

**Entwicklung von zellulären Indikatorsystemen zur
Identifikation von Modulatoren der HIV-1 Genexpression**

Horst Wolff

Juni 2003

*meiner Familie
und Birgit*

**Entwicklung von zellulären Indikatorsystemen zur
Identifikation von Modulatoren der HIV-1 Genexpression**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der
Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Horst Wolff, München
im Juni 2003

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,
Institut für Molekulare Virologie

1. Berichterstatter: PD Dr. Ruth Brack-Werner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Tag der mündlichen Prüfung: 8. April 2004

*Der Geist der Medizin ist leicht zu fassen, ihr durchstudiert die groß' und kleine Welt,
um es am Ende gehn zu lassen, wie's Gott gefällt.*

Goethe (Faust I)

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	4
1.1 EINFÜHRUNG	4
1.2 RETROVIREN UND HIV-1	6
1.2.1 Geschichte.....	6
1.2.2 Retroviren	7
1.3 HIV	9
1.3.1 Struktur des viralen Genoms und des Virions.....	9
1.3.2 Die HIV-Infektion und der HIV-Lebenszyklus.....	12
1.3.3 Die regulatorischen HIV-1 Proteine Tat und Rev	18
Tat (Transactivator of transcription) und LTR (long terminal repeat).....	18
Rev (Regulator of expression of virion proteins).....	19
1.4 HIV-1 REV IN ASTROZYTEN	25
1.6 AUF DER SUCHE NACH NEUEN ANTIVIRALEN THERAPIEMÖGLICHKEITEN.....	31
Eintrittsinhibitoren.....	31
Gentherapeutische Ansätze.....	31
Impfungen und Immuntherapie.....	32
Ribozyme und siRNAs	33
Inhibitoren regulatorischer Proteine	33
1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	37
2 MATERIAL UND METHODEN	38
2.1 MATERIAL.....	38
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	38
Puffer und Lösungen.....	38
Reagenzien	40
Sonstiges Verbrauchsmaterial.....	42
Verwendete Kits	42
2.1.2 Medien.....	43
Bakterienmedien.....	43
Medien für Säugetierzellen.....	43
2.1.3 Antikörper.....	44
Primäre Antikörper.....	44
Sekundäre Antikörper	44
2.1.4 Plasmide	44
Rev Expressionsplasmide.....	44
Tat-Expressionsplasmide.....	46
Reportervektoren.....	47
Weitere Vektoren.....	49
2.1.5 Zelllinien	50
2.1.6 Bakterienstämme	52
2.1.7 Spezialsoftware	53
2.1.8 Spezialgeräte	54
2.2 METHODEN	57
2.2.1 Zellkulturtechniken.....	57
Kultivierung von eukaryotischen Zellen und Zellzahlbestimmung	57
Auftauern und Einfrieren von Zellen	58
Bestimmung der Lebensfähigkeit eukaryotischer Zellen.....	58
Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid DNA mittels FuGENE6 Transfektionsreagenz.....	59
Herstellung stabiler Zelllinien.....	62
2.2.2 FACS-Analyse	63
2.2.3 Auswertung von FACS-Experimenten.....	65
2.2.4 Durchführung von Rev-Funktionsanalysen.....	68
2.2.5 Assay zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von INS-Regionen.....	71
2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie	71
Photobleich-Experimente (FRAP) am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM).....	72
Quantifizierung von fluoreszierenden Proteinen in der Zelle.....	73
2.2.7 Molekularbiologische Methoden.....	75
Plasmid-DNA (pDNA)-Isolierung aus Bakterien	75
Plasmidmaxipräparation	75

Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	76
Plasmidminipräparation	77
DNA-Restriktionsverdau	79
Agarosegelelektrophorese	80
DNA-Isolierung aus Agarose Gelen.....	80
DNA-Ligation	80
2.2.8 Klonierungstechniken	81
Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	81
Polymerase Kettenreaktion.....	81
Klonierung von PCR Fragmenten	84
Sequenzierung	85
2.2.9 Proteinanalytik	85
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot	85
Proteinisolierung aus Zellkulturmaterial.....	85
Gelelektrophorese	85
Western Blot	86
2.2.10 RNA-Methoden.....	87
RNA-Isolierung aus Zellkulturmaterial mit RNEasy Kit (Quiagen).....	87
Isolierung von polyA-haltiger RNA aus Gesamt-RNA	87
Herstellung von cDNA-Banken aus Astrozytom-Zellen	87
2.2.11 Statistik.....	88
2.2.12 Online Datenbanken.....	89
3 ERGEBNISSE	90
3.1 ENTWICKLUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES NEUEN TAT/REV- REPORTER ASSAYS	90
3.1.1 Erzeugung neuer Reporter-Plasmide für die Tat- und Rev Funktionsanalyse	90
Das Plasmid pLRedR (Basiskonstrukt)	91
Das Plasmid pLRed (Tat-Reporter)	93
Das Plasmid pLRedINSR (Rev-Reporter1)	94
Das Plasmid pLRed(2xINS)R (Rev-Reporter2)	96
3.1.2 FACS-Analyse der RFP-Expression der Reporter-Plasmide	98
Induktion der RFP-Expression durch Tat.....	102
Induktion der RFP-Expression durch Rev	104
3.1.3 Analyse von neu identifizierten INS-Regionen im HIV-Genom.....	108
3.1.4 Generierung der stabilen Reporter-Zelllinie HeLa-Tat ROD	115
3.2 FUNKTIONALITÄSTESTS VON REV-KONSTRUKTEN	118
3.3 ANALYSE DER INTRAZELLULÄREN BEWEGLICHKEIT VON REV-GFP KONSTRUKTEN DURCH FRAP	129
3.4 IDENTIFIKATION VON INHIBITOREN DER REPORTER-EXPRESSION.....	134
3.4.1 Durchführung des Inhibitor-Screenings.....	134
Mikroskopisches Screening	135
FACS-basiertes Screening	139
Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Zellen durch cDNA-Transfektionen.....	141
3.4.2 Identifizierte Faktoren.....	142
I-alpha b4	145
I-kappa b2	146
III-delta-37	147
II-alpha-89	148
III-delta-55	148
II-beta-47.....	149
III-beta-36	149
II-lambda-23.....	150
III-alpha-65	150
II-gamma-52, III-alpha-56, II-delta-76.....	151
4 DISKUSSION.....	152
4.1 REPORTER-PLASMIDE.....	152
Die Reporter-Zelllinie HeLa-Tat ROD eignet sich für Rev-Funktionsanalysen.....	155
4.2 BESTIMMUNG DER RNA-DESTABILISIERENDEN AKTIVITÄT VON INS-REGIONEN.....	158
4.3 INHIBITOREN DER HIV-GENEXPRESSION.....	160
Zelluläre Interaktionspartner als Angriffsort	161
Virale Faktoren als Angriffsort	162
4.3.1 Möglichkeiten und Grenzen von zellulären Tat- und Rev-Inhibitoren.....	162
Probleme zellulärer Inhibitoren.....	166
4.3.2 Identifizierte inhibitorische Faktoren der HIV-1 Gen-Expression.....	167
Weitere Vorgehensweise und Abwägung der Ergebnisse.....	169

4.4 NUKLEO-ZYTOPLASMATISCHE BEWEGLICHKEIT VON REV ^{M5M10} BL.....	171
4.5 EIGENSCHAFTEN VERSCHIEDENER REV-KONSTRUKTE	172
4.6 DIE ASTROZYTEN-VERMITTELTE INHIBITION DER REV-FUNKTION	178
<i>Modelle der Astrozyten-vermittelten Rev-Inhibition</i>	180
4.7 AUSBLICK	184
5 ZUSAMMENFASSUNG	185
VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	186
LITERATURVERZEICHNIS.....	189
DANKSAGUNG.....	206
LEBENS LAUF	207
ANHANG I - VERWENDETE PRIMER	I
ANHANG II - PLASMIDKARTEN	III
ANHANG III - cDNA-SEQUENZEN UND ERGEBNISSE DER DATENBANKSUCHE	VIII
ERKLÄRUNG	

1 Einleitung

1.1 Einführung

Im Juni des Jahres 1981 wurde von der Seuchenbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika, CDC (Center for Disease Control) erstmals das gehäufte Auftreten von seltenen Krankheiten, wie oralen Pilzinfektionen, Kaposi-Sarkomen und *Pneumocystis carinii* Pneumonien, bei jungen homosexuellen Männern beschrieben. Diese Krankheiten waren durch keine damals bekannten Ursachen ausgelöst, gingen in der Regel mit einer Verringerung von CD4-positiven T-Zellen einher und es trat trotz medizinischer Behandlung meist eine schnelle Verschlechterung des Patientenzustandes ein.

Es wurden in den folgenden 3 Jahren unterschiedliche Theorien über die Identität des verantwortlichen Agens für das so genannte erworbene Immunschwächesyndrom AIDS (CDC 1982 a);(CDC 1982 c) geäußert. Neben nichtinfektiösen Ursachen wurden Mycoplasmen und Pilze ebenso wie Viren, insbesondere Retroviren, in Betracht gezogen. Die Theorie, dass es sich bei dem Erreger von AIDS um ein Virus handelt, das mit den bereits beschriebenen humanen T-Zell Leukämie Viren (HTLV) verwandt sein könnte, wurde zwar bereits 1982 geäußert aber sie setzte sich erst endgültig durch, als mehrere Arbeitsgruppen kontinuierliche Zellkulturen mit Virus-infizierten Zellen etablieren konnten. Ein im Mai 1983 zum ersten Mal erwähntes neues T-Zell tropes Virus (Barre-Sinoussi, Cherman et al. 1983);(Gallo, Sarin et al. 1983) wurde später als verantwortlich für das Entstehen von AIDS identifiziert und schließlich als HIV, humanes Immundefizienz Virus, bezeichnet.

