakteristika von Synzytiotrophoblasten ist, so ist es doch bemerkenswert, dass signifikante Mengen von L1 Proteinen in demselben Zelltyp

exprimiert werden. Während sich die Hinweise mehren, dass die Expression menschlicher endogener Retroviren für die Fusion von Zellen und damit für die Bildung der Synzytiotrophoblasten in der Plazenta von entscheidender Bedeutung ist (Frendo *et al.*, 2003), bleibt offen, welche Bedeutung L1 kodierten Proteinen in den Synzytiotrophoblasten der Plazenta zukommt. Betrachtet man die Hinweise darauf, dass L1-Proteine eine Funktion bei Differenzierung und Proliferation von Zellen haben (Sciamanna *et al.*, 2005) und insbesondere bei der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielen (Beraldi *et al.*, 2006), erscheint es plausibel, dass die, im Rahmen dieser Arbeit in Synzytiotrophoblasten nachgewiesenen, L1-Proteine eine funktionelle Bedeutung für die Zellen haben.

Experimente mit fötalem Hodengewebe und Plazenta zeigten eine starke ORF2p-Expression in Endothelzellen ausdifferenzierter Blutgefäße, während ORF2p in unreifen Gefäßen nicht nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die ORF2p-Expression während der Reifung der Endothelzellen stark ansteigt, oder aber erst ab einem bestimmten Entwicklungsstadium angeschaltet wird. Auch ORF1p konnte in vaskulären Endothelzellen der untersuchten Gewebeprobe nachgewiesen werden (Vergleich Tab. 2), jedoch erschien die Immunreaktivität insgesamt schwächer als bei ORF2p. Außerdem zeigte sich kein solch ausgeprägter Unterschied in der Immunreaktion von Endothelzellen ausdifferenzierter Blutgefäße und der Immunreaktion in unreifen Gefäßen, wie das bei ORF2p gezeigt werden konnte. Falls die nachgewiesenen L1 Proteine in vaskulären Endothelzellen funktionsfähig sind und Retrotransposition in diesen Zellen stattfindet, wäre dies eine überraschende Beobachtung, da Endothelzellen sogar in Tumoren im Allgemeinen als genetisch besonders stabil gelten (Hida *et al.*, 2004; Line *et al.*, 2005). Bedenkt man zudem, dass somatische Retrotranspositionereignisse aus evolutionärer Sicht keinerlei Vorteile bieten und in eine Sackgasse führen, da neue L1-Insertionen in diesen Zellen nicht an die Nachkommen weitergegeben werden können, würde man eigentlich erwarten, dass im Laufe der Evolution ein Mechanismus etabliert wurde, der somatische Zellen vor den negativen Aspekten der L1-Retrotransposition schützt. Während dies auf die meisten somatischen Zelltypen zuzutreffen scheint, deutete die hohe Menge an L1 kodierten Proteinen, die im Rahmen dieser Arbeit in ruhenden Endothelzellen nachgewiesen wurde und ihre offensichtliche Anreicherung in diesen Zellen während der Reifung von Blutgefäßen auf eine funktionale Bedeutung L1 kodierter Proteine für Vaskularisierung und/oder Angiogenese hin. Neuere Untersuchungen mit dem von mir im Rahmen dieser Arbeit generierten anti-EN AK unterstützen diese Hypothese

und zeigten eine starke Expression von ORF2p in Endothelzellen verschiedener Gewebetypen. In den Endothelzellen aus korrespondierenden Tumoren dieser Gewebe war jedoch keine ORF2p-Expression nachweisbar (Banaz-Yasar *et al.*, 2010). Zusätzlich führte L1-Retrotransposition in PAE-Zellen (*porcine aortic endothelial cells*) zu verminderten Proliferations- und Migrationsraten. Deshalb wurde vermutet, dass neue L1-Retrotranspositionereignisse die Angiogenese und Tumervaskularisierung von vaskulären Endothelzellen hemmen könnten (Banaz-Yasar *et al.*, 2010). Da Endothelzellen im Fokus von Tumorthera­pieansätzen stehen, die auf eine Hemmung der Angiogenese abzielen (Folkman, 2003), ist es hochrelevant weiter zu untersuchen, ob und wie L1 Proteine das Wachstum und die Entwicklung von Endothelzellen, insbesondere in Tumoren, beeinflussen.

8.4 Einfluss des Zellzyklus auf die Expression und Lokalisation von L1-Proteinen

Immunfluoreszenzaufnahmen zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von L1-Proteinen in 2102Ep-Zellen zeigen eine punktuelle, gesprenkelte Verteilung der Immunreaktivität (Abb. 21), die darauf hindeutet, dass ORF1p und ORF2p in größeren Aggregaten vorliegen. Bereits in F9-Zellen der Maus konnte diese gesprenkelte Verteilung von endogenem ORF1p im Zytoplasma gezeigt werden (Martin and Branciforte, 1993), wobei ORF1p weder mit dem Golgi-Apparat noch mit Lysosomen oder dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert war.

Die Immunfluoreszenz, die durch beide L1-Proteine hervorgerufen wurde, war zwar auch im Zytoplasma der Zellen deutlich zu erkennen, hat sich aber überwiegend im Zellkern manifestiert. Eine Kolokalisation von ORF1p und ORF2p konnte sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Da die Retrotransposition von L1, und somit die Integration einer neuen L1-Kopie in die Wirtzell-DNA im Zellkern stattfindet, würde dies die Lokalisation im Zellkern erklären. Die Ribosomen als Orte der Proteinproduktion jedoch befinden sich im Zytoplasma und der hier gelungene Nachweis von granulären Strukturen mit ORF1p und ORF2p im Zytoplasma zeigt, dass die Proteine nicht sofort in den Zellkern transportiert werden sondern in definierten Kompartimenten des Zytoplasmas akkumulieren. Betrachtet man die *cis*-Präferenz der L1-Proteine für die L1-Transkripte von denen sie exprimiert werden (Kulpa and Moran, 2006; Wei *et al.*, 2001) in Verbindung mit

dem Nachweis von RNPs als wichtigen Zwischenschritt der Retrotransposition (Kulpa and Moran, 2005), ließen sich diese Ergebnisse dahingehend interpretieren, dass diese RNPs bereits im Zytoplasma gebildet werden und erst anschließend in den Zellkern verbracht werden.

Mit Fluorochromen markierte und überexprimierte L1Hs-Proteine führten auch zur Formation von ORF1p- und ORF2p-Aggregaten im Zytoplasma von HeLa-Zellen (Goodier *et al.*, 2004). Im Zellkern konnten mit dieser Methode nur in wenigen Zellen L1-Proteine nachgewiesen werden, wobei diese hauptsächlich auf die Nukleoli beschränkt blieben. Dieser Unterschied zu den hier vorliegenden Ergebnissen, welche eine stärkere Kernlokalisierung zeigen, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Gruppe um Goodier im Wesentlichen mit markierten, rekombinanten Proteinen und nicht mit endogenem ORF1p und ORF2p gearbeitet hat. Wichtiger ist vermutlich jedoch die Tatsache, dass die in dieser Arbeit verwendete zytoskelettale Extraktion, für die Antikörper einen wesentlich besseren Zugang zum Zellkern gewährleistet, als die simple Permeabilisierung der Zellmembran durch ein PBS70,2 % Triton X-100 Gemisch, wie von Goodier praktiziert (Goodier *et al.*, 2004).

ORF2 kodierte Proteine konnten mittels Immunzytochemie auch in somatischen, primären HDMEC-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 16B). Auffällig an diesem Ergebnis war die Beobachtung, dass nur ein Teil der Zellen ORF2 kodierte Proteine exprimiert, und diese Zellen mehr oder weniger gleichmäßig in der Population verteilt sind. Wären spezifische Mutationen in einzelnen HDMEC-Zellen innerhalb der Population verantwortlich für An- bzw. Abwesenheit der ORF2-Proteine, so würden diese Mutationen an Tochterzellen weitergegeben werden, und man würde zusammenhängende ORF2p exprimierende Kolonien bzw. Zellverbände erwarten. Ein zufälliges An- und Abschalten der Expression der ORF2-Proteine in den HDMEC-Zellen ist sehr unwahrscheinlich. Daher ist die wahrscheinlichste Hypothese, dass die ORF2p-Expression, entsprechend der unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus in denen sich die Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung für die Färbung befanden, stark variiert. Im Falle der mit L1 verwandten Non-LTR-Retrotransposons HeT-A und TART in *Drosophila* wurde bereits beobachtet, dass Aggregate aus Fusionsproteinen während der Mitose ihre Lokalisation veränderten (Rashkova *et al.*, 2002b). Für den passiven Übertritt von Proteinen vom Zytoplasma in das Kernkompartiment während der Mitose, die sich durch die Abwesenheit der Kernmembran auszeichnet, ist kein Kernlokalisierungssignal (KLS) erforderlich. Für das menschliche L1 gibt es Hinweise auf zwei potentielle KLS im ORF2p im Bereich der Aminosäurereste 1 -

100 und 1000 - 1100 (Goodier *et al.*, 2004). Genauere Untersuchungen zeigten, dass nur die KLS im Bereich der Aminosäurereste 1 - 100 eine Kernlokalisierung von GFP als Markerprotein ermöglichte und die fraglichen KLS im Kontext des vollständigen ORF2p möglicherweise zu schwach oder maskiert sind um für den effektiven Transport des Proteins durch die Kernmembran in Frage zu kommen (Goodier *et al.*, 2004).

Die Gesamtheit dieser Resultate ließe sich in einer einfachen Hypothese zusammenfassen. LINE-1 wird während des Zellzyklus differentiell exprimiert, um mit minimalem Aufwand und Schaden für die Wirtszelle eine erfolgreiche Retrotransposition zu ermöglichen. Dazu wird die Expression zum Zeitpunkt der Zellteilung, wenn die Kernmembran zusammenbricht, stark erhöht, um so den Zugang des L1-Replikationskomplexes zur DNA zu gewährleisten. Damit wird zusätzlich der Schaden durch die Endonukleaseaktivität des ORF2p begrenzt, da zu diesem Zeitpunkt die gesamte DNA-Reparaturmaschinerie die maximale Aktivität aufweist. Aus diesem Grund bräuchten die L1-Proteine letztlich kein aktives KLS, da sie während der Mitose passiv in den Zellkern gelangen. Neuere Ergebnisse zu Retrotransposition von L1 in Zellzyklus-arretierten Zellen widersprechen jedoch dieser Hypothese. Retrotransposition konnte nämlich auch in Zellen nachgewiesen werden, die in der G1/S-Phase arretiert waren, in welcher die Kernmembran den Zellkern vom Zytoplasma abgrenzt (Kubo *et al.*, 2006). Dies spräche für einen aktiven Transport der L1-Proteine oder RNP-Komplexe durch die Kernmembran. Die Frage, wie die L1-Replikationsmaschinerie in das Kernkompartiment gelangt bleibt somit unbeantwortet. Die Antikörper, welche in dieser Arbeit charakterisiert wurden, sind ein nützliches Werkzeug, um die Lokalisation von L1-ORF1p und L1-ORF2p zu detektieren und diese Frage weiter zu untersuchen.

8.5 Beteiligung von zellulären Faktoren am L1-Retrotranspositions Vorgang

Viele Variablen bestimmen den Erfolg der Suche nach Wirtsfaktoren, die an der L1-Retrotransposition beteiligt sind. Eine Variable ist das Zeitfenster während der zellulären Entwicklung, in dem nach Faktoren gesucht wird. Eine andere Variable ist der Teil der L1 kodierten Retrotranspositionsmaschinerie, die als Köder für die Suche nach Wirtspoteinen gewählt wird.

Wirtskodierte Faktoren könnten in verschiedenen Phasen des L1-Replikationszyklus mit der L1-Maschinerie interagieren, wie z.B. beim Export der L1-mRNA aus dem Zellkern, bei der Translation oder Prozessierung der L1 kodierten Proteine, bei der Bildung des RNP-Komplexes, dessen Wiedereintritt in den Zellkern, bei der Initiation der L1 Insertion durch das Generieren eines DNA-Einzelstrangbruches oder während der Zweitstrangsynthese mit anschließender Reparatur der Strangbrüche (Abb. 4, L1-Replikationszyklus). Es wurde bereits gezeigt, dass das menschliche Protein NXF1 (*nuclear export factor 1*), auch bekannt als TAP (*tip associated protein*) in der Lage ist L1-RNA zu binden, weshalb vermutet wurde, dass NXF1 als Wirtsfaktor für den Export der L1-RNA aus dem Zellkern essentiell ist (Lindtner *et al.*, 2002). Deshalb scheint der Zeitpunkt der eigentlichen Insertion in die genomische Zielsequenz Ansatzpunkte für eine Interaktion mit Wirtsfaktoren zu bieten. Die indirekte Beteiligung zelluläre Proteine bei der L1-Insertion wurde bereits nachgewiesen. So wurde gezeigt, dass fehlende DNA-Reparaturproteine die Zahl von Einzel- und Doppelstrangbrüchen stark ansteigen lässt, was sich wiederum in einer gesteigerten L1-Retrotranspositionsrate widerspiegelt (Morrish *et al.*, 2002). Die zuvor beschriebene Hypothese, dass L1-Proteine während der Mitose passiv in den Zellkern der Wirtszelle vordringen (unter 8.4), würde ebenfalls gut zu einer möglichen Beteiligung von DNA-Reparaturenzymen an der L1-Insertion passen. Während der Mitose ist die gesamte DNA-Reparaturmaschinerie maximal exprimiert, so dass eine optimale Verfügbarkeit dieser potentiellen Kofaktoren gewährleistet wäre.

Da ORF2p mit seinen enzymatischen Funktionen über den Mechanismus der TPRT zuvor die Erststrangsynthese bei der L1-Replikation initiieren kann, allerdings in Abwesenheit von zellulären Proteinen weder in der Lage ist, die Anhaftung des 5'-Endes der L1-cDNA noch die Zweitstrangsynthese zu initiieren (Cost *et al.*, 2002), wurde diskutiert, dass ORF2p für diese Aktivitäten die Interaktion mit Wirtsfaktoren benötigen könnte. Laut Herstellerangaben für das hier eingesetzte 2-Hybrid System, ist ORF2p mit seinen 1276 AS zu groß, um in seiner Gesamtheit als Köderprotein in einer erfolgreichen 2-Hybrid Analyse in Hefe eingesetzt zu werden. Polypeptide, die als Köderproteine für 2-Hybridanalysen eingesetzt werden, sollten demnach nicht mehr als 300 AS umfassen. Die EN-Domäne ist als Initiator der L1-Insertion für Erkennung und Spaltung der genomischen Ziel-DNA verantwortlich (Cost and Boeke, 1998; Morrish *et al.*, 2002; Zingler *et al.*, 2005), und muss daher in einem exponierten, und damit für Wirtsfaktoren zugänglichen Bereich des ORF2p platziert sein (Weichenrieder *et al.*, 2004). Wegen ihrer zentralen Bedeutung für die L1-Replikation wurde die EN-Domäne als ein aussichtsreicher Kandidat

für eine mögliche Interaktion mit zellulären Proteinen angesehen und daher in der vorliegenden Arbeit als Köder für die 2-Hybrid Studien in Hefe eingesetzt.