In den Jahren 1984 und 1985 wurden nun erste, entscheidende Fortschritte in der Erforschung der Biologie von HIV-1 gemacht. In dieser Zeit wurden viele der Gene von HIV identifiziert und die Genome verschiedener Virus-Isolate sequenziert. Diese Forschung legte unter anderem auch die Grundlage für die Entwicklung der ersten antiviralen Therapie mit Azidothymidin (AZT).

Ebenso wurde die Entstehung und Entwicklung von AIDS detailliert untersucht und die Eckpunkte der Pathogenese nach erfolgter HIV-Infektion schon damals wie folgt definiert: (i) Häufiges Auftreten eines akuten viralen Syndroms mit Virämie, (ii) Auslösung einer starken primären Immunantwort, (iii) Persistieren der Infektion trotz

Immunantwort, (iv) kontinuierlicher Abfall der Zahl an CD4-positiven T-Zellen und schließlich (v) Entwicklung von opportunistischen Infektionen und Kanzerosen im geschwächten Organismus. Auch wurde schon zu dieser Zeit die hohe genetische Variabilität von HIV erkannt und mit seiner Fähigkeit der Immunantwort zu entkommen in Verbindung gebracht. Ebenfalls wurde schon wenig später HIV-2 entdeckt (Clavel, Guetard et al. 1986).

Trotz der unzähligen HIV-(1 und 2) Forschungsprojekte, denen sich Arbeitsgruppen seither weltweit widmeten, hat die Thematik HIV und AIDS bis heute nichts von ihrer Aktualität und Brisanz verloren. Offizielle Stellen, wie das CDC und das Robert-Koch-Institut (RKI) betonen regelmäßig die stetig wachsende Zahl und das kaum abschätzbare Ausmaß der weltweiten HIV-Infektionen und ihrer Auswirkung auf die Bevölkerung weiter Teile der Erde. Nach Angaben der *World Health Organization* (WHO) und UNAIDS (www.unaids.org) gibt es inzwischen weltweit geschätzte 42 Millionen HIV-Infizierte (stand Dezember 2002) und 2002 kamen über 5 Millionen Neuinfektionen dazu. HIV und AIDS sind damit grundsätzlich als globales Problem anzusehen. Mehr als 95% der HIV-positiven Menschen leben in so genannten Entwicklungsländern, oder zumindest nicht in Industrieländern. AIDS ist daher ein Problem das abhängig von der betroffenen Region oder dem betroffenen Land unterschiedliche Konzepte erfordert. Aufklärung der AIDS-Sozialarbeiter, der AIDS-behandelnden Ärzte und der aller Bevölkerungsgruppen ist ebenso notwendig wie weitere angewandte und Grundlagen-Forschung (Priya 2003).

Trotzdem das Ausmaß des HIV/AIDS-Problems in den Industrieländern erkannt wird und trotz großer Anstrengungen zur Erforschung von HIV und AIDS ist noch immer nicht die gesamte Biologie des Virus, gerade im Zusammenspiel mit dem Wirtsorganismus, verstanden. Und noch immer gibt es weder eine erfolgreiche Impfung, noch eine Therapie, die die Infektion beseitigt oder zumindest in gut verträglicher Weise lebenslang in Schach hält. Diese offenen Fragen und bestehenden Probleme führen mit dazu, dass sich eine wachsende Zahl von Menschen und sogar Regierungen von der etablierten Theorie der Entstehung von AIDS durch HIV abwendet (Leitner 2000) und dadurch Nährboden für eine sich weiter ausbreitende Epidemie geschaffen wird. Der Auftrag der HIV-Forschung der Zukunft ist damit, noch bestehende Fragen zu beantworten, therapeutische Probleme zu lösen und das wissenschaftliche Fundament für politische Entscheidungen zu liefern.

1.2 *Retroviren und HIV-1*

1.2.1 **Geschichte**

Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) gehört zu den Retroviren, deren Existenz schon lange in der Medizin und Biologie vermutet wurde, obwohl erst 1981 das erste humane Retrovirus gefunden wurde. Die meisten Retroviren infizieren Vertebraten, sind aber prinzipiell bei nahezu allen Gruppen von Lebewesen zu finden. Mit ihrer Entdeckung und der Entdeckung der Reversen Transkriptase wurde das zentrale Dogma der Biologie gestürzt, dass der Fluss der genetischen Information immer von der DNA zur RNA läuft (Temin and Mizutani 1970; Temin 1986). Für diese Entdeckung erhielt Howard Temin schließlich 1975 einen Nobelpreis in Physiologie/Medizin. Es folgen einige wichtige Meilensteine in der Geschichte der Erforschung der Retroviren:

1904 Ellermann und Bang übertragen Geflügelleukose mit zellfreiem Gewebefiltrat auf Hühner und belegen die infektiöse Natur dieser Krankheit.

1911 Peyton Rous überträgt Hühnertumoren durch Gewebeverpflanzung. Er isoliert den Infektionserreger, das Rous Sarkom Virus.

1960 Howard Temin schlägt vor, dass es eine Reverse Transkriptase bei Retroviren geben müsse.

1969 Huebner und Todaro stellen die Hypothese von viralen Onkogenen vor.

1970 Die Entdeckung einer reversen Transkriptase wird von Temin beschrieben.

1981 Das Humane T-Zell-Leukämie-Virus wird gefunden.

1983 Entdeckung von HIV-1.

1.2.2 Retroviren

Seit einigen Jahren werden die Retroviren der Vögel und Säugetiere in sieben Gattungen eingeteilt, die aufgrund von Vergleichen der Sequenzen und des Genomaufbaus erstellt wurden (Modrow 2003). Eine wichtige Gattung stellen dabei die Lentiviren dar, die ihren Namen (*lat.* lentus = langsam) von ihrer Eigenschaft haben, in Wirten langsam verlaufende Krankheiten mit langen Latenzzeiten hervorzurufen. Zu den Lentiviren gehört einerseits die Untergattung der Primaten-Lentiviren und andererseits Virusarten, die nicht Primaten sondern andere Vertebraten, wie Katzen (FIV), Rinder (BIV), Pferde (EIAV), Schafe (VMV) und Ziegen (CAEV), infizieren. Primaten-Lentiviren setzen sich hauptsächlich aus verschiedenen Arten von Viren zusammen, die entweder als SI- oder HI-Viren bezeichnet werden. HIV-1 lässt sich wiederum in drei Gruppen, M, O und N einteilen, von denen die M-Gruppe die Bedeutendste mit mehr als 10 Subtypen ist. Schematische Übersichten der Stammbäume verschiedener Retro- und Lentiviren in der Beziehung zu HIV-1 sind in Abbildung 1.1 und 1.2 gegeben.

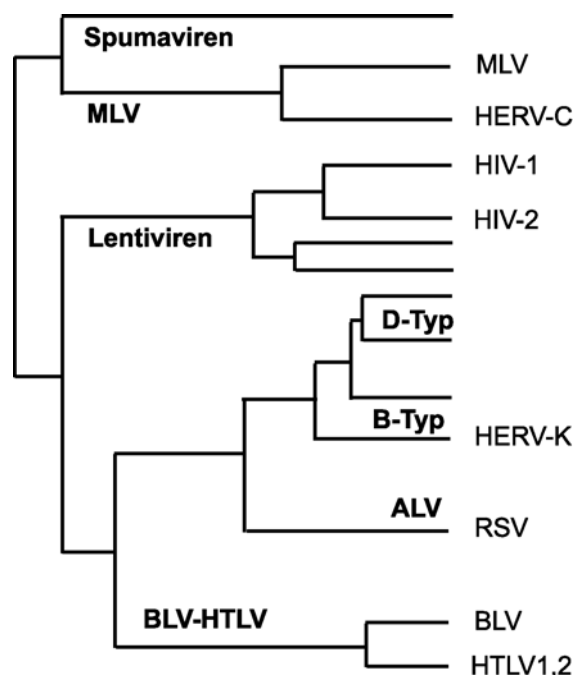


Abbildung 1.1: Schematischer Stammbaum einiger Retrovirus-Gruppen (fett gedruckt), basierend auf einem Aminosäuresequenz-Vergleich der RT-Sequenzen. Ausgewählte Vertreter der Gruppen sind angegeben. Abkürzungen: MLV murine leukemia virus; RSV Rous sarcoma virus; BLV Bovine leukemia virus; HTLV Human T-cell leukemia virus. Die Abstände in der Zeichnung stellen nicht den exakten Verwandtschaftsgrad dar. Nach (Fields and Knipe 1996).

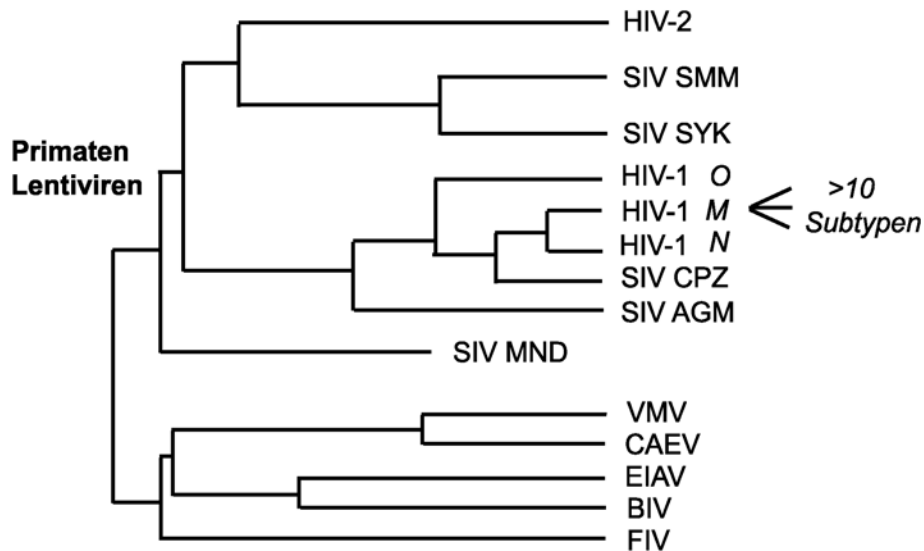


Abbildung 1.2: Schematischer Stammbaum von HIV-1 und den Lentiviren, basierend auf Vergleichen der Nukleotidsequenzen der *pol* Gene. Abkürzungen: SIV simian immunodeficiency virus; AGM african green monkey; CPZ chimpanzee; MND madrill; SMM sooty mangabey monkey; SYK sykes mokey; VMV visna-maedi virus; CAEV caprine-arthritis encephalitis virus; EIAV equine infectious anemia virus; BIV bovine immunodeficiency-like virus; FIV feline immunodeficiency virus. Die Abstände in der Zeichnung stellen nicht den exakten Verwandtschaftsgrad dar. Basierend auf (Fields and Knipe 1996). Aktualisiert nach (Barlow, Ajao et al. 2003).

Mit Hilfe der taxonomischen Daten und Untersuchungen von asservierten Blutproben oder anderem Material in den letzten 20 Jahren gelang es ein einigermaßen verlässliches Bild der Entstehung der weltweiten HIV-Pandemie zu zeichnen. Auch wenn durchaus andere Theorien postuliert wurden, geht man heute größtenteils von einem Ursprung von HIV in Ost- und/oder Zentralafrika aus. Eine dort seit langer Zeit bestehende Endemie unter Schimpansen (*Pan troglodytes*) mit SIV_{CPZ} konnte sich durch intensives Bejagen und Verzehr der Affen auf den Mensch ausbreiten und führte dadurch zu einem Wirtswechsel (Gao, Bailes et al. 1999; Sharp, Bailes et al. 1999). Etwa zeitgleich (d.h. etwa um 1940) vollzog sich in Westafrika dasselbe Szenario, nur dass dieses Mal Mangaben-Affen (*Cercocebus spec.*) eine Rolle spielten und daraus die HIV-2 Pandemie in Menschen resultierte (Lemey, Pybus et al. 2003).

Impfprogramme (wie z.B. gegen Polio) und andere Prozesse könnten bei der frühen Ausbreitung der Epidemie eine Rolle gespielt haben (Dittmann and Norley 2000), die dann schließlich durch die gesteigerte Mobilität Ende der 1970er Jahre fortgeführt und damit zur weltweiten Pandemie wurde.

1.3 HIV

1.3.1 Struktur des viralen Genoms und des Virions

Das typische Aufbauschema eines retroviralen Genoms ist: 5'-LTR-*gag-pol-env*-3'-LTR. Die LTR (long terminal repeat) -Regionen sind die Bereiche des viralen Genoms, die bei der Integration beidseitig mit der zellulären DNA verbunden werden und als Promotoren bzw. Terminatoren der Transkription dienen. Die *gag* und *env* Gene kodieren das Nukleokapsid und die Glykoproteine der Virushülle, das *pol* Gen kodiert für die Reverse Transkriptase (RT) und andere Enzyme. Das etwa 9,2 kB grosse HIV-1 RNA-Genom enthält noch sechs zusätzliche Gene: *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* und *nef*. *Nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* werden auch als akzessorische Gene bezeichnet, da sie für die Virusreplikation in vitro nicht unbedingt erforderlich sind (Frankel and Young 1998). In den letzten Jahren wurden Regulation und Funktion der akzessorischen Gene und der von ihnen kodierten Proteine besser charakterisiert (Freed 2001). HIV-1-Viruspartikel sind im Durchmesser etwa 100-120 nm groß (Fields and Knipe 1996) und von einer Lipoproteinhülle umgeben. In dieser Hülle eingebettet sind 72 etwa 10 nm große *env*-Glykoproteinkomplexe. Diese bestehen aus einem externen Anteil (gp120) und einem Transmembrananteil (gp41). Die Virushülle enthält außerdem verschiedene Proteine der Wirtszelle, z. B. HLA Klasse I- und II-Moleküle, die bei der Knospung des Virus in dessen Membran inkorporiert werden. Das p17-Matrixprotein ist an der Innenseite der Virushülle verankert. Das Kapsid aus p24-Protein ist von zylindrischer Gestalt und enthält zwei Kopien der HIV-RNA. Diese liegt ihrerseits als Protein-Nukleinsäurekomplex, gebunden an das Nukleoprotein p7 und die Reverse Transkriptase (RT) p66, vor. Außer der RT enthält das Viruspartikel auch andere Enzyme, die es für seine Vermehrung benötigt, die Integrase p31 und die Protease p11. Abbildung 1.3 zeigt das Virion sowie den Aufbau des viralen Genoms schematisch (basierend auf (Freed 2001)).

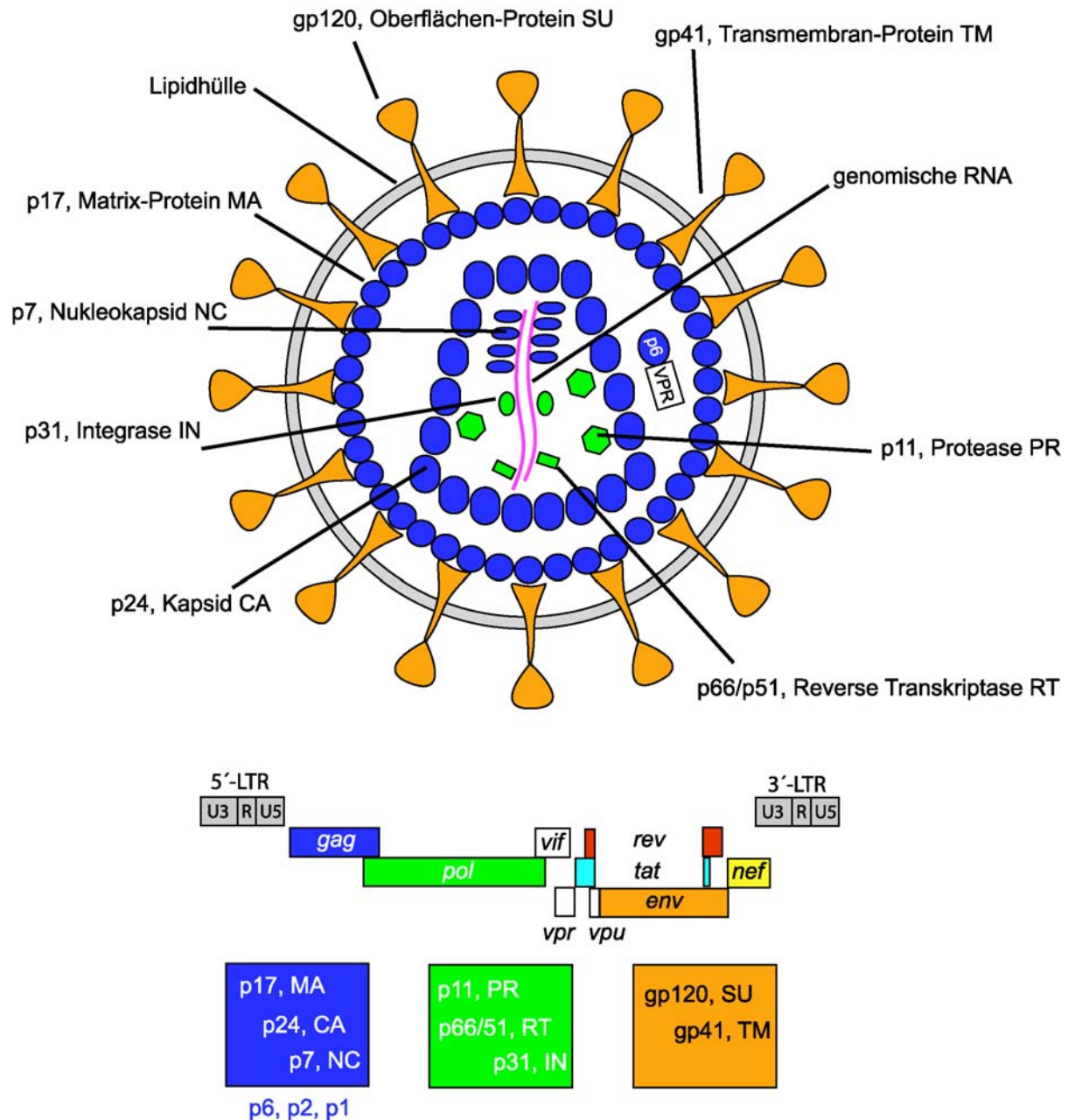


Abbildung 1.3: Struktur des Virions und des viralen Genoms von HIV-1. Die Farbgebung der Gene und Genprodukte in der Genomübersicht (unten) entspricht der der entsprechenden Genprodukte im Virion (oben). Darstellung nicht maßstabsgetreu. (Anmerkung: der Autor entschuldigt sich beim aufmerksamen Leser für nicht dem derzeitigen Wissensstand entsprechende Details in Abbildungen dieser Arbeit. Für den speziellen Fall dieser Abbildung wäre folgendes hervorzuheben: Die hier gezeigte direkte Interaktion von gp41 und p17 ist bisher nicht eindeutig bewiesen, wogegen eine hier nicht gezeigte Interaktion von trimerem p17 mit der Lipidhülle als gesichert angesehen wird (Freed 2001).)