Neben der für L1-EN kodierenden Nukleotidsequenz wurden die für L1-ORF1p und L1-ORF1p_{Δ120} kodierenden Sequenzen in den Köderexpressionsvektor pGBKT7 (Abb. 23) kloniert, um auch diese L1 kodierten Proteine mit Hilfe des 2-Hybrid Systems auf Interaktionspartner zu untersuchen. Diese Konstrukte können auch als Basis für die Identifizierung möglicher Protein-Protein Interaktionen zwischen L1 kodierten Proteinen dienen. Für das LTR-Retrotransposon Tf1 aus *Schizosaccharomyces pombe* konnte bereits gezeigt werden, dass 2-Hybrid Analysen in *Saccharomyces cerevisiae* ein wertvolles Hilfsmittel zur systematischen Durchmusterung möglicher Interaktionen zwischen den einzelnen Genprodukten eines Retrotransposons darstellen (Steele and Levin, 1998). Insgesamt wurden hierbei 54 Möglichkeiten der Interaktion zwischen den einzelnen Genprodukten des Retrotransposons durch Hefe 2-Hybrid Analysen getestet und positive Interaktionen über GST-Fällungen verifiziert. Eine solche systematische Durchmusterung der einzelnen Domänen von L1-ORF1p und ORF2p könnte klären, inwieweit L1-Proteine in der Lage sind untereinander Homo- oder Heteromere zu bilden. Dies wäre ein wichtiger Schritt die mögliche Zusammensetzung des L1 RNP-Komplexes zu entschlüsseln.

Die Arbeitsgruppe um J. D. Boeke (Department of Molecular Biology and Genetics, Johns-Hopkins-University School of Medicine, Baltimore, USA), die ebenfalls 2-Hybrid Studien mit der L1-EN Domäne als Köderprotein durchgeführt hat, identifizierte unter anderem IKappaB als möglichen EN-Interaktionspartner (J. D. Boeke, persönliche Kommunikation). Als möglicher Mechanismus wurde postuliert, dass durch die Interaktion von IkappaB mit der Endonuklease, über seinen natürlichen Bindungspartner, den Transkriptionsfaktor NFkappaB, eine inhibitorische Wirkung auf die L1-Retrotransposition ausgeübt wird. In den Hefe 2-Hybrid Analysen der vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion von IkappaB mit L1-EN nicht nachgewiesen werden. Allerdings verwendet das, für die Überexpression im RTP-Test verwendete ARIAD-System, die p65 Untereinheit des menschlichen NFkappaB als Teil der hochaktiven Aktivierungsdomäne S3H (Schmitz and Baeuerle, 1991). Mögliche Einflüsse auf die Resultate des RTP-Tests durch Wechselwirkungen zwischen CREME9 mit den chimären Transkriptionsfaktoren des ARIAD-Systems müssen daher in Betracht gezogen werden.

Mit Hilfe von 2-Hybrid Studien wurden Keratin-bindendes Protein K6irs2, Ubiquitin-konjugiertes Enzym (UBE2I), Acrosin-bindendes Protein (ACRBP), Zytokin-Rezeptor ähnliches Molekül 9 (CREME9), sowie zwei unbekannte Peptide als potentielle

Interaktionspartner von L1-EN identifiziert. Im Rahmen meiner Dissertation wurde die CREME9-EN Interaktion mittels GST-Fällung verifiziert (Kapitel 7.2.6). Die Bestätigung der Interaktion mit ACRBP soll im Rahmen zukünftiger Arbeiten durchgeführt werden.

8.6 CREME9 als potentieller Repressor der L1 Retrotransposition

Die Immunblotanalyse nach GST-Fällung des CREME9-AD-Fusionsproteins mit L1-EN zeigt ein Muster aus drei dicht beieinander liegenden Banden im Bereich von 35 - 43 kDa (Abb. 27C). Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem Immunblot zur Kontrolle der Expression von CREME9, welches von den cDNAs der 2-Hybrid Kandidaten 4.10.16, 4.10.6 und 4.10.20 kodiert wird (Abb. 25C), zeigt sich ebenfalls das Drei-Banden-Muster. Für den Kandidaten 4.10.16, welcher für die GST-Fällung eingesetzt wurde, liegen die detektierten Banden in einem Bereich mit einem deutlich höherem MW von ca. 50 - 65 kDa. Bei der Differenz zwischen den detektierten Banden nach GST-Fällung (35 - 43 kDa) und der Kontrolle der Expression der cDNA Kandidaten (50 - 65 kDa) handelt es sich fast exakt um die MW-Differenz von rechnerisch 18,9 kDa, die der AD-Anteil zu dem Fusionsprotein beiträgt. Dies könnte bedeuten, dass das CREME9-AD Fusionsprotein während des GST-Fällungsexperiments im Bereich des leicht zugänglichen Linkers zwischen AD-Domäne und CREME9 degradiert wurde und nur das reine CREME9 ohne die AD-Domäne im Experiment gefällt wurde. Da im Immunblot Abb. 25C das degradierte CREME9 ohne AD-Domäne nicht als signifikante Bande nachweisbar war, kann man davon ausgehen, dass nur ein Bruchteil des CREME9-AD-Fusionsproteins degradiert wurde und als reines CREME9 vorliegt. Da dieses reine CREME9 während der GST-Fällung trotzdem so stark angereichert wurde, dass das CREME9-AD-Fusionsprotein in Abb. 27C nicht mehr zu detektieren ist, muss das reine CREME9 eine um mehrere Potenzen höhere Affinität zu EN haben als das CREME9-AD Fusionsprotein.

In der Literatur finden sich nur wenige Hinweise auf eine mögliche Funktion von CREME9. Eine mögliche Beteiligung von CREME9 an der phänotypischen Ausprägung von Neurofibromatose Typ 1 (NF1) wurde von einer Arbeitsgruppe postuliert, nachdem sie nachweisen konnten, dass CREME9 eines der Gene ist, welches von den Mikrodeletionen bei Patienten mit NF1 betroffen ist (Jenne *et al.*, 2003; Jenne *et al.*, 2001). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass CREME9 ein negativer Regulator sei, der in der G1/G0-Phase des Zellzyklus auftreten könnte (Yang *et al.*, 2009). Eine Überexpression von

CREME9 führte in 293T-Zellen zu einer signifikanten Zellzyklusarretierung in der G1/G0-Phase und verhinderte, dass die Zellen in die S-Phase eintraten (Yang *et al.*, 2009). Die Inhibierung der CREME9 Expression mittels siRNA wiederum verringerte die Anzahl der Zellen in der G1/G0-Phase. Datenbankrecherchen ergaben die im Anhang gezeigte Nukleotidsequenz, wobei offen bleibt, ob diese Sequenz und damit das, für die vorliegenden RTP-Tests verwendete CREME9 vollständig ist. Die acht Exons der dargestellten Sequenz verteilen sich über einen Bereich von etwa 40 kb des Chromosom 17. Dies entspricht den Ergebnissen aus der Literatur, in welchen CREME9, das auch als *p48.2* Protein bezeichnet wurde, ebenfalls als Polypeptid von 438 AS Länge beschrieben wird. Allerdings wird zusätzlich postuliert, dass durch alternative Spleißen zwei unterschiedliche Spleißvarianten von CREME9 generiert werden können (Yang *et al.*, 2009). Computeranalysen ergaben mit einer geringen Wahrscheinlichkeit die Existenz einer Transmembranregion im Bereich der AS-Reste 409 - 438, wobei das N-terminale Ende wahrscheinlich im Inneren der Zelle liegt. Insgesamt sollte das Protein am wahrscheinlichsten in kompakter globulärer Form vorliegen. Wichtigstes Merkmal ist eine Fibronectin 3 Domäne, weshalb CREME9 in die Gruppe der Zytokinrezeptor-ähnlichen Moleküle eingeordnet wurde. Recherchen in öffentlichen Datenbanken ergaben, dass ESTs (Expressed Sequence Tags) von CREME9 hauptsächlich in Hirn- und Hodengewebe, aber auch in Eierstöcken und Darmepithel detektiert werden konnten. Vergleichende Expressionsanalysen zeigten außerdem, dass CREME9 in Hautkrebszellen etwa 1,5 fach höher exprimiert wird als in normalen Hautzellen (Nindl *et al.*, 2006). Die Expression in Hoden konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da im Verlauf der Hefe 2-Hybrid Analysen CREME9 aus einer Hoden cDNA-Bank isoliert wurde. Später konnte das 5'-Ende von CREME9 aus RNA-Isolaten des Hodens kloniert werden. Neue Erkenntnisse beweisen, dass L1 *de novo* Retrotransposition sowohl in adulten neuronalen Vorläuferzellen der Ratte *in-vitro* als auch im Gehirngewebe von Mäusen, die ein aktives humanes L1-Element als Transgen tragen, *in vivo* stattfindet (Muotri *et al.*, 2005). Da CREME9 neben dem Hoden besonders stark im Hirn exprimiert wird, könnte auch hier ein Zusammenhang zur Aktivität von L1 in diesem Gewebe bestehen.

5'-RACE Experimente auf RNA-Ebene zur Klonierung einer vollständigen cDNA, die über die bisher bekannte Sequenz hinaus geht, blieben ohne Ergebnis, was vermutlich an dem niedrigen Expressionslevel von CREME9 in den verwendeten Geweben liegt (Daten nicht gezeigt). Keines der beiden potentiellen ATG Startcodons an den Positionen 1 und -12 (siehe Anhang) wird von einer definierten Kozak-Sequenz begleitet, wie sie für den

Start der Translation in Eukaryonten typisch ist. Falls CREME9 größer sein sollte als bisher angenommen, könnte der bisher fehlende Teil des Proteins weitere Funktionen vermitteln, welche die L1-Retrotransposition stärker beeinflussen, als die unten beschriebenen Effekte vermuten lassen.

Unter Anwendung des Retrotranspositionstests wurde der Einfluss von CREME9 auf die L1-Retrotranspositionseffizienz untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine Abnahme der L1-Transpositionsrate um 80% relativ zur Kontrolle mit R850 als leerem Expressionsvektor ohne CREME9-Insert, nachdem die CREME9-Expression mit der maximalen Konzentration des dimerisierenden Moleküls AP2167 als Aktivator der Expression induziert worden war (Abb. 29). Eine deutliche Reduktion der Retrotranspositionsfrequenz bei steigenden Konzentrationen an AP2167 wurde nicht nur beim CREME9 exprimierenden Plasmid pCBW24- sondern auch bei R850-transduzierten HeLa-R874 beobachtet, obwohl R850 kein Transgen trägt, welches für diesen Effekt verantwortlich sein könnte. Der durch AP2167 Zugabe wieder funktionsfähige Transkriptionsfaktor des ARIAD-Systems, welcher durch R874 in die HeLa-Zellen eingebracht wurde, rekrutiert nach AP2167-Zugabe verschiedene zelluläre Faktoren, um die Transkription zu initiieren. Dieser Prozess ist unabhängig davon, ob hinter der Promotorregion ein Transgen inseriert wurde. Liegen einige dieser zellulären Transkriptionsfaktoren nur in wenigen Kopien in der Zellen vor und werden für die L1-Expression ebenfalls benötigt, könnte es zur Konkurrenz um die zellulären Transkriptionsfaktoren kommen, was die Reduktion der Retrotranspositionsfrequenz bei der R850-Kontrolle, mit dem leeren Expressionsvektor ohne CREME9 Insert erklären könnte.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine deutliche Reduktion der Retrotranspositionsfrequenz nach AP2167 abhängiger Induktion der CREME9 Expression im Vergleich zur Kontrolle mit dem leeren Ausgangsvektor R850. Wird die Expression eines Transgens induziert, lässt sich meist eine gleichzeitige Abnahme des Wachstums und der Teilungsrate der betroffenen Zellen beobachten. Die im Vergleich zu den HeLa (R874 + R850) Zellen höhere Syntheseleistung der HeLa (R874 + pCBW24) Zellen, die durch die starke CREME9-Expression verursacht wird, könnte über diesen Induktionseffekt daher indirekt zu einer verringerten Retrotranspositionsfrequenz führen. Ersetzt man R850 durch einen Kontrollvektor, der ein Transgen von gleicher Größe wie CREME9 trägt, könnte der Einfluss eines Induktionseffektes auf den RTP-Test ausgeschlossen werden.

Es kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die starke Reduktion der Retrotranspositionsfrequenz der HeLa (R874 + pCBW24) Zellen im Vergleich zur HeLa

(R874 + R850) Kontrolle bei höheren AP2167 Konzentration auf einer generellen zytotoxischen Wirkung von CREME9 auf die Zellen beruht, die sich unabhängig von einer Interaktion mit L1-EN auswirkt. Die Kontrolle und der Vergleich der HeLa (R874 + pCBW24) Zellzahlen nach Zugabe unterschiedlichen AP2167 Konzentrationen im RTP-Test bis zum Beginn der G418-Selektion ergab jedoch keinerlei Anhaltspunkte für zytotoxische Effekte, die auf die CREME9-Expression zurückgeführt werden könnten. Daher kann man davon ausgehen, dass die Überexpression von CREME9 tatsächlich eine inhibitorische Wirkung auf die L1-Retrotransposition in HeLa-Zellen hat.

9 Zusammenfassung

LINE-1 (L1) Retrotransposons machen etwa 17% des menschlichen Genoms aus und spielen eine signifikante Rolle bei der Gestaltung des Genoms in Säugetieren. Um die Mechanismen der mutagenen Einflüsse von L1 auf das Genom besser zu verstehen, wurden die beiden L1 kodierten Proteine ORF1p und ORF2p, die an der L1-Retrotransposition beteiligt sind, im Rahmen dieser Arbeit eingehender untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper (AK) zur Detektion von L1-ORF1p und L1-ORF2p hergestellt. Die Immunisierung von Kaninchen mit L1-ORF1p und von Hühnern mit Peptiden aus der Endonukleasedomäne von ORF2p wurde von Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt. Die Spezifität des anti-ORF1p AK wurde in Immunblotanalysen gegen überexprimiertes ORF1p und gegen Zellextrakte verschiedener Tumorzelllinien, sowie in immunhistochemischen Färbungen und Immunfluoreszenzanalysen von menschlichen Geweben und Zelllinien nachgewiesen. Im Vergleich mit dem in der Literatur beschriebenen anti-ORF1p AK AH40.1 zeigte der neue anti-ORF1p AK eine mindestens vergleichbare Signalstärke bei gleichzeitig deutlich höherer Signalspezifität. Der anti-ORF2p AK wurde mit der Wasser-Verdünnungsmethode aus Hühnereigelb isoliert. Die Spezifität des anti-ORF2p AK wurde durch Immunpräzipitation überprüft. Ein ~130 kDa- und ein ~45 kDa-Polypeptid konnten mit dem anti-ORF2p AK aus HDMEC-Zelllysat präzipitiert und nach massenspektrometrischer Untersuchung L1-ORF2p kodierten Proteinen zugeordnet werden.

In immunhistochemischen Untersuchungen von Hodengewebe erwachsener Individuen mit den beiden oben charakterisierten AK konnte eine Koexpression von L1-ORF1p und L1-ORF2p in Spermatozyten II, unreifen Spermatischen, Sertolizellen, Residualkörperchen, Leydigzellen und Endothelzellen nachgewiesen werden. Koexpression von L1-ORF1p und L1-ORF2p konnte außerdem in Prospermatogonien, Leydigzellen und vaskulären Endothelzellen des fötalen Hodens (18/28 Wochen), Epithelzellen und vaskulären Endothelzellen des fötalen Nebenhodens (28 Wochen), sowie in Synzytiotrophoblasten und vaskulären Endothelzellen von Plazentagewebe detektiert werden.

Die intrazelluläre Lokalisation wurde mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht und ergab eine Kolokalisation von endogenem ORF1p und ORF2p in granulären Strukturen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern von 2102Ep-Zellen.

Menschliche Zelllinien zeigen starke Unterschiede in der Retrotranspositionsfrequenz von L1. Differentiell exprimierte Wirtsproteine, die direkt an der L1-Retrotransposition beteiligt sind, könnten die Ursache für diese Beobachtung sein.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Köderkonstrukt für eine enzymatisch-inaktive Endonukleasedomäne (EN) des L1-ORF2p in den "*bait*"-Vektor pGBKT7 (BD Clontech, Frankreich) für eine Hefe 2-Hybrid Analyse kloniert. Durch einen X-Gal Filtertest konnte eine intrinsische Aktivierung der Reportergene des Matchmaker System 3 (BD Clontech, Frankreich) durch obiges Köderkonstrukt ausgeschlossen werden.

Aus einer cDNA-Genbank aus menschlichen Hoden (elf Männer im Alter von 11 - 61 Jahren) konnten mit Hilfe einer Hefe 2-Hybrid Analyse einhundertachtunddreißig potentielle Interaktionspartner der L1-EN isoliert werden. Von diesen einhundertachtunddreißig Kandidaten wurden diejenigen dreiundzwanzig Kandidaten weiter untersucht, die für eine cDNA von mindestens 200 bp Länge kodierten. Nach Ausschluss von fünfzehn falsch-positiven Kandidaten durch einen genetischen Test auf intrinsische Aktivierung der Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *MEL1* wurden die verbliebenen acht cDNAs sequenziert und die editierten cDNA-Sequenzen durch *in-silico* Analysen mittels des BLAST-Algorithmus mit öffentlichen Datenbanken verglichen. Zwei cDNAs konnten dem Acrosin-bindenden Protein (ACRBP) zugeordnet werden, eine dem Ubiquitin konjugierenden Enzym UBE2I, eine Keratin 6 (K6irs2), drei dem Zytokin Rezeptor ähnlichen Molekül 9 (CREME9) und zwei konnten keinem bekannten Protein zugeordnet werden. CREME9 wurde aussichtsreichster Kandidat für die weitere Charakterisierung identifiziert und die physikalische Interaktion von CREME9 mit L1-EN durch eine GST-Fällung nachgewiesen.

Aus Hodengewebe wurde die vollständige cDNA von CREME9 isoliert und in ein stufenlos regulierbares Expressionssystem (ARIAD Pharmaceutical, USA) kloniert. Im langjährig etablierten Retrotranspositionstest (RTP-Test) konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der CREME9-Expression die L1-Retrotranspositionrate um bis zu 80% reduziert ist. Somit ist CREME9 möglicherweise ein negativer Regulator der L1-Retrotransposition.

10 Literatur

- Akita, E.M. and Nakai, S. (1993) Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J Immunol Methods*, **160**, 207-214.
- Alisch, R.S., Garcia-Perez, J.L., Muotri, A.R., Gage, F.H. and Moran, J.V. (2006) Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Genes Dev*, **20**, 210-224.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
- Alves, G., Tatro, A. and Fanning, T. (1996) Differential methylation of human LINE-1 retrotransposons in malignant cells. *Gene*, **176**, 39-44.
- Andrews, P.W., Bronson, D.L., Benham, F., Strickland, S. and Knowles, B.B. (1980) A comparative study of eight cell lines derived from human testicular teratocarcinoma. *Int J Cancer*, **26**, 269-280.
- Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C. and Fogh, J. (1984) Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest*, **50**, 147-162.
- Asch, H.L., Eliacin, E., Fanning, T.G., Connolly, J.L., Bratthauer, G. and Asch, B.B. (1996) Comparative expression of the LINE-1 p40 protein in human breast carcinomas and normal breast tissues. *Oncol Res*, **8**, 239-247.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G. and Struhl, K. (1988-2000) *Current Protocols in Molecular Biology*. J. Wiley and Sons, New York.
- Avery, O.T., MacLeod, C. M., McCarty, M. (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. Induction of Transformation by a Deoxyribonucleic Acid Fraction Isolated From *Pneumococcus* Type III. *J. Exp. Med.*, **79**, 137-158.
- Baba, T., Niida, Y., Michikawa, Y., Kashiwabara, S., Kodaira, K., Takenaka, M., Kohno, N., Gerton, G.L. and Arai, Y. (1994) An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate. *J Biol Chem*, **269**, 10133-10140.
- Banaz-Yasar, F., Steffen, G., Hauschild, J., Bongartz, B.M., Schumann, G.G. and Ergun, S. (2010) LINE-1 retrotransposition events affect endothelial proliferation and migration. *Histochem Cell Biol*, **134**, 581-589.
- Bannert, N. and Kurth, R. (2004) Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101 Suppl 2**, 14572-14579.
- Beck, C.R., Garcia-Perez, J.L., Badge, R.M. and Moran, J.V. (2011) LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **12**, 187-215.
- Becker, K.G., Swergold, G.D., Ozato, K. and Thayer, R.E. (1993) Binding of the ubiquitous nuclear transcription factor YY1 to a cis regulatory sequence in the human LINE-1 transposable element. *Human Mol. Genet.*, **2**, 1697-1702.
- Belancio, V.P., Hedges, D.J. and Deininger, P. (2008) Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome Res*, **18**, 343-358.

- Belancio, V.P., Roy-Engel, A.M., Pochampally, R.R. and Deininger, P. (2010) Somatic expression of LINE-1 elements in human tissues. *Nucleic Acids Res*, **38**, 3909-3922.
- Bentley, J., Diggle, C.P., Harnden, P., Knowles, M.A. and Kiltie, A.E. (2004) DNA double strand break repair in human bladder cancer is error prone and involves microhomology-associated end-joining. *Nucleic Acids Res*, **32**, 5249-5259.
- Beraldi, R., Pittoggi, C., Sciamanna, I., Mattei, E. and Spadafora, C. (2006) Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development. *Mol Reprod Dev*, **73**, 279-287.
- Bestor, T.H. (1998) In Chadwick, D.J. and G., C. (eds.), *The host defence function of genomic methylation patterns*. Epigenetics. Novartis Foundation, West Sussex, pp. 187-194.
- Bibillo, A. and Eickbush, T.H. (2004) End-to-end template jumping by the reverse transcriptase encoded by the R2 retrotransposon. *J Biol Chem*, **279**, 14945-14953.
- Boeke, J.D. (1997) LINES and *Alus* - the polyA connection (News & Views). *Nature Genet.*, **16**, 6-7.
- Boeke, J.D. and Stoye, J.P. (1997) Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. In Varmus, H., Hughes, S. and Coffin, J. (eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 343-435.
- Bogerd, H.P., Wiegand, H.L., Hulme, A.E., Garcia-Perez, J.L., O'Shea, K.S., Moran, J.V. and Cullen, B.R. (2006) Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8780-8785.
- Boissinot, S. and Furano, A.V. (2001) Adaptive evolution in LINE-1 retrotransposons. *Mol Biol Evol*, **18**, 2186-2194.
- Boyd, J.D. and Hamilton, W.J. (1970) *The Human Placenta*. The Macmillan Press, London.
- Branciforte, D. and Martin, S.L. (1993) Synchronous expression of LINE-1 RNA and protein in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5383-5392.
- Branciforte, D. and Martin, S.L. (1994) Developmental and cell-type specificity of LINE-1 expression in mouse testis: implications for transposition. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2584-2592.
- Bratthauer, G.L., Cardiff, R.D. and Fanning, T.G. (1994) Expression of LINE-1 retrotransposons in human breast cancer. *Cancer*, **73**, 2333-2336.
- Bratthauer, G.L. and Fanning, T.G. (1992) Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer. *Oncogene*, **7**, 507-510.
- Breucker, H., Schafer, E. and Holstein, A.F. (1985) Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. *Cell Tissue Res*, **240**, 303-309.
- Brouha, B., Schustak, J., Badge, R.M., Lutz-Prigge, S., Farley, A.H., Moran, J.V. and Kazazian, H.H., Jr. (2003) Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5280-5285.
- Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, **112**, 195-203.
- Burwinkel, B. and Kilimann, M.W. (1998) Unequal homologous recombination between LINE-1 elements as a mutational mechanism in human genetic disease. *J Mol Biol*, **277**, 513-517.
- Bustos-Obregon, E., Courot, M., Flechon, J.E., Hochereau-de-Reviere, M.T. and Holstein, A.F. (1975) Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenic process in mammals with particular reference to man. *Andrologia*, **7**, 141-163.

- Callahan, K.E., Hickman, A.B., Jones, C.E., Ghirlando, R. and Furano, A.V. Polymerization and nucleic acid-binding properties of human L1 ORF1 protein. *Nucleic Acids Res*, **40**, 813-827.
- Campbell, D.H., Luescher, E. and Lerman, L.S. (1951) Immunologic Adsorbents: I. Isolation of Antibody by Means of a Cellulose-Protein Antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **37**, 575-578.
- Chen, H., Lilley, C.E., Yu, Q., Lee, D.V., Chou, J., Narvaiza, I., Landau, N.R. and Weitzman, M.D. (2006) APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Curr Biol*, **16**, 480-485.
- Chien, A., Edgar, D.B. and Trela, J.M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*, **127**, 1550-1557.
- Chiu, Y.L., Witkowska, H.E., Hall, S.C., Santiago, M., Soros, V.B., Esnault, C., Heidmann, T. and Greene, W.C. (2006) High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15588-15593.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Clements, A.P. and Singer, M.F. (1998) The human LINE-1 reverse transcriptase: effect of deletions outside the common reverse transcriptase domain. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3528-3535.
- Correns, C. (1899) Untersuchungen über die Xenien bei *Zea mays*. *Berichte der Deutsche Botanische Gesellschaft*, **17**, 410-418.
- Cost, G.C. and Boeke, J.D. (1998) Targeting of human retrotransposon integration is directed by the specificity of the L1 endonuclease for regions of unusual DNA structure. *Biochemistry*, **37**, 18081-18093.
- Cost, G.J., Feng, Q., Jacquier, A. and Boeke, J.D. (2002) Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *Embo J*, **21**, 5899-5910.
- Curcio, M.J. and Garfinkel, D.J. (1991) Single-step selection for Ty1 element retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 936-940.
- De Vries, H. (1900) Sur la loi de disjonction des Hybrides. *Comptes Rendue Hebdomadaires, Acad. Sci. Paris*, **130**, 845-847.
- Deragon, J.M., Sinnott, D. and Labuda, D. (1990) Reverse transcriptase activity from human embryonal carcinoma cells NTera2D1. *EMBO J*, **9**, 3363-3368.
- Dewannieux, M., Esnault, C. and Heidmann, T. (2003) LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet*, **35**, 41-48.
- Dewannieux, M. and Heidmann, T. (2005) LINEs, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modeling. *Cytogenet Genome Res*, **110**, 35-48.
- Dmitriev, S.E., Andreev, D.E., Terenin, I.M., Olovnikov, I.A., Prassolov, V.S., Merrick, W.C. and Shatsky, I.N. (2007) Efficient translation initiation directed by the 900-nucleotide-long and GC-rich 5' untranslated region of the human retrotransposon LINE-1 mRNA is strictly cap dependent rather than internal ribosome entry site mediated. *Mol Cell Biol*, **27**, 4685-4697.
- Dombroski, B.A., Mathias, S.L., Nanthakumar, E., Scott, A.F. and Kazazian, H.H., Jr. (1991) Isolation of an active human transposable element. *Science*, **254**, 1805-1808.
- Dym, M. and Fawcett, D.W. (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod*, **3**, 308-326.
- Eickbush, T.H. (1997) Telomerase and retrotransposons: which came first? *Science*, **277**, 911-912.
- Eickbush, T.H. (2002) R2 and related site-specific non-long terminal

- repeat retrotransposons. In *Mobile DNA II* (eds. N.L. Craig et al.). *American Society for Microbiology, Washington, DC.*, 813–835.
- Emerson, J.J., Kaessmann, H., Betran, E. and Long, M. (2004) Extensive gene traffic on the mammalian X chromosome. *Science*, **303**, 537-540.
- Ergun, S., Buschmann, C., Heukeshoven, J., Dammann, K., Schnieders, F., Lauke, H., Chalajour, F., Kilic, N., Stratling, W.H. and Schumann, G.G. (2004) Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues. *J Biol Chem*, **279**, 27753-27763.
- Ergun, S., Davidoff, M. and Holstein, A.F. (1996) Capillaries in the lamina propria of human seminiferous tubules are partly fenestrated. *Cell Tissue Res*, **286**, 93-102.
- Ergun, S., Kilic, N., Harneit, S., Paust, H.J., Ungefroren, H., Mukhopadhyay, A., Davidoff, M. and Holstein, A.F. (1997) Microcirculation and the vascular control of the testis. *Adv Exp Med Biol*, **424**, 163-180.
- Esnault, C., Maestre, J. and Heidmann, T. (2000) Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature Genet.*, **24**, 363-367.
- Fanning, T. and Singer, M. (1987) The LINE-1 DNA sequences in four mammalian orders predict proteins that conserve homologies to retrovirus proteins. *Nucleic Acids Res*, **15**, 2251-2260.
- Fehse, B., Uhde, A., Fehse, N., Eckert, H.G., Clausen, J., Ruger, R., Koch, S., Ostertag, W., Zander, A.R. and Stockschlader, M. (1997) Selective immunoaffinity-based enrichment of CD34+ cells transduced with retroviral vectors containing an intracytoplasmically truncated version of the human low-affinity nerve growth factor receptor (deltaLNGFR) gene. *Hum Gene Ther*, **8**, 1815-1824.
- Feng, Q., Moran, J., Kazazian, H. and Boeke, J.D. (1996) Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*, **87**, 905-916.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Folkman, J. (2003) Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol*, **13**, 159-167.
- Frankel, A.D., Bredt, D.S. and Pabo, C.O. (1988) Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science*, **240**, 70-73.
- Franklin, G.C., Chretien, S., Hanson, I.M., Rochefort, H., May, F.E. and Westley, B.R. (1988) Expression of human sequences related to those of mouse mammary tumor virus. *J Virol*, **62**, 1203-1210.
- Frendo, J.L., Olivier, D., Cheynet, V., Blond, J.L., Bouton, O., Vidaud, M., Rabreau, M., Evain-Brion, D. and Mallet, F. (2003) Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol*, **23**, 3566-3574.
- Gasior, S.L., Wakeman, T.P., Xu, B. and Deininger, P.L. (2006) The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *J Mol Biol*, **357**, 1383-1393.
- Gey, G.O., Coffman, W. D., and Kubicek, M. T. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, **12**, 264-265.
- Giaccone, G., Battey, J., Gazdar, A.F., Oie, H., Draoui, M. and Moody, T.W. (1992) Neuromedin B is present in lung cancer cell lines. *Cancer Res*, **52**, 2732s-2736s.
- Gilbert, N., Lutz-Prigge, S. and Moran, J.V. (2002) Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*, **110**, (in press; published August 9, 2002).
- Gire, V., Roux, P., Wynford-Thomas, D., Brondello, J.M. and Dulic, V. (2004) DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *Embo J*, **23**, 2554-2563.