Tat und **Rev** sind regulatorische Proteine, die im Zellkern akkumulieren und an bestimmte Stellen der viralen RNA binden (Freed 2001). Tat stimuliert die Transkription von HIV-DNA in RNA und fördert deren Elongation. Rev vermittelt den Transport von HIV-RNA vom Zellkern ins Zytoplasma und spielt eine Rolle bei Translationsereignissen. Rev ist wichtig für die Umstellung der Expression von frühen regulatorischen Proteinen auf die später synthetisierten Strukturproteine (Frankel and Young 1998). Auf die beiden wichtigen viralen Genprodukte Tat und Rev wird unter 1.3.3 noch näher eingegangen.

Nef wird als regulatorisches Protein früh während des Replikationszyklus produziert und sorgt für eine Verminderung von CD4 auf der Zelloberfläche (Aiken, Konner et al. 1994) und von HLA-Klasse I-Antigenen (Collins, Chen et al. 1998) an der Oberfläche infizierter Zellen (Kasper and Collins 2002). Dadurch ist die virusproduzierende Zelle weitgehend vor dem Angriff zytotoxischer T-Zellen geschützt, die HIV-Peptide in Kontext mit HLA-Klasse I-Antigenen präsentiert bekommen müssen. Nef beeinflusst die Aktivierung von T-Zellen, indem es mit verschiedenen zellulären Faktoren interagiert. Ein intaktes *nef* Gen ist für eine hohe Virusreplikation *in vivo* und die Progression der Erkrankung entscheidend (Piguet and Trono 1999).

Vpr stimuliert sowohl die HIV-LTR als auch eine Reihe von zellulären und viralen Promotoren und ist für die Virusreplikation in sich nicht teilenden Zellen wie z. B. Makrophagen von Bedeutung (Sherman, De Noronha et al. 2003). Vpr ist für den Transport des viralen Präintegrationskomplexes zum Kern von Bedeutung und kann Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus arretieren.

Vpu spielt scheinbar eine Rolle bei der Knospung, da bei Mutationen in *vpu* die Viren an der Zelloberfläche verbleiben (Levesque, Zhao et al. 2003).

Vif spielt eine Rolle beim intrazellulären Transport von viralen Bestandteilen (Lake, Carr et al. 2003). Vif-defiziente Viren neigen außerdem in einigen Zelltypen zu Hypermutationen in ihrem Genom, die zur Ansammlung von mehrfachen Defekten in viralen Proteinen führen (Lecossier, Bouchonnet et al. 2003). Vif scheint weiterhin einen Einfluss auf die Morphogenese der Virionen zu haben und kann offenbar die Aktivität zellulärer antiviraler Faktoren unterdrücken (Sheehy, Gaddis et al. 2002).

1.3.2 Die HIV-Infektion und der HIV-Lebenszyklus

HI-Viren kommen in produktiv infizierten Individuen vor allem im Blut, Samen- und Vaginalflüssigkeit vor. Hauptinfektionsquelle für HIV sind daher Blut und Blutprodukte. Eine Infektion geschieht in der Regel durch homo- oder heterosexuelle Sexualkontakte, sowie durch kontaminierte Injektionsnadeln oder medizinische Instrumente. In den 80er Jahren, sowie heute noch in vielen Entwicklungsländern, spielt kontaminiertes Blut durchaus eine Rolle bei Ansteckungen durch medizinische Behandlungen. In der westlichen Welt dürften heute in der Medizin kontaminiertes Blut oder Blutprodukte (Immunglobuline, Gerinnungspräparate) keine Gefahr für eine Ansteckung mehr darstellen, wohl aber noch verseuchte Spritzen und Nadeln bei Drogenmißbrauch (Modrow 2003). Hat das Virus auf die eine oder andere Art einmal in ausreichender Zahl den Zutritt zum hämatogenen oder lymphogenen System eines neuen Wirts gefunden, werden als Zielzellen T-Lymphozyten über einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus infiziert. Dieser Mechanismus ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Als notwendiger Rezeptor von HIV-1, HIV-2 und SIV wurde bereits 1984 CD4 erkannt (Dalgleish, Beverley et al. 1984). HIV-1 und HIV-2 können teilweise auch verschiedene Zelltypen wie z.B. Fibroblasten und Astrozyten CD4-unabhängig infizieren (Harouse, Kunsch et al. 1989);(Kozlowski, Sandler et al. 1991);(Kunsch, Hartle et al. 1989 a). Früh wurde auch die Existenz von Korezeptoren für den Eintritt von HIV in seine Zielzelle vermutet. Als Korezeptoren wurden CCR5 (M-trope Viren) und CXCR4 (T-trope Viren) identifiziert (Huang, Paxton et al. 1996);(Alkhatib, Combadiere et al. 1996);(Deng, Liu et al. 1996). Dass Korezeptoren für eine erfolgreiche HIV-Infektion notwendig sind, wird auch dadurch deutlich, dass Individuen mit einem genetischen Defekt des CCR5 gegenüber AIDS weitgehend resistent sind (Biti, Ffrench et al. 1997). In vitro zeigen sich Lymphozyten dieser Individuen resistent gegenüber einer Infektion mit M-tropen, nicht aber T-tropen Viren.

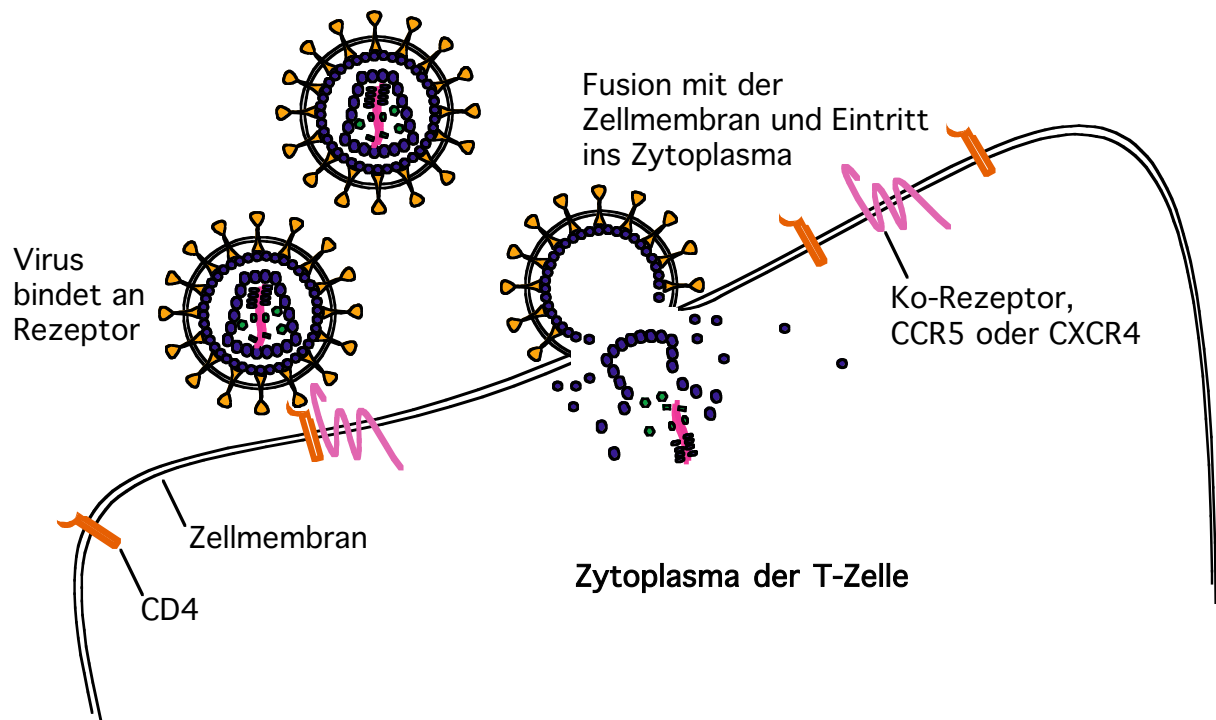


Abbildung 1.4: Eindringen von HI-Viren über CD4 und Korezeptoren in eine Zielzelle. Struktur- und Farbgebung des Virions in dieser Abbildung sinngemäß Abbildung 1.3.

Nach der Membranfusion liegt der Viruskern im Zytoplasma der CD4⁺ T-Zelle vor und es bildet sich der sogenannte RT-Komplex. Jetzt erfolgt die Umwandlung des RNA-Genoms in die provirale DNA mittels der reversen Transkription und zellulären tRNA-Primern (Darlix, Vincent et al. 1993). Nach der reversen Transkription der viralen RNA liegt das HIV-Genom als provirale, nicht-integrierte HIV-DNA vor. Als nächster essentieller Schritt wird der sogenannte Präintegrations-Komplex in den Kern der Zelle transportiert (von Schwedler, Kornbluth et al. 1994), was durch die Nutzung zytoskelettärer Strukturen zu geschehen scheint (McDonald, Vodicka et al. 2002). Weitgehend ungeklärt ist, welche virale Bestandteile dieser relativ große Komplex genau enthält und wie er die Kernporen überwindet (HIV ist nicht wie andere Retroviren auf den Zusammenbruch der Kernmembran während der Zellteilung angewiesen, sondern kann auch in ruhenden Zellen im Genom integrieren). Unter anderem scheinen die viralen Proteine Vpr und p17 bei diesen Vorgängen eine Rolle zu spielen. Der Vorgang ist in Abbildung 1.5 gezeigt. Eine Aktivierung der CD4⁺ T-Zelle ermöglicht die Integration der proviralen DNA mit Hilfe der viralen Integrase,

was die Voraussetzung für die Synthese neuer Virionen ist (Zack 1995). Eine derartige Aktivierung kann *in vitro* auch nach Stimulation mit Antigenen, Mitogenen oder anderen Substanzen beobachtet werden. *In vivo* kann es zu einer Aktivierung des Immunsystems nach Antigenkontakt oder im Rahmen einer opportunistischen Infektion kommen. Neben ruhenden CD4⁺ T-Zellen, die latent infiziert sind und nicht-integrierte HIV-DNA enthalten, stellen Makrophagen und Zellen des ZNS wichtige langlebige Virusreservoirs dar (Chun, Davey et al. 2000). Ist das Provirus einmal im Wirtsgenom integriert, binden zelluläre Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF-κB an die HIV-LTR Region und initiieren somit die Transkription der viralen mRNAs. Die mRNAs werden durch zelluläre Prozesse mehrfach gespleißt und zur Translation ins Zytoplasma transportiert. Diese frühen mRNAs erlauben die Synthese von regulatorischen HIV-Proteinen wie z. B. Tat oder Rev. Tat wiederum bindet an das TAR (transactivation response element) in der LTR und ermöglicht dadurch eine effektive Transkriptionselongation. Rev aktiviert schließlich die Expression der strukturellen und enzymatischen Gene und inhibiert gleichzeitig die Produktion regulatorischer Proteine, indem es virale mRNAs ungespleißt oder nur unvollständig gespleißt ins Zytoplasma transportiert. Dieses Umschalten von früher zu später Phase im Lebenszyklus ermöglicht erst die Ausbildung viraler Partikel.