- Goodier, J.L., Ostertag, E.M., Engleka, K.A., Seleme, M.C. and Kazazian, H.H., Jr. (2004) A potential role for the nucleolus in L1 retrotransposition. *Hum Mol Genet*, **13**, 1041-1048.
- Gottlich, B., Reichenberger, S., Feldmann, E. and Pfeiffer, P. (1998) Rejoining of DNA double-strand breaks in vitro by single-strand annealing. *Eur J Biochem*, **258**, 387-395.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Graur, D., Shuali, Y. and Li, W.H. (1989) Deletions in processed pseudogenes accumulate faster in rodents than in humans. *J Mol Evol*, **28**, 279-285.
- Gregory, T.R. and Hebert, P.D. (1999) The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. *Genome Res*, **9**, 317-324.
- Griffiths, D.J. (2001) Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS1017.
- Grimaldi, G., Skowronski, J. and Singer, M.F. (1984) Defining the beginning and end of KpnI family segments. *Embo J*, **3**, 1753-1759.
- Grover, D., Mukerji, M., Bhatnagar, P., Kannan, K. and Brahmachari, S.K. (2004) Alu repeat analysis in the complete human genome: trends and variations with respect to genomic composition. *Bioinformatics*, **20**, 813-817.
- Guenet, J.L. (2005) The mouse genome. *Genome Res*, **15**, 1729-1740.
- Han, J.S., Szak, S.T. and Boeke, J.D. (2004) Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature*, **429**, 268-274.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hancks, D.C. and Kazazian, H.H., Jr. (2012) Active human retrotransposons: variation and disease. *Curr Opin Genet Dev*, **22**, 191-203.
- Haoudi, A., Semmes, O.J., Mason, J.M. and Cannon, R.E. (2004) Retrotransposition-Competent Human LINE-1 Induces Apoptosis in Cancer Cells With Intact p53. *J Biomed Biotechnol*, **2004**, 185-194.
- Harrison, P.M., Zheng, D., Zhang, Z., Carriero, N. and Gerstein, M. (2005) Transcribed processed pseudogenes in the human genome: an intermediate form of expressed retrosequence lacking protein-coding ability. *Nucleic Acids Res*, **33**, 2374-2383.
- Hartl, D.L. (2000) Molecular melodies in high and low C. *Nat Rev Genet*, **1**, 145-149.
- Hasler, J. and Strub, K. (2006) Alu elements as regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res*, **34**, 5491-5497.
- Helling, R.B., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. (1974) Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol*, **14**, 1235-1244.
- Hida, K., Hida, Y., Amin, D.N., Flint, A.F., Panigrahy, D., Morton, C.C. and Klagsbrun, M. (2004) Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res*, **64**, 8249-8255.
- Hinrichsen, K.V. (1993) *Humanembryologie. Lehrbuch und Atlas der vorgeburtlichen Entwicklung des Menschen*. Springer Verlag, Berlin.
- Hirotsune, S., Yoshida, N., Chen, A., Garrett, L., Sugiyama, F., Takahashi, S., Yagami, K., Wynshaw-Boris, A. and Yoshiki, A. (2003) An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature*, **423**, 91-96.

- Hohjoh, H., Minakami, R. and Sakaki, Y. (1990) Selective cloning and sequence analysis of the human L1 (Line-1) sequences which transposed in the relatively recent past. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 4099-4104.
- Hohjoh, H. and Singer, M.F. (1996) Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. *EMBO J.*, **15**, 630-639.
- Hohjoh, H. and Singer, M.F. (1997) Sequence-specific single-strand RNA binding protein encoded by the human LINE-1 retrotransposon. *Embo J*, **16**, 6034-6043.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, **114**, 193-197.
- Holmes, S. and Singer, M. (1992) Studies on p40, the leucine zipper motif-containing protein encoded by the first open reading frame of an active human LINE-1 transposable element. *J. Biol. Chem.*, **267**, 19765-19768.
- Holmes, S.E., Dombroski, B.A., Krebs, C.M., Boehm, C.D. and Kazazian, H.H., Jr. (1994) A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion. *Nature Genet.*, **7**, 143-148.
- Holstein, A.F. (1976) Ultrastructural observations on the differentiation of spermatids in man. *Andrologia*, **8**, 157-165.
- Houtgraaf, J.H., Versmissen, J. and van der Giessen, W.J. (2006) A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med*, **7**, 165-172.
- Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., Cameron, G., Chen, Y., Clark, L., Cox, T., Cuff, J., Curwen, V., Down, T., Durbin, R., Eyras, E., Gilbert, J., Hammond, M., Huminiecki, L., Kasprzyk, A., Lehvaslaiho, H., Lijnzaad, P., Melsopp, C., Mongin, E., Pettett, R., Pocock, M., Potter, S., Rust, A., Schmidt, E., Searle, S., Slater, G., Smith, J., Spooner, W., Stabenau, A., Stalker, J., Stupka, E., Ureta-Vidal, A., Vastrik, I. and Clamp, M. (2002) The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res*, **30**, 38-41.
- Hulme, A.E., Bogerd, H.P., Cullen, B.R. and Moran, J.V. (2007) Selective inhibition of Alu retrotransposition by APOBEC3G. *Gene*, **390**, 199-205.
- Inoue, K., Ozaki, S., Ito, K., Iseda, T., Kawaguchi, S., Ogawa, M., Bae, S.C., Yamashita, N., Itohara, S., Kudo, N. and Ito, Y. (2003) Runx3 is essential for the target-specific axon pathfinding of trkc-expressing dorsal root ganglion neurons. *Blood Cells Mol Dis*, **30**, 157-160.
- Inoue, K., Ozaki, S., Shiga, T., Ito, K., Masuda, T., Okado, N., Iseda, T., Kawaguchi, S., Ogawa, M., Bae, S.C., Yamashita, N., Itohara, S., Kudo, N. and Ito, Y. (2002) Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat Neurosci*, **5**, 946-954.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. and Fields, S. (1993) Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, **8**, 1693-1696.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Nordheim, A. and Stunnenberg, H.G. (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8972-8976.
- Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J. and Navaratnam, N. (2002) An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics*, **79**, 285-296.
- Jenne, D.E., Tinschert, S., Dorschner, M.O., Hameister, H., Stephens, K. and Kehrer-Sawatzki, H. (2003) Complete physical map and gene content of the human NF1

- tumor suppressor region in human and mouse. *Genes Chromosomes Cancer*, **37**, 111-120.
- Jenne, D.E., Tinschert, S., Reimann, H., Lasinger, W., Thiel, G., Hameister, H. and Kehrer-Sawatzki, H. (2001) Molecular characterization and gene content of breakpoint boundaries in patients with neurofibromatosis type 1 with 17q11.2 microdeletions. *Am J Hum Genet*, **69**, 516-527.
- Jones, P.A. and Takai, D. (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, **293**, 1068-1070.
- Jurka, J. (1997) Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1872-1877.
- Jurka, J., Zietkiewicz, E. and Labuda, D. (1995) Ubiquitous mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) are molecular fossils from the mesozoic era. *Nucleic Acids Res*, **23**, 170-175.
- Kazazian, H.H., Jr. and Moran, J.V. (1998) The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nat Genet*, **19**, 19-24.
- Kazazian, H.H., Jr., Wong, C., Youssoufian, H., Scott, A.F., Phillips, D.G. and Antonarakis, S.E. (1988) Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*, **332**, 164-166.
- Kazazian, H.H.J. (1998) Mobile elements and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, **8**, 343-350.
- Khatua, A.K., Taylor, H.E., Hildreth, J.E. and Popik, W. (2010) Inhibition of LINE-1 and Alu retrotransposition by exosomes encapsidating APOBEC3G and APOBEC3F. *Virology*, **400**, 68-75.
- Kilic, N., Ergün, S. (2001) Methods to evaluate the formation and stabilization of blood vessels and their role in tumor growth and metastasis. In *Methods in Molecular Medicine*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, Vol. 58, pp. 125-148.
- Kimberland, M.L., Divoky, V., Prchal, J., Schwahn, U., Berger, W. and Kazazian, H.H., Jr. (1999) Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Hum Mol Genet*, **8**, 1557-1560.
- Kinomoto, M., Kanno, T., Shimura, M., Ishizaka, Y., Kojima, A., Kurata, T., Sata, T. and Tokunaga, K. (2007) All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res*, **35**, 2955-2964.
- Kinsey, J. (1993) Transnuclear retrotransposition of the Tad element of *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9384-9387.
- Kirilyuk, A., Tolstonog, G.V., Damert, A., Held, U., Hahn, S., Lower, R., Buschmann, C., Horn, A.V., Traub, P. and Schumann, G.G. (2008) Functional endogenous LINE-1 retrotransposons are expressed and mobilized in rat chloroleukemia cells. *Nucleic Acids Res*, **36**, 648-665.
- Kobayashi, K., Nakahori, Y., Miyake, M., Matsumura, K., Kondo-Iida, E., Nomura, Y., Segawa, M., Yoshioka, M., Saito, K., Osawa, M., Hamano, K., Sakakihara, Y., Nonaka, I., Nakagome, Y., Kanazawa, I., Nakamura, Y., Tokunaga, K. and Toda, T. (1998) An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*, **394**, 388-392.
- Koga, A., Shimada, A., Shima, A., Sakaizumi, M., Tachida, H. and Hori, H. (2000) Evidence for recent invasion of the medaka fish genome by the Tol2 transposable element. *Genetics*, **155**, 273-281.
- Kohler, P.O. and Bridson, W.E. (1971) Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, **32**, 683-687.

- Koito, A. and Ikeda, T. Intrinsic restriction activity by AID/APOBEC family of enzymes against the mobility of retroelements. *Mob Genet Elements*, **1**, 197-202.
- Koito, A. and Ikeda, T. (2011) Intrinsic restriction activity by AID/APOBEC family of enzymes against the mobility of retroelements. *Mob Genet Elements*, **1**, 197-202.
- Kolosha, V.O. and Martin, S.L. (1997) *In vitro* properties of the first ORF protein from mouse LINE-1 support its role in ribonucleoprotein particle formation during retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 10155-10160.
- Koning, F.A., Newman, E.N., Kim, E.Y., Kunstman, K.J., Wolinsky, S.M. and Malim, M.H. (2009) Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets. *J Virol*, **83**, 9474-9485.
- Konkel, M.K., Wang, J., Liang, P. and Batzer, M.A. (2007) Identification and characterization of novel polymorphic LINE-1 insertions through comparison of two human genome sequence assemblies. *Gene*, **390**, 28-38.
- Kopera, H.C., Moldovan, J.B., Morrish, T.A., Garcia-Perez, J.L. and Moran, J.V. (2011) Similarities between long interspersed element-1 (LINE-1) reverse transcriptase and telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 20345-20350.
- Kubo, S., Seleme, M.C., Soifer, H.S., Perez, J.L., Moran, J.V., Kazazian, H.H., Jr. and Kasahara, N. (2006) L1 retrotransposition in nondividing and primary human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8036-8041.
- Kulpa, D.A. and Moran, J.V. (2005) Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for LINE-1 retrotransposition. *Hum Mol Genet*, **14**, 3237-3248.
- Kulpa, D.A. and Moran, J.V. (2006) Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 655-660.
- Kurose, K., Hata, K., Hattori, M. and Sakaki, Y. (1995) RNA polymerase III dependence of the human L1 promoter and possible participation of the RNA polymerase II factor YY1 in the RNA polymerase III transcription system. *Nuc. Acids Res.*, **23**, 3407-3709.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F.,

- Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglu, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., Szustakowski, J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S. and Chen, Y.J. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
- Langbein, L., Rogers, M.A., Praetzel, S., Winter, H. and Schweizer, J. (2003) K6irs1, K6irs2, K6irs3, and K6irs4 represent the inner-root-sheath-specific type II epithelial keratins of the human hair follicle. *J Invest Dermatol*, **120**, 512-522.
- Leibold, D.M., Swergold, G.D., Singer, M.F., Thayer, R.E., Dombroski, B.A. and Fanning, T.G. (1990) Translation of LINE-1 DNA elements in vitro and in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 6990-6994.
- Lemmers, R.J., van der Vliet, P.J., Klooster, R., Sacconi, S., Camano, P., Dauwerse, J.G., Snider, L., Straasheijm, K.R., van Ommen, G.J., Padberg, G.W., Miller, D.G., Tapscott, S.J., Tawil, R., Frants, R.R. and van der Maarel, S.M. (2010) A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Science*, **329**, 1650-1653.
- Levanon, D., Bettoun, D., Harris-Cerruti, C., Woolf, E., Negreanu, V., Eilam, R., Bernstein, Y., Goldenberg, D., Xiao, C., Fliegau, M., Kremer, E., Otto, F., Brenner, O., Lev-Tov, A. and Groner, Y. (2002) The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *Embo J*, **21**, 3454-3463.
- Li, B. and Fields, S. (1993) Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *Faseb J*, **7**, 957-963.
- Li, Q.L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X.Z., Lee, K.Y., Nomura, S., Lee, C.W., Han, S.B., Kim, H.M., Kim, W.J., Yamamoto, H., Yamashita, N., Yano, T., Ikeda, T., Ito, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S.C. and Ito, Y. (2002) Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*, **109**, 113-124.
- Li, W.-H., Gu, Z., Wang, H. and Nekrutenko, A. (2001) Evolutionary analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 847-849.

- Lindtner, S., Felber, B.K. and Kjems, J. (2002) An element in the 3' untranslated region of human LINE-1 retrotransposon mRNA binds NXF1(TAP) and can function as a nuclear export element. *Rna*, **8**, 345-356.
- Line, B.R., Mitra, A., Nan, A. and Ghandehari, H. (2005) Targeting tumor angiogenesis: comparison of peptide and polymer-peptide conjugates. *J Nucl Med*, **46**, 1552-1560.
- Lower, R., Lower, J. and Kurth, R. (1996) The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5177-5184.
- Luan, D. and Eickbush, T.H. (1995) RNA template requirements for target DNA-primed reverse transcription by the R2 retrotransposable element. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3882-3891.
- Luan, D.D., Korman, M.H., Jakubczak, J.L. and Eickbush, T.H. (1993) Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell*, **72**, 595-605.
- Macia, A., Munoz-Lopez, M., Cortes, J.L., Hastings, R.K., Morell, S., Lucena-Aguilar, G., Marchal, J.A., Badge, R.M. and Garcia-Perez, J.L. (2010) Epigenetic control of retrotransposon expression in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **31**, 300-316.
- Maestre, J., Tchenio, T., Dhellin, O. and Heidmann, T. (1995) mRNA retroposition in human cells: processed pseudogene formation. *Embo J*, **14**, 6333-6338.
- Malik, H.S., Burke, W.D. and Eickbush, T.H. (1999) The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. *Mol. Biol. Evol.*, **16**, 793-805.
- Martin, S.L. (1991) Ribonucleoprotein particles with LINE-1 RNA in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, **11**, 4804-4807.
- Martin, S.L. and Branciforte, D. (1993) Synchronous expression of LINE-1 RNA and protein in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, **13**, 5383-5392.
- Martin, S.L., Branciforte, D., Keller, D. and Bain, D.L. (2003) Trimeric structure for an essential protein in L1 retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13815-13820.
- Martin, S.L. and Bushman, F.D. (2001) Nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein from the mouse LINE-1 retrotransposon. *Mol Cell Biol*, **21**, 467-475.
- Martin, S.L., Cruceanu, M., Branciforte, D., Wai-Lun Li, P., Kwok, S.C., Hodges, R.S. and Williams, M.C. (2005) LINE-1 retrotransposition requires the nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein. *J Mol Biol*, **348**, 549-561.
- Matthews, J.M. and Sunde, M. (2002) Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life*, **54**, 351-355.
- Mayer, J., Sauter, M., Racz, A., Scherer, D., Mueller-Lantzsch, N. and Meese, E. (1999) An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nat Genet*, **21**, 257-258.
- McClintock, B. (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **36**, 344-355.
- McMillan, J.P. and Singer, M.F. (1993) Translation of the human LINE-1 element, L1Hs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11533-11537.
- Meischl, C., Boer, M., Ahlin, A. and Roos, D. (2000) A new exon created by intronic insertion of a rearranged LINE-1 element as the cause of chronic granulomatous disease. *Eur J Hum Genet*, **8**, 697-703.
- Miki, Y. (1998) Retrotranspositional integration of mobile genetic elements in human diseases. *J Hum Genet*, **43**, 77-84.

- Minakami, R., Kurose, K., Etoh, K., Furuhata, Y., Hattori, M. and Sakaki, Y. (1992) Identification of an internal cis-element essential for the human L1 transcription and a nuclear factor(s) binding to the element. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3139-3145.
- Mine, M., Chen, J.M., Brivet, M., Desguerre, I., Marchant, D., de Lonlay, P., Bernard, A., Ferec, C., Abitbol, M., Ricquier, D. and Marsac, C. (2007) A large genomic deletion in the PDHX gene caused by the retrotranspositional insertion of a full-length LINE-1 element. *Hum Mutat*, **28**, 137-142.
- Moore, K.L., Persaud, T.V.N. (1993) *Urogenitalsystem: Harn- und Geschlechtsorgane. In: Embryologie, Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen.* Schatthauer Verlag, Stuttgart.
- Morales, J.F., Snow, E.T. and Murnane, J.P. (2002) Environmental factors affecting transcription of the human L1 retrotransposon. I. Steroid hormone-like agents. *Mutagenesis*, **17**, 193-200.
- Moran, J.V., and Gilbert, N. (2002) Mammalian LINE-1 retrotransposons and related elements. In Craig, N., Craggie, R., Gellert, M., Lambowitz, A. (ed.), *Mobile DNA II.* ASM Press, Washington, DC, pp. pp. 839-869.
- Moran, J.V., DeBerardinis, R.J. and Kazazian, H.H., Jr. (1999) Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science*, **283**, 1530-1534.
- Moran, J.V., Holmes, S.E., Naas, T.P., DeBerardinis, R.J., Boeke, J.D. and Kazazian, H.H., Jr. (1996) High-frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell*, **87**, 917-927.
- Morrish, T.A., Gilbert, N., Myers, J.S., Vincent, B.J., Stamato, T.D., Taccioli, G.E., Batzer, M.A. and Moran, J.V. (2002) DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nature Genet.*, **31**, 159-165.
- Muckenfuss, H., Hamdorf, M., Held, U., Perkovic, M., Lower, J., Cichutek, K., Flory, E., Schumann, G.G. and Munk, C. (2006) APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *J Biol Chem*, **281**, 22161-22172.
- Mulhardt, C., Fischer, M., Gass, P., Simon-Chazottes, D., Guenet, J.L., Kuhse, J., Betz, H. and Becker, C.M. (1994) The spastic mouse: aberrant splicing of glycine receptor beta subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element. *Neuron*, **13**, 1003-1015.
- Muller, C., Readhead, C., Diederichs, S., Idos, G., Yang, R., Tidow, N., Serve, H., Berdel, W.E. and Koeffler, H.P. (2000) Methylation of the cyclin A1 promoter correlates with gene silencing in somatic cell lines, while tissue-specific expression of cyclin A1 is methylation independent. *Mol Cell Biol*, **20**, 3316-3329.
- Muotri, A.R., Marchetto, M.C., Coufal, N.G., Oefner, R., Yeo, G., Nakashima, K. and Gage, F.H. (2010) L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature*, **468**, 443-446.
- Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B. and Cech, T.R. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, **277**, 955-959.
- Narita, N., Nishio, H., Kitoh, Y., Ishikawa, Y., Minami, R., Nakamura, H. and Matsuo, M. (1993) Insertion of a 5' truncated L1 element into the 3' end of exon 44 of the dystrophin gene resulted in skipping of the exon during splicing in a case of Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*, **91**, 1862-1867.
- Niewiadomska, A.M., Tian, C., Tan, L., Wang, T., Sarkis, P.T. and Yu, X.F. (2007) Differential inhibition of long interspersed element 1 by APOBEC3 does not correlate with high-molecular-mass-complex formation or P-body association. *J Virol*, **81**, 9577-9583.

- Nigumann, P., Redik, K., Matlik, K. and Speek, M. (2002) Many human genes are transcribed from the antisense promoter of L1 retrotransposon. *Genomics*, **79**, 628-634.
- Nindl, I., Dang, C., Forschner, T., Kuban, R.J., Meyer, T., Sterry, W. and Stockfleth, E. (2006) Identification of differentially expressed genes in cutaneous squamous cell carcinoma by microarray expression profiling. *Mol Cancer*, **5**, 30.
- OhAinle, M., Kerns, J.A., Malik, H.S. and Emerman, M. (2006) Adaptive evolution and antiviral activity of the conserved mammalian cytidine deaminase APOBEC3H. *J Virol*, **80**, 3853-3862.
- Ohno, S. (1972) So much "junk" DNA in our genome. *Brookhaven Symp Biol*, **23**, 366-370.
- Okumura, H., Noguchi, Y., Uenaka, A., Aji, T., Ono, T., Nakagawa, K., Aoe, M., Shimizu, N. and Nakayama, E. (2005) Identification of an HLA-A24-restricted OY-TES-1 epitope recognized by cytotoxic T-cells. *Microbiol Immunol*, **49**, 1009-1016.
- Ono, M., Kawakami, M. and Takezawa, T. (1987) A novel human nonviral retroposon derived from an endogenous retrovirus. *Nucleic Acids Res*, **15**, 8725-8737.
- Ono, T., Kurashige, T., Harada, N., Noguchi, Y., Saika, T., Niikawa, N., Aoe, M., Nakamura, S., Higashi, T., Hiraki, A., Wada, H., Kumon, H., Old, L.J. and Nakayama, E. (2001) Identification of proacrosin binding protein sp32 precursor as a human cancer/testis antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3282-3287.
- Oricchio, E., Sciamanna, I., Beraldi, R., Tolstonog, G.V., Schumann, G.G. and Spadafora, C. (2007) Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. *Oncogene*, **26**, 4226-4233.
- Ostertag, E.M., DeBerardinis, R.J., Goodier, J.L., Zhang, Y., Yang, N., Gerton, G.L. and Kazazian, H.H., Jr. (2002) A mouse model of human L1 retrotransposition. *Nat Genet*, **32**, 655-660.
- Ostertag, E.M., Goodier, J.L., Zhang, Y. and Kazazian, H.H., Jr. (2003) SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *Am J Hum Genet*, **73**, 1444-1451.
- Ostertag, E.M. and Kazazian, H.H., Jr. (2001a) Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet*, **35**, 501-538.
- Ostertag, E.M. and Kazazian, H.H., Jr. (2001b) Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res*, **11**, 2059-2065.
- Ostertag, E.M., Prak, E.T., DeBerardinis, R.J., Moran, J.V. and Kazazian, H.H., Jr. (2000) Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1418-1423.
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. and Baltimore, D. (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8392-8396.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W. and Obe, G. (2000) Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, **15**, 289-302.
- Piskareva, O., Denmukhametova, S. and Schmatchenko, V. (2003) Functional reverse transcriptase encoded by the human LINE-1 from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif*, **28**, 125-130.
- Pittoggi, C., Sciamanna, I., Mattei, E., Beraldi, R., Lobascio, A.M., Mai, A., Quaglia, M.G., Lorenzini, R. and Spadafora, C. (2003) Role of endogenous reverse transcriptase in murine early embryo development. *Mol Reprod Dev*, **66**, 225-236.

- Polak, P. and Domany, E. (2006) Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes. *BMC Genomics*, **7**, 133.
- Pollock, R., Issner, R., Zoller, K., Natesan, S., Rivera, V.M. and Clackson, T. (2000) Delivery of a stringent dimerizer-regulated gene expression system in a single retroviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13221-13226.
- Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., von Maltzahn, E. and van der Merwe, K.J. (1985) Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol Invest*, **14**, 323-327.
- Polson, A., von Wechmar, M.B. and van Regenmortel, M.H. (1980) Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Commun*, **9**, 475-493.
- Porter, R.M., Corden, L.D., Lunny, D.P., Smith, F.J., Lane, E.B. and McLean, W.H. (2001) Keratin K6irs is specific to the inner root sheath of hair follicles in mice and humans. *Br J Dermatol*, **145**, 558-568.
- Prak, E.T., Dodson, A.W., Farkash, E.A. and Kazazian, H.H., Jr. (2003) Tracking an embryonic L1 retrotransposition event. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1832-1837.
- Quentin, Y. (1992) Fusion of a free left Alu monomer and a free right Alu monomer at the origin of the Alu family in the primate genomes. *Nucleic Acids Res*, **20**, 487-493.
- Raiz, J., Damert, A., Chira, S., Held, U., Klawitter, S., Hamdorf, M., Lower, J., Stratling, W.H., Lower, R. and Schumann, G.G. (2011) The non-autonomous retrotransposon SVA is trans-mobilized by the human LINE-1 protein machinery. *Nucleic Acids Res*, **40**, 1666-1683.
- Rashkova, S., Athanasiadis, A. and Pardue, M.L. (2003) Intracellular targeting of Gag proteins of the Drosophila telomeric retrotransposons. *J Virol*, **77**, 6376-6384.
- Rashkova, S., Karam, S.E., Kellum, R. and Pardue, M.L. (2002a) Gag proteins of the two Drosophila telomeric retrotransposons are targeted to chromosome ends. *J Cell Biol*, **159**, 397-402.
- Rashkova, S., Karam, S.E. and Pardue, M.L. (2002b) Element-specific localization of Drosophila retrotransposon Gag proteins occurs in both nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3621-3626.
- Repanas, K., Zingler, N., Layer, L.E., Schumann, G.G., Perrakis, A. and Weichenrieder, O. (2007) Determinants for DNA target structure selectivity of the human LINE-1 retrotransposon endonuclease. *Nucleic Acids Res*, **35**, 4914-4926.
- Roberts, R.J. (1983) Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res*, **11**, r135-167.
- Roth, D.B. (2003) Restraining the V(D)J recombinase. *Nat Rev Immunol*, **3**, 656-666.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci Usa*, **74**, 5463-5467.
- Sassaman, D.M., Dombroski, B.A., Moran, J.V., Kimberland, M.L., Naas, T.P., DeBerardinis, R.J., Gabriel, A., Swergold, G.D. and Kazazian, H.H., Jr. (1997) Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet*, **16**, 37-43.
- Satta, Y., Klein, J. and Takahata, N. (2000) DNA archives and our nearest relative: the trichotomy problem revisited. *Mol Phylogenet Evol*, **14**, 259-275.
- Schmitz, M.L. and Baeuerle, P.A. (1991) The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *Embo J*, **10**, 3805-3817.

- Schulze, C. (1979) Morphological characteristics of the spermatogonial stem cells in man. *Cell Tissue Res*, **198**, 191-199.
- Schumann, G.G., Gogvadze, E.V., Osanai-Futahashi, M., Kuroki, A., Munk, C., Fujiwara, H., Ivics, Z. and Buzdin, A.A. (2010) Unique functions of repetitive transcriptomes. *Int Rev Cell Mol Biol*, **285**, 115-188.
- Sciamanna, I., Landriscina, M., Pittoggi, C., Quirino, M., Mearelli, C., Beraldi, R., Mattei, E., Serafino, A., Cassano, A., Sinibaldi-Vallebona, P., Garaci, E., Barone, C. and Spadafora, C. (2005) Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene*, **24**, 3923-3931.
- Scott, A.F., Schmeckpeper, B.J., Abdelrazik, M., Comey, C.T., O'Hara, B., Rossiter, J.P., Cooley, T., Heath, P., Smith, K.D. and Margolet, L. (1987) Origin of the human L1 elements: proposed progenitor genes deduced from a consensus DNA sequence. *Genomics*, **1**, 113-125.
- Segal, Y., Peissel, B., Renieri, A., de Marchi, M., Ballabio, A., Pei, Y. and Zhou, J. (1999) LINE-1 elements at the sites of molecular rearrangements in Alport syndrome-diffuse leiomyomatosis. *Am J Hum Genet*, **64**, 62-69.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, **68**, 850-858.
- Silva, R. and Burch, J.B. (1989) Evidence that chicken CR1 elements represent a novel family of retroposons. *Mol Cell Biol*, **9**, 3563-3566.
- Simmons, G.M. (1992) Horizontal transfer of hobo transposable elements within the *Drosophila melanogaster* species complex: evidence from DNA sequencing. *Mol Biol Evol*, **9**, 1050-1060.
- Simpson, G.R., Patience, C., Lower, R., Tonjes, R.R., Moore, H.D., Weiss, R.A. and Boyd, M.T. (1996) Endogenous D-type (HERV-K) related sequences are packaged into retroviral particles in the placenta and possess open reading frames for reverse transcriptase. *Virology*, **222**, 451-456.
- Skowronski, J., Fanning, T.G. and Singer, M.F. (1988) Unit-length LINE-1 transcripts in human teratocarcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1385-1397.
- Skowronski, J. and Singer, M.F. (1985) Expression of a cytoplasmic LINE-1 transcript is regulated in a human teratocarcinoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6050-6054.
- Smit, A.F. (1996) The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 743-748.
- Smit, A.F.A., Toth, G., Riggs, A.D. and Jurka, J. (1995) Ancestral, mammalian-wide subfamilies of LINE-1 repetitive sequences. *J. Mol. Biol.*, **246**, 401-417.
- Snider, L., Geng, L.N., Lemmers, R.J., Kyba, M., Ware, C.B., Nelson, A.M., Tawil, R., Filippova, G.N., van der Maarel, S.M., Tapscott, S.J. and Miller, D.G. (2010) Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene. *PLoS Genet*, **6**, e1001181.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1409-1416.
- Speek, M. (2001) Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Mol Cell Biol*, **21**, 1973-1985.
- Spencer, D.M., Wandless, T.J., Schreiber, S.L. and Crabtree, G.R. (1993) Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science*, **262**, 1019-1024.
- Stauffer, Y., Theiler, G., Sperisen, P., Lebedev, Y. and Jongeneel, C.V. (2004) Digital expression profiles of human endogenous retroviral families in normal and cancerous tissues. *Cancer Immun*, **4**, 2.

- Steele, S.J. and Levin, H.L. (1998) A map of interactions between the proteins of a retrotransposon. *J Virol*, **72**, 9318-9322.
- Stenglein, M.D. and Harris, R.S. (2006) APOBEC3B and APOBEC3F inhibit L1 retrotransposition by a DNA deamination-independent mechanism. *J Biol Chem*, **281**, 16837-16841.
- Swergold, G.D. (1990) Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 6718-6729.
- Switzer, R.C., 3rd, Merrill, C.R. and Shifrin, S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, **98**, 231-237.
- Symer, D.E., Connelly, C., Szak, S.T., Caputo, E.M., Cost, G.J., Parmigiani, G. and Boeke, J.D. (2002) Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability *in vivo*. *Cell*, **110**, (in press; published August 9, 2002).
- Szak, S.T., Pickeral, O.K., Makalowski, W., Boguski, M.S., Landsman, D. and Boeke, J.D. (2002) Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome Biol.*, **in revision**.
- Takahara, T., Ohsumi, T., Kuromitsu, J., Shibata, K., Sasaki, N., Okazaki, Y., Shibata, H., Sato, S., Yoshiki, A., Kusakabe, M., Muramatsu, M., Ueki, M., Okuda, K. and Hayashizaki, Y. (1996) Dysfunction of the Orleans reeler gene arising from exon skipping due to transposition of a full-length copy of an active L1 sequence into the skipped exon. *Hum Mol Genet*, **5**, 989-993.
- Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R.M. and Hannon, G.J. (2008) Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*, **453**, 534-538.
- Tang, W., Gunn, T.M., McLaughlin, D.F., Barsh, G.S., Schlossman, S.F. and Duke-Cohan, J.S. (2000) Secreted and membrane attractin result from alternative splicing of the human ATRN gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6025-6030.
- Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y. and Littman, D.R. (2002) Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell*, **111**, 621-633.
- Tchénié, T., Casella, J.-F. and Heidmann, T. (2000) Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposon. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 411-415.
- Thacker, J., Chalk, J., Ganesh, A. and North, P. (1992) A mechanism for deletion formation in DNA by human cell extracts: the involvement of short sequence repeats. *Nucleic Acids Res*, **20**, 6183-6188.
- Thayer, R.E., Singer, M.F. and Fanning, T.G. (1993) Undermethylation of specific LINE-1 sequences in human cells producing a LINE-1-encoded protein. *Gene*, **133**, 273-277.
- Torrents, D., Suyama, M., Zdobnov, E. and Bork, P. (2003) A genome-wide survey of human pseudogenes. *Genome Res*, **13**, 2559-2567.
- Trelogan, S.A. and Martin, S.L. (1995) Tightly regulated, developmentally specific expression of the first open reading frame from LINE-1 during mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 1520-1524.
- Uhlen, M., Bjorling, E., Agaton, C., Szigyarto, C.A., Amini, B., Andersen, E., Andersson, A.C., Angelidou, P., Asplund, A., Asplund, C., Berglund, L., Bergstrom, K., Brumer, H., Cerjan, D., Ekstrom, M., Eloheid, A., Eriksson, C., Fagerberg, L., Falk, R., Fall, J., Forsberg, M., Bjorklund, M.G., Gumbel, K., Halimi, A., Hallin, I., Hamsten, C., Hansson, M., Hedhammar, M., Hercules, G., Kampf, C., Larsson, K., Lindskog, M., Lodewyckx, W., Lund, J., Lundeberg, J., Magnusson, K., Malm, E.,