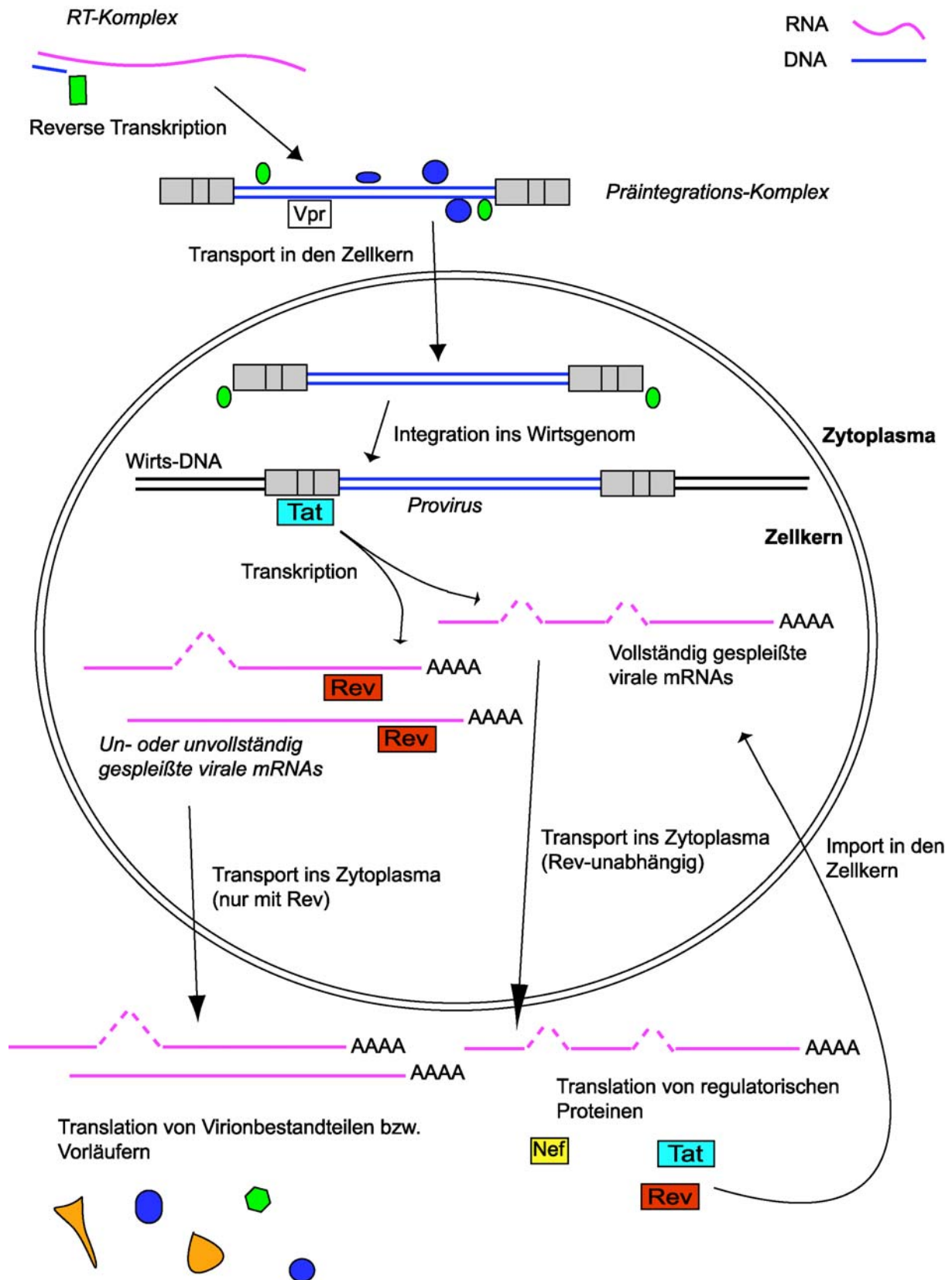


Abbildung 1.5: Vorgänge im viralen Lebenszyklus vom Eintritt des Präintegrationskomplexes bis zur Integration des Provirus und zur Expression von regulatorischen Proteinen und Strukturproteinen. Farbgebung wie in Abbildung 1.3.

Die Bildung neuer Viruspartikel erfolgt in mehreren Schritten. Die HIV Gag-Proteine stammen von einem 53 kD Vorläufer ab, von dem nach Spaltung durch die HIV-Protease p24, p17, p7 und p6 Gag-Proteine entstehen (und die Peptide p2 und p1). Die Interaktion zwischen den NC-Proteinen und der viralen genomischen RNA mit dem Verpackungssignal führt zur Assoziation von zwei viralen genomischen RNA-Molekülen mit Gag-Proteinen und Pol-Proteinen und somit zur Bildung neuer Viruskerne an der Zellmembran. Außerdem werden in den Viruskern auch die RT- und IN-Enzyme inkorporiert. Die *env* Genprodukte bilden die gp120 Proteine der Virushülle. Diese Proteine der Virushülle werden als gp160-Vorläuferproteine synthetisiert und müssen von einer zellulären Protease in gp120 und gp41 gespalten werden. Dies ist die Voraussetzung für die Knospung infektiöser Partikel aus der Zelle. Der letzte Schritt des Zusammenbaus und der Freisetzung der neugebildeten Virionen erfolgt an der Zellmembran. Durch Knospung werden die neuen Virionen freigesetzt. Die Viruspartikel durchlaufen weitere Reifungsstadien, in denen Proteinspaltung, Konformationsänderungen und eine Reorganisation der viralen Proteine im Viruskern erfolgen, bis sie als reife, infektiöse Viren vorliegen. Dieser Vorgang ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

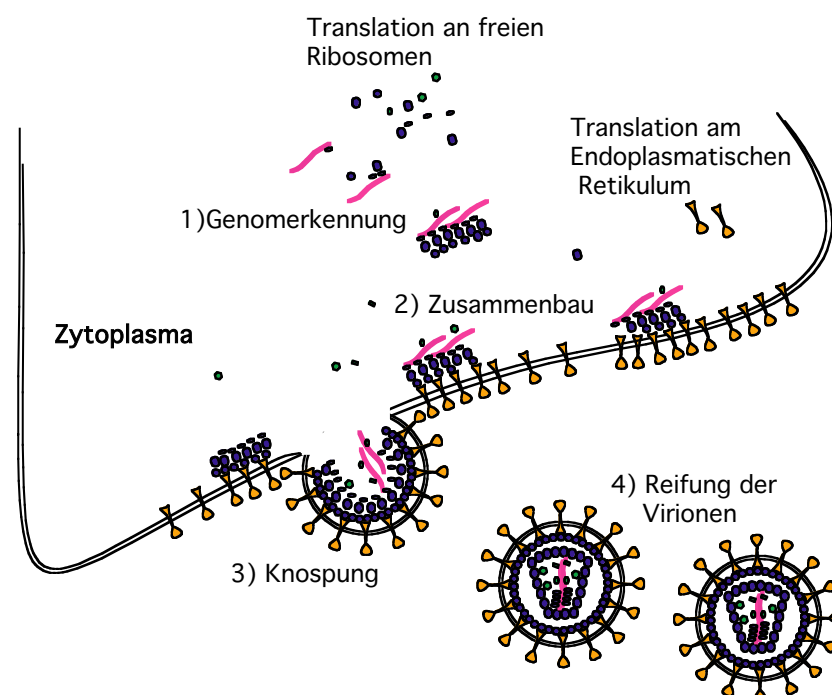


Abbildung 1.6: Knospung von Viruspartikeln aus einer infizierten Zelle.

Während all diese Prozesse stetig in einem infizierten Individuum ablaufen, durchlebt der betroffene Organismus verschiedene Phasen. Die Primärinfektion verläuft häufig inapparent und nur ein Teil der Infizierten entwickelt ein Krankheitsbild, das einer infektiösen Mononukleose ähnelt. Viruspartikel im peripheren Blut sind in dieser Phase praktisch nicht nachzuweisen, wohl aber virusspezifische Antikörper und RNA. Außerdem kann meist ein temporärer Rückgang der CD4⁺ T-Zellen auf unter 500 pro μ l beobachtet werden. Dieses, manchmal jahrelange, symptomfreie Latenzstadium stellt die besondere Heimtücke des HIV dar. Der Träger bemerkt seine, vom Immunsystem und viralen Mechanismen, unterdrückte Infektion häufig nicht und kann über einen langen Zeitraum als Überträger dienen. Auch das sich anschließende Lymphadenopathische Syndrom (LAS) oder der sogenannte AIDS-related complex (ARC) stellen noch relativ geringe Beeinträchtigungen des Gesundheitszustandes dar und können Monate bis Jahre andauern. Das Vollbild AIDS entwickelt sich schließlich einhergehend mit dem weiteren starken Absinken der CD4⁺ Zellen (unter 200 pro μ l), mit zunehmenden Infektionen mit opportunistischen Erregern, der Bildung von Kanzerosen (Lymphome, Kaposi-Sarkome) und später u.a. schweren neurologischen Symptomen (AIDS-Demenz) (Modrow 1997). Der Organismus unterliegt in der Regel dann einer Infektion, der er nichts mehr entgegen setzen kann. Der Infektionszyklus schließt sich, wenn eine geeignete Zahl der bis zu 10^9 pro Tag produzierten Viruspartikel es schafft, irgendwann im Laufe dieser Zeit einen neuen Wirt zu infizieren (Ho, Neumann et al. 1995).

1.3.3 Die regulatorischen HIV-1 Proteine Tat und Rev

Tat (Transactivator of transcription) und LTR (long terminal repeat)

Tat wird, genau wie Rev, von zwei Exons kodiert und weist in seiner kompletten Form 101 AS auf. Es existieren aber auch andere Formen mit 72 bzw. 83 AS.

Tat ist ein atypischer Aktivator der viralen Transkription, da es um seine Funktion auszuüben nicht an DNA, sondern an bereits in Transkription befindlicher RNA bindet (Berkhout, Silverman et al. 1989), dort speziell an die so genannte TAR (Transactivation response element). Die TAR befindet sich in der R-Region der 5'-LTR und ist etwa 60 Nukleotide groß. In der Abwesenheit von Tat wird die Basisaktivität der 5'-LTR als Promotor stark von der Chromatin-Umgebung des Integrationsorts und zellulären Faktoren die an die LTR binden, beeinflusst.

Der wahrscheinlichste Mechanismus zur Steigerung der Zahl an viralen Transkripten durch Tat ist die Erhöhung der Effektivität des Transkriptionsprozesses durch die RNA-Polymerase II (RNA-Pol II). Tat führt nach Bindung an die TAR durch Rekrutierung von zellulären Faktoren indirekt dazu, dass die RNA-Pol II phosphoryliert wird und dadurch eine effiziente Transkriptionselongation unterstützt. Hierbei spielen Cyclin T und die Kinase Cdk9 eine entscheidende Rolle (Wei, Garber et al. 1998). In der Abwesenheit von Tat überwiegt die unphosphorylierte Form der RNA-Pol II, was in der Regel zu einem frühen Abbruch der Transkription führt (Freed 2001). Es wird allerdings auch diskutiert, ob die Effizienz der LTR im Anziehen von negativen Transkriptionselongations Faktoren (N-TEFs) eine Rolle dabei spielt, dass in Abwesenheit von Tat die transkriptionelle Aktivität der LTR gering ist (Greene and Peterlin 2002).

Einerseits ist die Basisaktivität der 5'-LTR ohne Tat in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich hoch, was sich aus der Vielzahl an Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren in Bereich der LTR begründet (Yang, Morris et al. 1997 b). Andererseits variiert die LTR-abhängige Basisaktivität auch abhängig vom chromosomalen Integrationsort von 0-75 fach (Jordan, Defechereux et al. 2001) und scheint beispielsweise durch die Nähe zu „matrix attachment regions“ (MARs) Tat-unabhängig gesteigert zu werden (Rampalli, Kulkarni et al. 2003). Der Acetylierungsstatus von Histonen am Integrationsort und von Proteinen des Transkriptionsapparats spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkriptionsaktivität und kann von Tat durch die Rekrutierung von Histon

Acetyltransferasen beeinflusst werden (eine Übersicht gibt (van Lint 2000)). Auf jeden Fall ist für eine produktive Replikation von HIV Tat unbedingt notwendig, da sonst nicht genug virale mRNA bzw. virale genomische RNA transkribiert wird (Dingwall, Ernberg et al. 1989).

Auf die vielfältigen weiteren Funktionen von Tat während einer HIV-Infektion im Organismus kann hier nicht eingegangen werden. Es scheint u.a. eine große Rolle in immunmodulierenden Prozessen zu spielen, da exogenes Tat effizient Makrophagen, Astrozyten und Mikroglia zu aktivieren vermag (New, Ma et al. 1997);(Bruce-Keller, Barger et al. 2001; Nicolini, Ajmone-Cat et al. 2001) und auch in der Pathogenese des HIV-assoziierten Kaposi-Sarkoms eine Rolle zu spielen scheint (Pati, Foulke et al. 2003).

Rev (Regulator of expression of virion proteins)

HIV-1 Rev wird, ebenso wie Tat, von zwei Exons kodiert, besteht aus 116 Aminosäuren, weist ein Molekulargewicht von etwa 13 kD auf (Perkins, Cochrane et al. 1989) und liegt *in vivo* phosphoryliert vor (zusammengefasst in (Kjems and Askjaer 2000)). Es enthält in der Kürze seiner AS-Sequenz eine Reihe von, teilweise überlappenden, funktionellen Domänen.

Hauptfunktion von Rev ist die Vermittlung des Transports von viralen un- oder inkomplett gespleißten mRNAs ins Zytoplasma um die virale Genexpression von frühen regulatorischen Proteinen auf späte Proteine, die Bestandteile des Virions sind, umzustellen. Die Translation von ungespleißten mRNAs ist in eukaryotischen Zellen normalerweise nicht vorgesehen, was die Aktivität bzw. die Anwesenheit von Rev in infizierten Zellen für eine Virusreplikation zwingend notwendig macht. Rev wechselt innerhalb seines zellulären Aktivitäts-Zyklus ständig mehr oder weniger schnell vom Zellkern in das Zytoplasma und zurück, wobei regelmäßig auch eine Assoziation mit den Nukleoli im Zellkern stattfindet. Rev wird daher als Nukleozytoplasmatisches Shuttle-Protein bezeichnet. Aus den kinetischen Eigenschaften dieser Abläufe ergibt sich die dominante Lokalisation von Rev in eukaryotischen Zellen, die sich in der Regel als zu 80% im Kern und in den Nukleoli darstellt.

Um seine Funktion zu erfüllen, besitzt Rev im Wesentlichen drei funktionelle Bereiche.

- I) Die NLS/NOS (Hope, McDonald et al. 1990) im N-terminalen Bereich, die für den Transport des Proteins in den Zellkern und für die Bindung an die virale RNA zuständig ist (siehe dazu auch Abbildung 1.8).
- II) Die NES, die für den Export des Rev-RNA Komplexes ins Zytoplasma sorgt (Malim, Bohnlein et al. 1989);(Mermer, Felber et al. 1990).
- III) eine Multimerisierungsdomäne, die die NLS/NOS flankiert und für eine Multimerisierung von Rev an der RNA zuständig ist (Malim, Tiley et al. 1990);(Thomas, Oft et al. 1998)

Unklar ist, inwieweit die Phosphorylierung von Rev *in vivo* für die Funktion notwendig ist. Einige Untersuchungen legen nahe, dass *in vitro* die Affinität von Rev zur RNA durch Phosphorylierung gesteigert wird, jedoch scheint dieser Effekt *in vivo* nicht von großer Relevanz zu sein (Fouts, True et al. 1997).

Für einige andere Bereiche von Rev sind noch zusätzliche Funktionen postuliert worden, die aber zum Teil durch die Dominanz der Hauptdomänen nicht eindeutig charakterisiert werden konnten. Kontroverse Diskussionen werden daher geführt wenn es um Anwesenheit und Funktionsweise von Domänen außerhalb der NLS/NOS und NES geht. Dies trifft beispielsweise für einen Bereich am N-Terminus zu, der auch NIS genannt wird, und der für eine Reduktion der Diffusion des (relativ kleinen) Rev Proteins in der Zelle zuständig sein soll (Kubota and Pomerantz 2000). Eine Deletions-Mutante dieser NIS (Revd23) wurde als transdominant negativer Inhibitor der Rev-Funktion beschrieben. Des Weiteren wurden bisher *in vivo* und *in vitro* nur wenige Hinweise für die funktionelle Notwendigkeit des extremen C-Terminus (ab AS 86) von Rev gefunden. Einerseits wurde festgestellt, dass für eine 100%ige Transaktivierung und Oligomerisierung eine gewisse Zahl an AS C-terminal der NES benötigt werden (Hakata, Yamada et al. 2002), andererseits waren Deletionsmutanten ab AS 92 experimentell nicht von wtRev zu unterscheiden (Lam, 1998). Desweiteren wird die Bedeutung einzelner Aminosäuren der Multimerisierungsdomänen von Rev kontrovers diskutiert (Brice, Kelley et al. 1999). Eine grafische Übersicht über die Domänen gibt Abbildung 1.7.