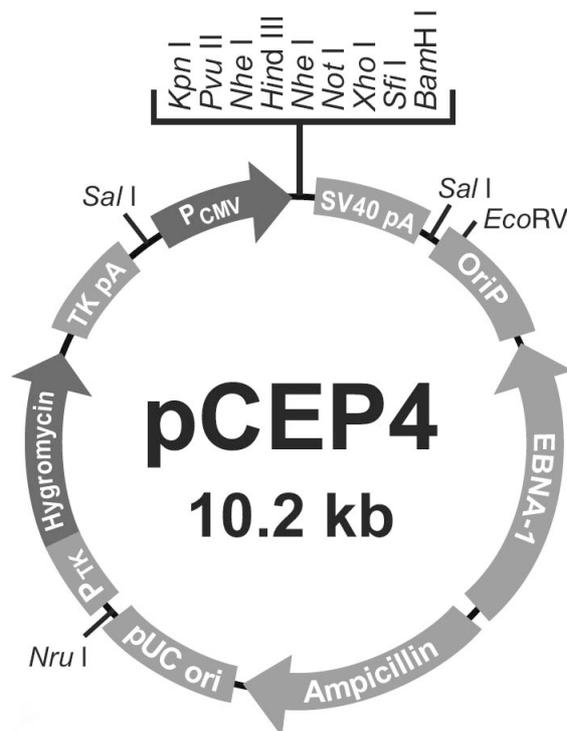
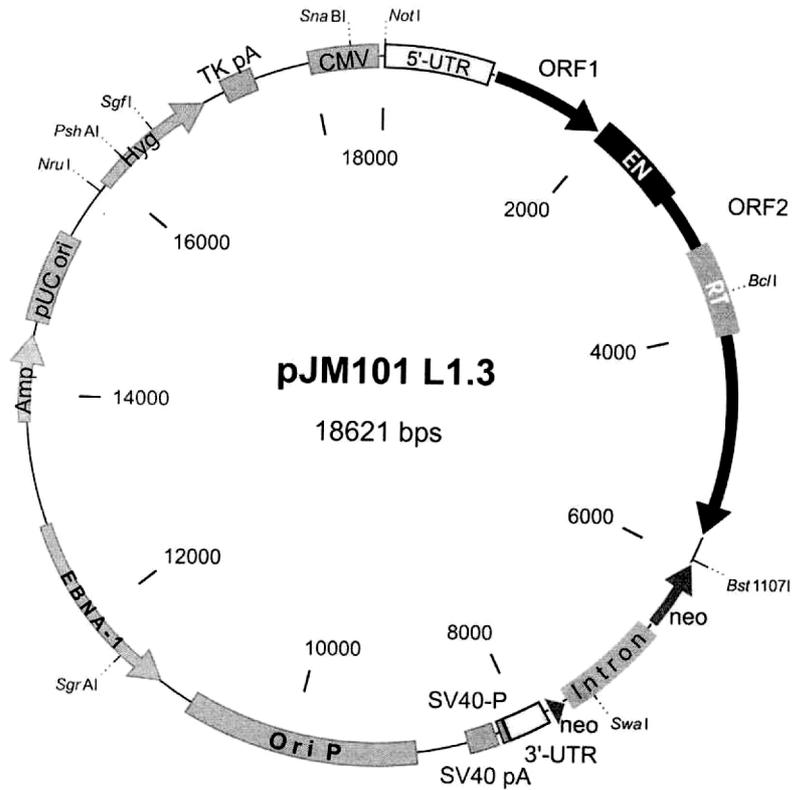
- Nilsson, P., Odling, J., Oksvold, P., Olsson, I., Oster, E., Ottosson, J., Paavilainen, L., Persson, A., Rimini, R., Rockberg, J., Runeson, M., Sivertsson, A., Skollermo, A., Steen, J., Stenvall, M., Sterky, F., Stromberg, S., Sundberg, M., Tegel, H., Tourle, S., Wahlund, E., Walden, A., Wan, J., Wernerus, H., Westberg, J., Wester, K., Wrethagen, U., Xu, L.L., Hober, S. and Ponten, F. (2005) A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics*, **4**, 1920-1932.
- Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J. and Goodman, H.M. (1977) Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science*, **196**, 1313-1319.
- Ullu, E. and Tschudi, C. (1984) Alu sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature*, **312**, 171-172.
- Vanin, E.F. (1985) Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu Rev Genet*, **19**, 253-272.
- Varki, A. (2000) A chimpanzee genome project is a biomedical imperative. *Genome Res*, **10**, 1065-1070.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M.,

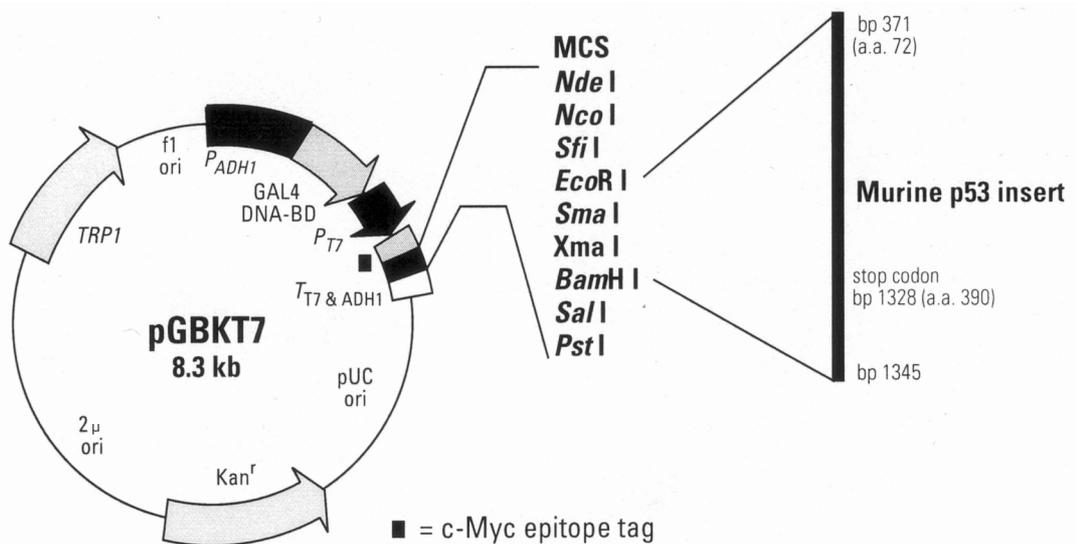
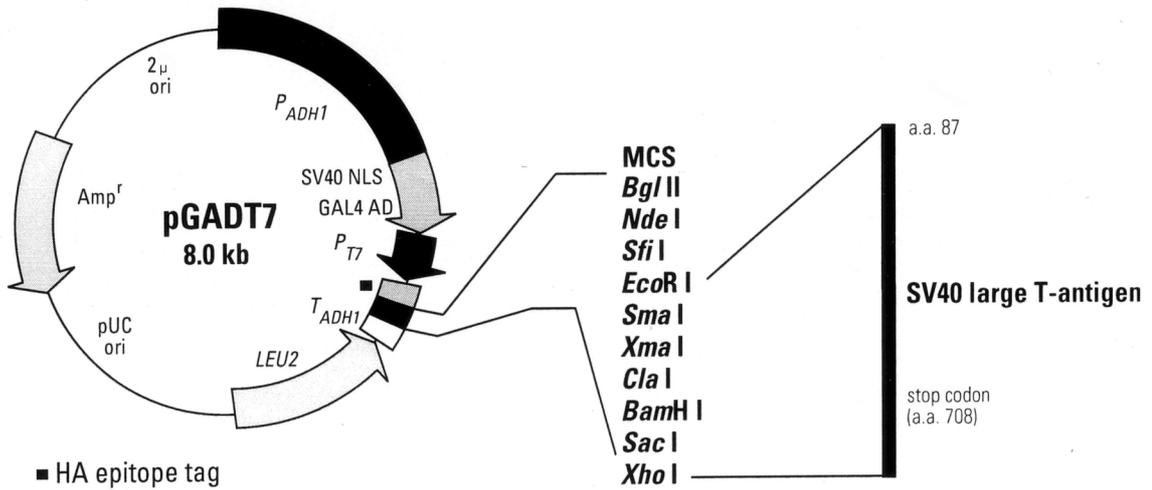
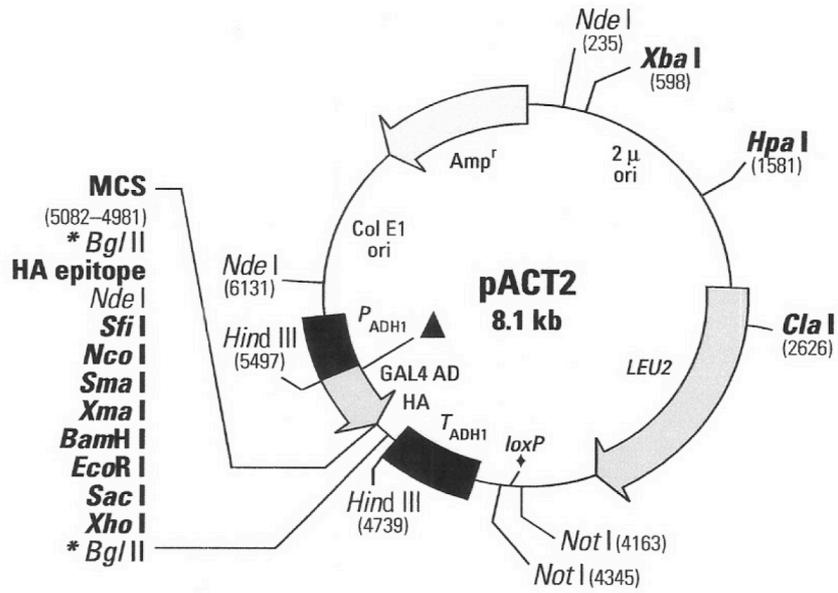
- Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A. and Zhu, X. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-1351.
- von Tschermack, E. (1900) Über künstliche Kreuzung bei *Pisum sativum*. *Berichte der Deutsche Botanische Gesellschaft*, **18**, 232-239.
- Wallace, N.A., Belancio, V.P. and Deininger, P.L. (2008) L1 mobile element expression causes multiple types of toxicity. *Gene*, **419**, 75-81.
- Walsh, G.M., Dewson, G., Wardlaw, A.J., Levi-Schaffer, F. and Moqbel, R. (1998) A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *J Immunol Methods*, **217**, 153-163.
- Wang, T., Lerer, I., Gueta, Z., Sagi, M., Kadouri, L., Peretz, T. and Abeliovich, D. (2001) A deletion/insertion mutation in the BRCA2 gene in a breast cancer family: a possible role of the Alu-polyA tail in the evolution of the deletion. *Genes Chromosomes Cancer*, **31**, 91-95.
- Watson, J.D. and Crick, F.H. (1953a) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737-738.
- Watson, J.D. and Crick, F.H. (1953b) The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **18**, 123-131.
- Wei, W., Gilbert, N., Ooi, S.L., Lawler, J.F., Ostertag, E.M., Kazazian Jr, H.H., Boeke, J.D. and Moran, J.V. (2001) Human L1 retrotransposition: *cis* preference versus *trans* complementation. *Mol Cell Biol*, **21**, 1429-1439.
- Weichenrieder, O., Repanas, K. and Perrakis, A. (2004) Crystal structure of the targeting endonuclease of the human LINE-1 retrotransposon. *Structure*, **12**, 975-986.
- Weinbauer, G.F., and Nieschlag E. (1990) *The role of testosterone in spermatogenesis. In: Testosterone. Action, Deficiency, Substitution. Eds.: Nieschlag, E., HM Behre.* Springer Verlag, Berlin.
- Witherspoon, D.J., Marchani, E.E., Watkins, W.S., Ostler, C.T., Wooding, S.P., Anders, B.A., Fowlkes, J.D., Boissinot, S., Furano, A.V., Ray, D.A., Rogers, A.R., Batzer, M.A. and Jorde, L.B. (2006) Human population genetic structure and diversity inferred from polymorphic L1(LINE-1) and Alu insertions. *Hum Hered*, **62**, 30-46.
- Woodcock, D.M., Lawler, C.B., Linsenmeyer, M.E., Doherty, J.P. and Warren, W.D. (1997) Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7810-7816.
- Woodcock, D.M., Williamson, M.R. and Doherty, J.P. (1996) A sensitive RNase protection assay to detect transcripts from potentially functional human endogenous L1 retrotransposons. *Biochem Biophys Res Commun*, **222**, 460-465.
- Xiong, Y. and Eickbush, T.H. (1990) Origin and evolution of retroelements based on their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.*, **9**, 3353-3362.
- Yang, F., Xu, Y.P., Li, J., Duan, S.S., Fu, Y.J., Zhang, Y., Zhao, Y., Qiao, W.T., Chen, Q.M., Geng, Y.Q., Che, C.Y., Cao, Y.L., Wang, Y., Zhang, L., Long, L., He, J., Cui, Q.C., Chen, S.C., Wang, S.H. and Liu, L. (2009) Cloning and characterization of a novel intracellular protein p48.2 that negatively regulates cell cycle progression. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 2240-2250.