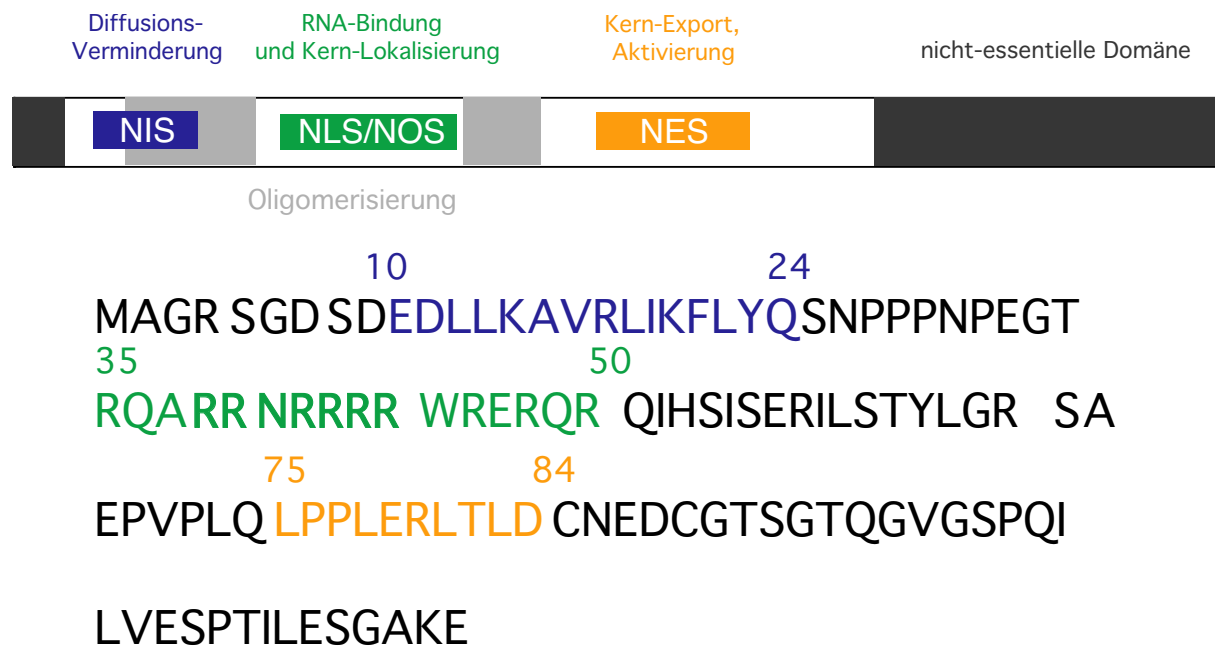


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von Rev und seiner Aminosäuresequenz. Die Farbgebung der Sequenz (mit wichtigen Aminosäurepositionen) entspricht der in der Schemazeichnung. Fett gedruckte Aminosäuren in der grünen NLS/NOS Sequenz bezeichnen den Kern des Arginin-reichen Motifs (ARM). Die Schwarz gezeichneten Bereiche stellen Abschnitte dar die allgemein als für die Funktion nicht essentiell angesehen werden. Die Nummerierung der Aminosäuresequenz bezieht sich auf (Kjems and Askjaer 2000). (Darstellung der funktionellen Domänen nicht maßstabsgetreu.)

Die Hauptfunktion von Rev, der Export der viralen mRNA aus dem Kern benötigt die Interaktion mit einer Vielzahl von zellulären Komponenten und Strukturen der Zelle. Das ribosomale Protein L5, Teil des 5s rRNA-Export-Systems, scheint ebenso an diesem Prozess beteiligt zu sein, wie Komponenten des Kernporenkomplexes (Zolotukhin and Felber 1999) und Aktinfilamente (Hofmann, Reichart et al. 2001). Weiter erhöht das Kinesin-ähnliche Protein REBP die RNA-Export Aktivität von Rev durch Bindung an dessen NES (Venkatesh, Gettemeier et al. 2003). Die Sam68-ähnlichen Proteine SLM-1 und 2 (Reddy, Suhasini et al. 2002), das 68kDa-Src-assoziierte Protein der Mitose (Sam68) (Murata, Yoshino et al. 2002), die RNA-Helikase A (RHA) (Li, Tang et al. 1999) und Tap (Reddy, Xu et al. 1999) spielen im Funktionszyklus von Rev offenbar ebenso eine wichtige Rolle.

Der Shuttle-Prozess von Rev, d.h. der Wechsel vom Zytoplasma in den Zellkern und zurück, geht etwa wie folgt vor sich: Rev bindet im Bereich seiner NLS/NOS an sein Zielelement, die RRE auf viraler RNA (Olsen, Cochrane et al. 1990);(Olsen, Beidas et al. 1991), was wahrscheinlich im engen zeitlichen Zusammenhang mit den

Transkriptionsprozessen steht, und multimerisiert dort mit anderen Rev-Molekülen (Jain and Belasco 2001). Dieser RNA-Protein Komplex wandert dann über bisher ungeklärte Wege zu den Kernporen (Cmarko, Boe et al. 2002) wo er über die Leucinreiche NES von Rev an Crml (Exportin) bindet (Fornerod, Ohno et al. 1997). Dieser Komplex wiederum interagiert u.a. mit Komponenten des Kernporen-Komplexes und RanGTP, einer zellulären GTPase, die die notwendige Energie für den folgenden Exportvorgang des Komplexes liefert. Das Ungleichgewicht von RanGTP (hohe Konzentration im Kern, niedrige Konzentration im Zytoplasma) und RanGDP (umgekehrte Verhältnisse wie bei RanGTP) wird von RanBP1 und 2 und anderen Faktoren Aufrecht erhalten (Kehlenbach, Dickmanns et al. 1998) und ist essentiell für diese Art von Transportvorgängen. Die Substanzen Leptomycin B (Fornerod, Ohno et al. 1997), sowie PKF050-638 (Daelemans, Afonina et al. 2002), binden irreversibel an Cystein 529 in Crml und verhindern so dessen Export, sowie den seiner Fracht Rev. Valtrate, eine Verbindung aus Baldrian-Wurzel (*Valerianae radix*), inhibiert den Export von Rev und damit die p24-Bildung ebenfalls durch irreversible Bindung an Crml (Murakami, Ye et al. 2002).

Im Zytoplasma dissoziiert der Export-Komplex unter Hydrolyse von GTP zu GDP (Pollard and Malim 1998) und Crml wird in den Kern reimportiert. Der Rev-RNA Komplex dissoziiert im Zytoplasma, wodurch die Arginin-reiche Domäne von Rev (NLS/NOS) wieder zugänglich wird. Bevor Importin β an die NLS/NOS von Rev bindet (Henderson and Percipalle 1997), was über Interaktionen mit dem Kernporenkomplex den Import von Rev in den Kern vermittelt, beeinflusst Rev im Zytoplasma die Translation von der eben transportierten RNA positiv (D'Agostino, Felber et al. 1992);(Arrigo and Chen 1992 a). Nach dem Importin β -vermittelten Transport von Rev in den Zellkern, geschieht die Freisetzung von Rev über die Interaktion von RanGTP mit Importin β und der Kreislauf beginnt von neuem (Izaurralde, Kutay et al. 1997). Eine schematische Übersicht dieser Vorgänge ist in Abbildung 1.8 gezeigt.

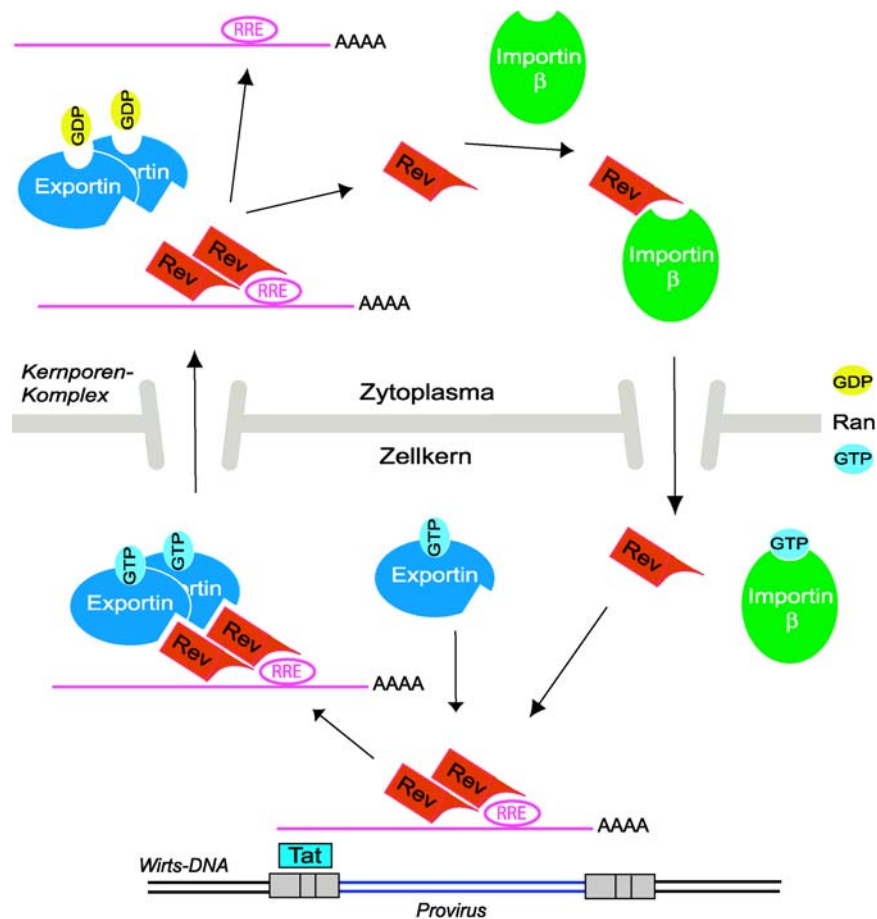


Abbildung 1.8: Stark vereinfachte Schemazeichnung des Shuttlingprozesses von Rev. Ganz unten: Rev bindet über die RRE an frisch transkribierte virale RNA und rekrutiert als Oligomer mehrere Exportin (Crml) Proteine. Es erfolgt der Transport durch die Kernporen, wobei sowohl Rev als auch Exportin mit Komponenten des Kernporenkomplexes interagieren. Rev beeinflusst im Zytoplasma positiv die Translationsereignisse von der RNA bevor der RNA-Protein Komplex endgültig dissoziiert. Freie Rev Moleküle werden von Importin β gebunden und wieder in den Kern transportiert. Das Ungleichgewicht von RanGTP und RanGDP in Zellkern und Zytoplasma (ganz rechts angedeutet) ist eine wesentliche Voraussetzung, dass diese Vorgänge korrekt ablaufen können. Eine Vielzahl bekannter Interaktionspartner und Mechanismen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Basierend auf (Pollard and Malim 1998).