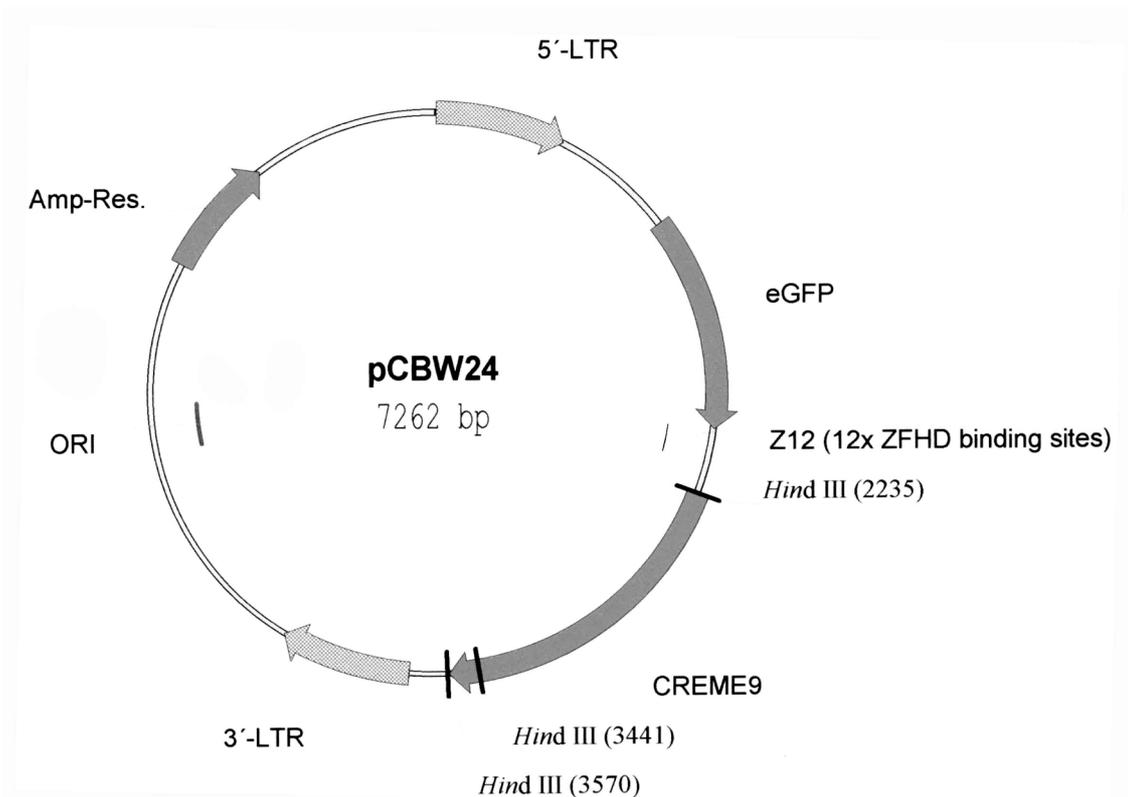
- Yang, N., Zhang, L., Zhang, Y. and Kazazian, H.H., Jr. (2003) An important role for RUNX3 in human L1 transcription and retrotransposition. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4929-4940.
- Yang, Z., Boffelli, D., Boonmark, N., Schwartz, K. and Lawn, R. (1998) Apolipoprotein(a) gene enhancer resides within a LINE element. *J Biol Chem*, **273**, 891-897.
- Yoder, J.A., Walsh, C.P. and Bestor, T.H. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, **13**, 335-340.
- Yu, F., Zingler, N., Schumann, G. and Strätling, W.H. (2001) Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4493-4501.
- Zeuthen, J., Norgaard, J.O., Avner, P., Fellous, M., Wartiovaara, J., Vaheri, A., Rosen, A. and Giovanella, B.C. (1980) Characterization of a human ovarian teratocarcinoma-derived cell line. *Int J Cancer*, **25**, 19-32.
- Zhang, Z., Harrison, P. and Gerstein, M. (2002) Identification and analysis of over 2000 ribosomal protein pseudogenes in the human genome. *Genome Res*, **12**, 1466-1482.
- Zhang, Z., Harrison, P.M., Liu, Y. and Gerstein, M. (2003) Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome. *Genome Res*, **13**, 2541-2558.
- Zhu, Z.B., Hsieh, S.L., Bentley, D.R., Campbell, R.D. and Volanakis, J.E. (1992) A variable number of tandem repeats locus within the human complement C2 gene is associated with a retroposon derived from a human endogenous retrovirus. *J Exp Med*, **175**, 1783-1787.
- Zingler, N., Willhoeft, U., Brose, H.P., Schoder, V., Jahns, T., Hanschmann, K.M., Morrish, T.A., Lower, J. and Schumann, G.G. (2005) Analysis of 5' junctions of human LINE-1 and Alu retrotransposons suggests an alternative model for 5'-end attachment requiring microhomology-mediated end-joining. *Genome Res*, **15**, 780-789.

11 Anhang

VEKTORKARTEN AUSGEWÄHLTER PLASMIDE







NUKLEOTIDSEQUENZ VON L1.3 (Genbank Nummer L19088)

```

1  gggggaggag ccaagatggc cgaataggaa cagctccggt ctacagctcc cagcgtgagc gacgcagaag acggtgattt
81  ctgcatttcc atctgaggtg ccgggttcat ctactaggg agtgccagac agtggggcga ggccagtgtg tgtgcccacc
161  gtgcgcgagc cgaagcaggg cgaggcattg cctcacctgg gaagcgcaag gggtcagggg gttcccttcc tgagtcaaaag
241  aaaggggtga cggtcgcacc tggaaaatcg ggctactccc acccgaatat tgcgcttttc agaccggctt aagaaacggc
321  gcaccacgag actatatccc acacctggct cggaggggtcc tacgccaccg gaatctcgct gatgtctagc acagcagtct
401  gagatcaaac tgcaaggcgg caacgaggct gggggagggg cgcccggccat tgcccaggct tgcttaggta aacaaagcag
481  ccgggaagct cgaactgggt ggagcccacc acagctcaag gaggcctgcc tgcctctgta ggctccacct ctgggggcag
561  ggcacagaca aacaaaaaga cagcagtaac ctctgcagac ttaagtgtcc ctgtctgaca gctttgaaga gagcagtggg
641  tctcccagca cgcagctgga gatctgagaa cgggcagaca gactgcctcc tcaagtgggt ccctgactcc tgacccccga
721  gcagcctaac tgggaggcac ccccagcag gggcacactg acacctcaca cggcagggta ttccaacaga cctgcagctg
801  aggttcctgt ctgttagaag gaaaactaac aaccagaaaag gacatctaca ccgaaaacc atctgtacat caccatcatc
881  aaagaccaaa agtagataaa accacaaaaga tggggaaaaa acagaacaga aaaactggaa actctaaaac gcagagcgcc
961  tctcctctc caaaggaacg cagttcctca ccagcaacgg aacaaagctg gatggagaat gatthtgacg agctgagaga
1041  agaaggttc agacgatcaa attactctga gctacgggag gacattcaaa ccaaaggcaa agaagttgaa aactttgaaa
1121  aaaatttagc tcaatgtata actagaataa ccaatacaga gaagtgccta aaggagctga tggagctgaa aaccaaggct
1201  cgagaactac gtgaagaatg cagaagcctc aggagccgat gcgatcaact ggaagaaagg gtatcagcaa tgaagatga
1281  aatgaatgaa atgaagcgag aagggaagtt tagagaaaaa agaataaaaa gaaatgagca aagcctccaa gaaatggg
1361  actatgtgaa aagaccaaat ctacgtctga ttggtgtacc tgaaagtgat gtggagaatg gaaccaagtt ggaaaact
1441  ctgcaggata ttatccagga gaacttcccc aatctagcaa ggcaggccaa cgttcagatt caggaaatac agagaacgcc
1521  acaagatac tctcagagaa gagcaactcc aagacacata atgtcagat tcaccaaaag tgaatgaag gaaaaaatgt
1601  taagggcagc cagagagaaa ggtcgggtta ccctcaaagg aaagccatc agactaacag tggatctctc ggcagaaacc
1681  ctacaagcca gaagagagtg ggggccaata ttcaacattc ttaaagaaaa gaattttcaa ccagaattt catatccagc
1761  caaactaagc ttcataagtg aaggagaatc aaaactttt atagacaagc aaatgttgag agatthtgc accaccaggc
1841  ctgcccataa agagctcctg aagggaagcg taacatgga aaggaacaac cggtagcagc cgctgcaaaa tcatgcaaaa
1921  atgtaaagac catcgagact aggaagaaac tgcactcaact aatgagcaaa atcaccagct aacatcataa tgacaggatc
2001  aaattcacac ataacaatat taactttaa tataaatgga ctaaatctg caattaaaag acacagactg gcagttgga
2081  taaagagtca agaccatca gtgtgctgta ttcaggaaac ccatctcacg tgcaagagca cacatagctt caaaaataaa
2161  ggatggagga agatctacca agccaatgga aaacaaaaaa aggcaggggt tgcaatccta gtctctgata aaacagactt
2241  taaccaaca aagatcaaaa gagacaaaga aggccattac ataatggtaa aggatcaat tcaacaagag gagctaacta
2321  tccataatat ttatgcacc aatacaggag caccagatt cataaagcaa gtcctcagtg acctacaaag agacttagac
2401  tcccacacat taataatggg agactttaa accccactgt caacattaga cagatcaacg agacagaaag tcaacaagga
2481  taccaggaat ttgaactcag ctctgcacca agcagacctc atagacatct acagaactct ccacccaaa tcaacagaat
2561  atacctttt ttcagacca caccacacct attcctaaaat tgaccacata gttggaagta aagctctcct cagcaaatgt

```

2641 aaagaacag aaattataac aaactatctc tcagaccaca gtgcaatcaa actagaactc aggattaaga atctcactca
2721 aagccgctca actacatgga aactgaacaa cctgctcctg aatgactact gggatcataa cgaatgaag cgagaaataa
2801 agatgttctt tgaaccaac gagaacaaag acaccacata ccagaatctc tgggacgcat tcaaagcagt gtgtagaggg
2881 aaatztatag cactaaatgc ctacaagaga aagcaggaag gatccaaaat tgacacccta acatcacaat taaaagaact
2961 agaaaagcaa gagcaaacac attcaaaaagc tagcagaagc caagaaataa ctaaaatcag agcagaactg aaggaaatag
3041 agacacaaaa aaccttcaa aaaatcaatg aatccagagc ctgggtttttt gaaaggatca acaaaattga tagaccgcta
3121 gcaagactaa taaagaaaa aagagagaag aatcaaatag acacaataaa aatgataaa ggggatatca ccaccgatcc
3201 cacagaaata caaactacca tcagagaata ctacaaacac ctctacgcaa ataaactaga aatctagaa gaatggata
3281 cattcctcga cacatacact ctccaagac taaaccagga agaagttaa tctctgaata gaccaataac aggctctgaa
3361 attgtggcaa taatcaatag tttaccaacc aaaagagtc caggaccaga tggattcaca gccgaattct accagaggta
3441 catggaggaa ctggtaccat tccttctgaa actattccaa tcaatagaaa aagagggaa cctccctaac tcattttatg
3521 aggccagcat cattctgata ccaaagccgg gcagagacac aacaaaaaa gagaatttta gaccaatctc cttgatgaac
3601 attgatgcaa aaatcctcaa taaaatactg gcaaacgaa tcagacgca catcaaaaag cttatccacc atgatcaagt
3681 gggcttcctc cctgggatgc aaggctggtt caatatacgc aaatcaata atgtaatcca gcatataaac agagccaaag
3761 acaaaaacca catgattatc tcaatagatg cagaaaaagc ctttgacaaa attcaacaac cttctatgct aaaaactctc
3841 aataaattag gtattgatgg gacgtatttc aaaaataata gagctatcta tgacaacacc acagccaata tcatactgaa
3921 tgggcaaaaa ctggaagcat tccctttgaa aaccggcaca agcagggat gccctctctc accgctccta tcaacatag
4001 tgttggaagt tctggccagg gcaatcaggc aggagaagga aataaagggt attcaatag gaaaagagga agtcaaattg
4081 tcctgtttg cagcgcacat gattgtatat ctagaaaacc ccactgctc agcccaaat ctcttaagc tgataagcaa
4161 cttcagcaaa gtctcaggat acaaaatcaa tgtacaaaa tcacaagcat tcttataca caacaacaga caaacagaga
4241 gccaaatcat gggtaactc ccattcgtaa ttgcttcaa gagaataaaa tacctaggaa tccaacttac aagggtatgtg
4321 aaggacctct tcaaggagaa ctacaacca ctgctcaagg aaataaaaga ggacacaaac aaatggaaga acattccatg
4401 ctcatgggta ggaagaatca atatcgtgaa aatggccata ctgcccaagg taatttacag attcaatgcc atccccatca
4481 agtaccat gactttctc acagaattgg aaaaactac ttaaagtctc atatggaacc aaaaagagc ccgcatgcc
4561 aagtcaatcc taagcaaaa gaacaagct ggagcatca cactacctga cttcaacta tactacaagg ctacagtaac
4641 caaacagca tggactcgtt accaaaacag agatatagat caatggaaca gaacagagcc ctgagaaata atgccgata
4721 tctacaacta tctgatcttt gacaaactg agaaaaaaa gcaatgggga aaggattccc tattaataa atgggtctgg
4801 gaaaactggc tagccatag tagaaagtg aaactggatc cttccttac acctataca aaaaactaac caagatggat
4881 taaagattta aacgttaaac ctaaaacctt aaaaacctt gaagaaaacc taggcattac cattcaggac ataggcgtg
4961 gcaaggactt catgtccaaa acacaaaag caatggcaac aaaagacaaa attgacaaat gggatctaat taaactaaag
5041 agcttctgca cagcaaaaaga aactaccatc agagtgaaca ggcaacctac aacatgggag aaaaatttcg caacctactc
5121 atctgacaaa gggctaatat ccagaatcta caatgaactt aaacaaattt acaagaaaa aacaacaac cccatcaaaa
5201 agtgggcaaa ggacatgaac agacacttct caaagaaga catttatgca gccaaaaaac acatgaagaa atgctcatca
5281 tcaactggca tcagagaaat gcaaatcaaa accactatga gatatcatct cacaccagtt agaattggaa tcattaataa
5361 gtcaggaaac aacaggtgct ggagaggatg cggagaaata ggaacacttt tactctgttg gtgggactgt aaactagttc
5441 aaccattgtg gaagtcagtg tggcattctc tcaggatctc agaactagaa ataccatttg acccagccat cccactactg
5521 ggtatatacc caaatgagta taaatcatgc tgctataaag acacatgcac acgtatggtt attcggcac tattcaaat
5601 agcaagact tggaccaaac ccaaatgtcc aacaatgata gactggatta agaaaatgtg gcacatatac accatggaat
5681 actatgcagc cataaaaaat gatgagtta tatcctttgt agggacatgg atgaaattgg aaacctatct tctcagtaaa
5761 ctatcgcaag acaaaaaaac caaacaccgc atattctcac tcataggtgg gaattgaaca atgagatcac atggacacag
5841 gaaggggaat atcacactct ggggactgtg gtggggtcgg gggagggggg agggatagca ttggagata tacctaagc
5921 tagatgacac attagtgggt gcagcgacc agcatggac atgtatacat atgtaactaa cctgcacaaat gtgcacatgt
6001 accataaac ttaaagtata ataaa

NUKLEOTIDSEQUENZ VON CREME9 (Genbank Nummer AF120151) + zusätzliche Nukleotide (-12 bis -1) aus eigener 5' mRNA Klonierung von CREME9

-12 ATGAGGGGGG CG

1 atggagctgg agcctgagct gctgttgacg gaggcccgag agaactgga ggcagcgcag agctaccggc gggagctggg
81 tcaccggctt gaggggctgc gtgagcgcgc gaggcagatc aaagaaagtg catcacagac aaggatggt ctcaaacagc
161 attttaaatga ttaaagggga accgttgga agctcctgga tgagcgattg gtgaccttt tgcaagaggt ggacaccatt
241 gaacaggaga ccattaaacc actagatgac tgccagaagc tcatagaaca cggagtcaac actgcagagg acttagtccg
321 agaaggtgaa atcgccatgc ttgggtggtg gggagaagc aatgagaac tgtggagctt taccaaaaag gccctgcaca
401 ttcagttgga cagcttacca gaagtacctt tactggttga tgtgcctgt ttatctgctc agttggatga ctcaattctt
481 aacatagtg aagaccatc ttttaagcat ggaacagtag catctcgccc accagtacag atagaagaac taatagagaa
561 acctggaggc atcattgtac gatggtgtaa ggtggatgat gactttacag cccaagatta caggctccag tttcgtaaat
641 gtacttcaa tcattttgag gatgtatatg taggttctga aactgaattc atagatttgc acatagacc caacgttgat
721 taccagttca gactctcgc ccgaggagat ggccgacagc agtggagtcc ttggagtgtc cccagatag gtcatccac
801 attggtgct catgagtga cagctggtt tgaggggtac agtctgagca gtogaagaaa tatagcactt cggaacgatt
881 ctgaatcacc ggggttctc tactccagag ctccgactta tttctgtggg cagacattaa cattcagatg tgaactgtg
961 ggacagccag acagaagaga tagcatagga gtgtgcgcga aaaaacagga tggatagac tctctgcagc gggatcaagc
1041 tgtgtgcatt agtacaatg gtgcagtttt tgcaatgga aagaaatga caaatcagtt acccgcagtt acttctgggt
1121 ccactgtcac gtttgacatt gaagccgtga ctctaggaac caccagtaat aatgaagggt gacacttcaa gctctgagta

1201 actataagtt caaataatag agaagtgggt tttgactggt tacttgatca gtcttgggt tctctttact ttggatgctc
 1281 atttttctat cctggatgga aagtgttagt gtttta

NUKLEOTIDSEQUENZ VON pCBW23 (VEKTORSEQUENZEN UND SNPs IN GROBBUCHSTABEN, CREME9 mRNA IN KLEINBUCHSTABEN, INTERNE STU I-SCHNITTSTELLE UNTERSTRICHEN)

1 GGGCGAAITG GGCCGACGT CGCATGCCIG CAGGTCGACT CTAGAGGATC CCAATACTgt ttcgcccggc gcgcggccag
 81 atgagggggg cgatggagct ggagcctgag ctgctggttc aggaggcccg cgagaacgtg gaggcagcgc agagctaccg
 161 gcgggagctg ggtcaccggc ttgaggggct gctgtaggag cggaggcaga tcaaGgaaag tgcatcacag acaagggatg
 241 ttctcaaaca gcattttaat gatttaaagg gaacccttgg aaagctcctg gatgagcgat tggtagccct tttgcaagag
 321 gtggacacca ttgaacagga gaccattaaa ccactagatg actgccagaa gctcatagaa cacggagtca aactgcaga
 401 ggacttagtc cgagaaggtg aaatcgccat gcttgggtgt gtgggagaa agaatgagaa actgtggagc tttaccaaaa
 481 aggcctcgca cattcagttg gacagcttac cagaagtacc tttactTgtt gatgtgcctt gtttatctgc tcagttggat
 561 gactcaattc ttaacatagt gaaagaccac atttttaagc atggaacagt agcatctcgc ccaccagtac agatagaaga
 641 actaatagag aaactggag gcatcattgt acgatggtg tttttgactg gttacttgat cagctctgtg gttctcttta
 721 agtttcgtaa atgtacttca aatcattttg aggatgata tgtaggttct gaaactgaat tcatagtatt gcacatagac
 801 cccaacgttg attaccagtt cagagtctgc gcccgaggag atggccgaca ggagtggagt ccttggagtg tccccagat
 881 aggtcattcc acattggtgc ctcatgagtg gacagctggt tttgaggggt acagtctgag cagtcgaaga aatatagcac
 961 ttcggaacga ttctgaatca tccgggtgttc tctactccag agctccgact tatttctgtg ggcagacatt aacattcaga
 1041 gttgaaactg tgggacagcc agacagaaga gatagcatag gagtgtgtgc agaaaaacag gatggatag actctctgca
 1121 gcgggatcaa gctgtgtgca ttagtcaaaa tgggtcagtt tttgtcaatg gaaaagaaat gacGaatcag ttaccgcgag
 1201 ttacttctgg gtccactgct acgtttgaca ttgaagccgt gactctagga accaccagta ataatgaagg tggacacttc
 1281 aagcttcgag taactataag ttcaaataat agagaagtgt tttttgactg gttacttgat accctctgtg gttctcttta
 1361 ctttggatgc tcatttttct atcctggatg gaaagtgtta gtgttttaga tgaATCACTA GTGAATTGCG GGCCGCTGC
 1441 AGGTCGACCA TATGGGAGAG CTCCAACGC GTTGGATGCA TAGCTTIGAGT ATTCTATAGT GTCACCTAAA TAGCTTGGCG
 1521 TAATCATGTT CATAGCTGTT TCCGTGTGTA AATTGTTTATC CGTCAACAAT TOCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA
 1601 GTGTAAAGCC TGGGTGCTT AATGAGTIGAG CTAATCACA TTAATTGCGT TCGCGTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA
 1681 ACCTGTCTG CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTTGCGTA TTGGGCGCTC TTCGCTTCC
 1761 TCCGTCACGT ACTCGCTGCG CTCGGTCTGT CCGTCTGCGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGCGGTAAA TACGGTTATC
 1841 CACAGAATCA GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AATGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGCCCGCT
 1921 TGCTGGCGTT TTTCCATPAG CTCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAT CAGCGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCG
 2001 ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGGTTTCCC CCTGGAAGCT CCTCGTGC GCTCTCTGTT CCGACCTGC CGCTTACCG
 2081 ATACCTGTCC GCCTTCTTCC CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCATAGCT CAGCGTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG
 2161 TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCGCT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT
 2241 GAGTCCAACC CGTAAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG
 2321 CCGTCTTACA GAGTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACTACTAGAA GAACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGTGA
 2401 AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGAAT CGGCAACAA ACCACCCTG GTAGCGGTG TTTTFTTGT
 2481 TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG AAGATCCCTTT GATCTTTTCT ACGGGTCTG ACGTCACTG
 2561 GAACGAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACTA GATCTTTTAA AATTAATAAT
 2641 GAAGTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC
 2721 TCAGCGATCT GTCATTTTCG TTCATCCATA GTTGCCTGAC TCCCCTGCT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC
 2801 ATCTGGCCCC AGTGTGCAA TGATACCGCG AGACCACGC TCACCGCTC CAGATTATATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG
 2881 GAAGGCCGGA GCGCAGAAGT GGTCTGCAA CTTTATCCCG CTCCATCCAG TCTATTAATT GTTGGCCGGA AGCTAGAGTA
 2961 AGTAGTTGCG CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTGCA TGTCTACAGG CATCTGTGTG TCACGCTCTG CGTTTGGTAT
 3041 GGTTCATTT AGTCTCGGTT CCCAACGATC AAGCGAGTTC ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG GTTAGCTCTT
 3121 TCGGTCCCTC GATCGTTGTC AGAAGTAAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC ATGGTATGAG CAGCACTGCA TAAATCTCTT
 3201 ACTGTCAATG CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTAAC CAAGTCAATC TGAGAATAGT GTATGCGCGG
 3281 ACCGAGTTGC TCTTGGCCGG CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTTGAA
 3361 AACGTTCTTC GGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGTAGATC AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC
 3441 TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTACCCAGC GTTCTTGGGT GAGCAAAAAA AGGAAGGCAA AATGCGCAA AAAAGGGAAT
 3521 AAGGCGACA CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCTTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATGTCTCA
 3601 TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT TTCCCGAAA AGTGCACCT
 3681 GATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA TACCGCATCA GAAATTTGTA AGCGTTAATA TTTTGTAAA
 3761 AATCGCGTTA AATTTTGTGTT AAATCAGCTC AATTTTAAAC CAATAGGCGG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAA
 3841 AATAGACCGA GATAGGGTTG AGTGTGTGTT CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA CTATTAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAA
 3921 GGGCGAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC CCACTACGTT AACCATCAC CTAATCAAGT TTTTGGGGT CGAGGTGCCG
 4001 TAAAGCACTA AATCGGAACC CTAAGGGGAG CCCCAGATT AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GCGAAGCTG GCGAGAAAGG
 4081 AAGGAAGAA AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA GGGCGCTGCC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC CCGTAACCAC CACACCCGCC
 4161 GCGTTAATG CCGCGTACA GGGCGCTCC AATCGCCATT CAGGCTGCGC AACTGTGTTGG AAGGCGATC GGTGCGGGC
 4241 TCTTCGCTAT TACGCCAGCT GCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGCGGATT AAGTTGGGTA ACGCCAGGGT TTTCCAGCT
 4321 ACGAGTTGT AAAACGACGG CCAATGAATT GTAATACGAC TCACTATA

NUKLEOTIDSEQUENZ VON 2.6.5

1 CGGGAGCAGA TCAAGGCGCT AAACAACAAG TTCGCCTCCT TCATCGACAA GGTGCGGTTT CTGGAGCAGC AGAATCAGGT
81 GCTAGAGACC AAGTGGAAAC TCCTACAGCA GCTGGACTTG AACAACTGCA GGAAGAACCT GGAGCCCAIT TATGAGGGCT
161 ACATCAGCAA CCTGCAGAAG CAGCTGGAGA TGC'TGTCTGG GGACGGGGTG AGGCTGGATT CGGAGCTGAG GAACATGCAG
241 GAITTGGTGG AGGACTACAA GAAGAGGTAT GAGGTGGAGA TTAACAGACG

NUKLEOTIDSEQUENZ VON 2.10.5

1 ATGGCCTGGA GGCCCCGGG ATCCGAATTC GCGGCCGCGT CGACAACATG TCGGGGATCG CCCTCAGCAG ACTCGCCAG
81 GAGAGGAAAG CATGGAGGAA GACCACCCAT TTGGTTTCGT GGC'TGTCCA ACAAAAAATC CCGATGGCAC GATGAACCTC
161 ATGAACTGGG AGTGCGCCAT TCCAGGAAAG AAAGGGACTC CGTGGGAAGG AGGCTTGT'TT AAAC'TACGGA TGCTTTTCAA
241 AGATGATTAT CCATCTTCGC CACCAAAATG TAAATTCGAA CCACCATAT T'TCACCCGAA TGTGTACCCT TCGGGGACAG
321 TGTG

NUKLEOTIDSEQUENZ VON 4.6.6 (UNBEKANNTE NUKLEOTIDE SIND DURCH EIN N GEKENNZEICHNET)

1 AAGGCCAGA GCACAAGCAG GAGCAAGGAG TGGAGCACAG GCAGGAGCCG ACACAAGAAC ACAAGCAGGA AGAGGGGCAG
81 AAACAGGAAG AGCAAGAAGA GGAACAGGAA GAGGAGGGAA AGCAGGAAGA AGGACAGGGG ACTAAGGAGG GACNGGAGGC
161 TGTGTCTCAG CTGCAGACAG ACTCAGAGCC CANGTTTCAC TCTGAATCTC TATCTTCTAA CCCTTCCTCT TTTGCTCCCC
241 GGGTACGAGA AGTAGAGTCT ACTCCTATGA TAA'TGGAGAA CATCCAGGAG CTCAITTCGAT CAGCCAGGA AATAGATGAA
321 ATGAATGAAA TATATGATGA GAACTCCTAC TGGAGAAACC ATAACCCTGG CAGCCTCTG CAGCTGCCCC ACACAGAGGC
401 CTGTCTGGTG CTGTGCTATT CGATCGTGA GAATACCTGC ATCNIAACCC CCACAGGCAC TANGCCCTGC AAGTCCCATG
481 GGACGANNG ANATCCTTTG GTTT

NUKLEOTIDSEQUENZ VON 4.10.4/4.10.59

1 AGAGATCTCT ATGGCTTACC CATAAGATGT TCCAGATTAC GCTAGCTTGG GTGGTCATAT GGCCATGGAG GCCCGGGGA
81 TCCGAATTCG CGGCCGCTC GACGTGGAG ATGATGATGA CCGAGTGTCT CTCAAATGTG AGAAGAAAAA TAAAAGTAGA
161 GATGCACACA GTTATCTTTG GAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
241 AAAAAAAAAA AAAC

NUKLEOTIDSEQUENZ VON 4.10.16

1 CGAGAAGGTG AAATCGCCAT GCTTGGTGGT GTGGGAGAAG AGAATGAGAA ACTGTGGAGC TTTACCAAAA AGGCCTCGCA
81 CATTCAGTTG GACAGCTTAC CAGAAGTACC TTTACTGGTT GATGTGCCTT GTTTATCTGC TCAGTTGGAT GACTCAAITC
161 TTAACATAGT GAAAGACCAC ATTTTTAAGC ATGGAACAGT AGCATCTCGC CCACCAGTAC AGATAGAAGA ACTAATAGAG
241 AAACCTGGAG GCATCATTTG ACGATGGTGT AAGGTGGATG ATGACTTTAC AGCCCAAGAT TACAGGCTCC AGTTTCGTAA
321 ATGTACTIONA AATCAITTTG AGGATGTATA TGTAGGTTCT GAAACTGAAT TCATAGTATT GCACATAGAC CCCAACGTTG
401 ATTTACCAGTT CAGAGTCTGC GCCCGAGGAG ATGGCCGACA GGAGTGGAGT CCTTGGAGTG TCCCCAGAT AGGTCAITTC
481 ACATTTGGTGC CTCATGAGTG GACAGCTGGT TTTGAGGGGT ACAGTCTGAG CAGTCGAAGA AATATAGCAC TTCGGAACGA
561 TTCTGAATCA TCGGGTGTTC TCTACTCCAG AGCTCCGACT TATTTCTGTG GGCAGACAIT AACATTCAGA GTTGAAACTG
641 TGGGACAGCC AGACAGAAGA GATAGCATAG GAGTGTGTGC AGAAAAACAG GATGGATATG ACTCTCTGCA GCGGGATCAA
721 GCTGTGTGCA TTAGTACAAA TGGTGCAGTT TTTGTCAAAT GAAAAAGAAAT GACAAATCAG TTACCCGAG TTACTIONG
801 GTCCACTGTC ACGTTTGACA TTGAAGCCGT GACTCCAGGA ACCACCAGTA AATAATGAAGG TGGACACTTC AAGCTTCGAG
881 TAACTATAAG TTCAAATPAAT AGAGAAGTGG TTTTGTGACTG GTTAAAAAA

Danksagungen

Ich danke allen, die mich unterstützt und durch Ihren Beitrag das Entstehen dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Mein Dank gilt vor allem Professor Dr. Gerald G. Schumann für die intensive Betreuung, sowie seine ehrliche und direkte Art der Meinungsäußerung. Hervorzuheben ist hier besonders seine offene Diskussionsbereitschaft und die Freiräume, die er mir zur Umsetzung meiner wissenschaftlichen Ideen eingeräumt hat.

Professor Dr. Wolfram Ostertag[†] danke ich für die Übernahme der formellen Anleitung meiner Arbeit und die Förderung meines wissenschaftlichen Interesses.

Professor Dr. Thomas Dobner gilt mein Dank für die Übernahme der Anleitung meiner Arbeit nach dem bedauerlichen Tod von Professor Dr. W. Ostertag und der Begutachtung dieser Dissertation.

Professor Dr. W. H. Strätling möchte ich für die zeitweilige Aufnahme in seiner Abteilung und die produktive Zusammenarbeit sehr danken.

Unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Süleyman Ergün bin ich für die Zeit in seinem Labor und die Unterstützung bei der Untersuchung von humanen Gewebeproben sehr zu Dank verpflichtet.

Arbeitsgruppe Schumann

Dr. J. Heukeshoven[†] danke ich für die massenspektrometrische Untersuchung meiner Proben und seiner Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Professor Dr. J. Löwer und Dr. R. Löwer danke ich für den Arbeitsplatz am Paul-Ehrlich-Institut in Langen.

Dr. Frank Schnieders möchte für das Einbringen seiner Expertise bei der Immunfluoreszenzmikroskopie danken.

Allen Mitgliedern der Arbeitskreise von Prof. G. G. Schumann, Prof. W. Ostertag, Prof. J.-M. Buerstedde, Prof. W. Strätling, Dr. R. Löwer und Prof. S. Ergün danke ich die freundliche Aufnahme, wissenschaftliche Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre.

Vor allem danke ich natürlich meiner Familie, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat.

Meiner Lebenspartnerin Dr. Britta Löffler gilt mein spezieller Dank. Diese Arbeit würde ohne ihren Ansporn nicht existieren.

Publikationen

Ergun, S.[#], Buschmann, C.[#], Heukeshoven, J., Dammann, K., Schnieders, F., Lauke, H., Chalajour, F., Kilic, N., Stratling, W. H., and Schumann, G. G. (2004). Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues. *J Biol Chem* 279, 27753-27763. ([#]Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen)

Kirilyuk, A., Tolstonog, G. V., Annette Damert, A., Held, U., Hahn, S., Löwer, R., Buschmann C., Horn, A. V., Traub, P., and Schumann, G. G. (2008). Functional endogenous LINE-1 retrotransposons are expressed and mobilized in rat chloroleukemia cells. *Nucleic Acids Research* 36, 648-665.