Als wichtige transdominant negativ wirkende Mutante von Rev, die in diese Vorgänge einzugreifen scheint, wurde RevM10 beschrieben (Malim, Bohnlein et al. 1989; Stauber, Gaitanaris et al. 1995), das eine mutierte NES trägt (siehe Übersicht im Ergebnisteil). RevM10 oder RevM10bl, das vergleichbar wirkt, stellen heute einen wichtigen Standard zur Überprüfung der Wirksamkeit transdominant negativer Faktoren oder Mutanten dar. Desweiteren existieren transdominant negative Deletionsmutanten von Sam68, die in der Lage sind, dem Rev-vermittelten Export von mRNA entgegenzuwirken (Soros, Carvajal et al. 2001).

Auch abseits direkter Import- und Export-Vorgänge interagiert Rev mit einer Vielzahl von zellulären Faktoren, wie z.B. B23 (Fankhauser, Izaurralde et al. 1991) und wahrscheinlich eIF5a (Ruhl, Himmelpach et al. 1993);(Katahira, Ishizaki et al. 1995), und moduliert so seine zelluläre Umgebung, bzw. wird selbst beeinflusst.

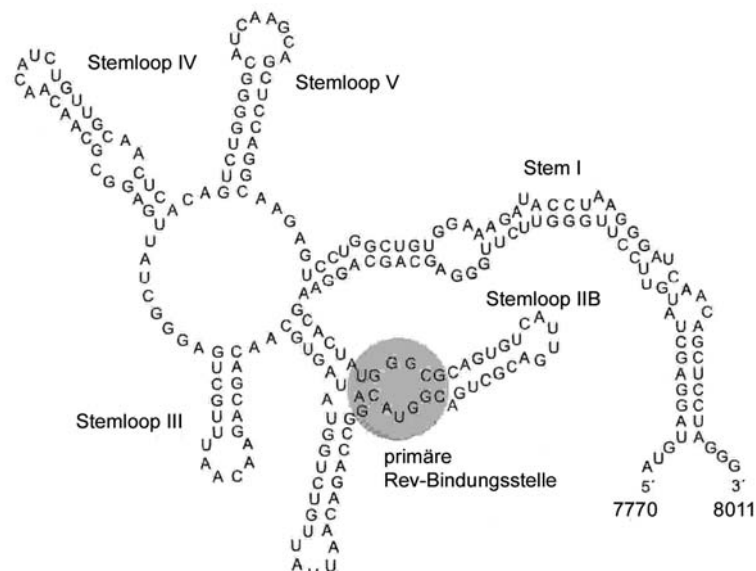


Abbildung 1.9: Sequenz und Struktur der RRE. Die primäre Bindungsstelle für Rev liegt im Stemloop IIB und ist grau hervorgehoben. Der Stemloop IIB (Position 45-75) ist ausreichend für eine Bindung von Rev, eine weitere Multimerisierung von Rev an der RRE benötigt auch die anderen Bereiche. Abbildung aus (Modrow 2003).

Rev werden über die beschriebenen Funktionen hinaus noch eine Reihe weiterer, für die Virusreplikation wichtiger, Eigenschaften zugeschrieben auf die hier ebenfalls nicht näher eingegangen werden kann. Dazu gehört unter anderem auch die Beeinflussung der Translation viraler Proteine (D'Agostino, Felber et al. 1992; Arrigo and Chen 1992 a; Katahira, Ishizaki et al. 1995).

Außerdem scheint Rev ein kritischer Faktor zu sein, wenn es darum geht dem Virus die Möglichkeit zur Latenz zu geben. Es wurden gezeigt, dass die Bildung von Rev Mutanten zu einer verminderten Produktivität der Replikation führte, die wiederum die Ausbildung von Virusreservoirs begünstigt (Bobbitt, Addo et al. 2003).

1.4 HIV-1 Rev in Astrozyten

Obwohl HIV das Gehirn und speziell dort auch Astrozyten infizieren kann, und dort teilweise schon Wochen nach der Infektion virale DNA nachgewiesen werden kann, ist die Virusreplikation im Zentralen Nervensystem (ZNS) nicht sehr stark ausgeprägt. Die HIV Virusproduktion im Gehirn findet zwar vor allem in Mikroglia (und Makrophagen) statt, jedoch lassen sich auch in Astrozyten HIV-mRNAs und provirale DNA, sowie frühe virale Genprodukte nachweisen (Ranki, Lagerstedt et al. 1994; Bagasra, Lavi et al. 1996). Astrozyten können desweiteren durch eine HIV-1 Infektion aktiviert und auch in die Apoptose gezwungen werden, was zur Schädigung des Nervensystems durch die Infektion beiträgt (Sabri, Titanji et al. 2003).

Schon 1987 konnten verschiedene Astrozytom Zelllinien (U138MG, U-373MG) mit dem HIV Isolat IIIB infiziert werden, worauf sich aber keine viralen Strukturproteine nachweisen ließen. Nach einer Kokultivierung der Zellen mit empfänglichen Zellen des Lymphsystems zeigten die Empfängerzellen aber die Zeichen einer produktiven Virusinfektion (Chiodi, Fuerstenberg et al. 1987). Das Fehlen von viralen Strukturproteinen der *gag* und *env* Gene in Astrozyten deutet darauf hin, dass der virale Lebenszyklus in diesem Zelltyp in einem frühen Stadium steckenbleibt und damit nur unbedeutende Mengen an Viruspartikeln hergestellt werden.

In weiteren Versuchen wurde für verschiedene Gliazelllinien ebenfalls beschrieben, dass nach erfolgter Infektion bzw. Transfektion viraler DNA die p24-Produktion niedrig war und eine geringe RT-Aktivität festzustellen war. Die chronisch infizierte Astrozytom Zelllinie TH4-7-5 (Brack-Werner, Kleinschmidt et al. 1992) zeigte eine geringe Menge an ungespleißten oder einfach gespleißten Transkripten im Northern-Blot und damit ein Muster das dem eines Rev-defekten molekularen HIV-Klons (pHXB2 fb) in HeLa Zellen glich. Auch durch Stimulation mit chemischen Agenzien konnten die Zellen nicht zur vermehrten Strukturprotein- und Viruspartikel-Produktion angeregt werden.

Diese Eigenart von Astrozyten scheint durch eine zelluläre Blockade der Rev-Funktion bedingt zu sein, da Rev gerade der virale Faktor ist, der das Umschalten vom frühen zum späten Lebenszyklus auslöst (Neumann, Felber et al. 1995). Im Gegensatz zu Rev-permissiven Zellen ist die transaktivierende Funktion von Rev in Astrozyten gestört, ebenso wie die zelluläre Lokalisation von Rev. Während sich in Rev-permissiven Zellen das Protein zu über 80 % im Zellkern und den Nukleoli

befindet, so liegt es in Astrozyten bis zu 70 % zytoplasmatisch vor. Die Fähigkeit von Rev die Genexpression von p24 in Assay-Systemen zu aktivieren, betrug in Astrozytom-Zelllinien nur etwa 10 % der Aktivität die es in permissiven Kontrollzellen aufwies (Ludwig, Silberstein et al. 1999). Es konnten außerdem eine Vielzahl von möglichen zellulären Ursachen der Rev-Funktionsminderung bereits ausgeschlossen werden, ebenso wie die Möglichkeit einer eingeschränkten Tat-Funktion in Astrozyten (van Empel 2000).

Es wurde weiter gezeigt, dass die Eigenschaft Rev vom Import in den Zellkern zu hindern von Astrozyten auf Rev-permissive Zellen wie HeLa Zellen übertragbar ist (Neumann, Afonina et al. 2001).

Da die Biologie von Rev (ständiges Wechseln vom Zytoplasma in den Kern und zurück) eine Korrelation des veränderten Lokalisations- und des Transaktivierungsverhaltens nahelegen, könnte auch ein potentiell übertragbarer, dominant negativer Faktor im Zytoplasma von Astrozyten vorhanden sein.

Abgesehen von dieser Theorie der eingeschränkten Rev-Funktion in Astrozyten werden aber noch andere Mechanismen diskutiert.

Gorry und Mitarbeiter beobachteten keine Einschränkung der Rev-abhängigen Transaktivierung der Genexpression in U251 Astrozytom Zellen, postulieren dagegen eine eingeschränkte Translationsaktivität, die die verminderte Gag-Synthese erklären soll (Gorry, Purcell et al. 1998; Gorry, Howard et al. 1999).

Auch für die generell eingeschränkte Replikationsfähigkeit des Virus in Astrozyten gibt es weitere Theorien, bzw. zusätzlich Erklärungsversuche. Eine unvollkommene Prozessierung viraler Proteine durch zelluläre Faktoren (Shahabuddin, Volsky et al. 1992; Shahabuddin, Bentsman et al. 1996), sowie eine generell reduzierte transkriptionale Aktivität (Niikura, Dornadula et al. 1996) werden als mögliche Gründe dafür diskutiert.

Ein multikausaler Mechanismus für die verminderte Virusreplikation und möglicherweise auch für die eingeschränkte Rev-Funktion ist daher anzunehmen.

1.5 HIV, das Immunsystem und derzeitige antivirale Konzepte

Schon in der Frühphase einer HIV-Infektion findet eine ausgeprägte Virusreplikation im Bereich des lymphatischen Gewebes statt (Pantaleo, Graziosi et al. 1993). Jedoch entwickelt sich gleichzeitig eine HIV-spezifische Immunantwort, die die anfangs ausgeprägte Virämie im Blut zurückdrängt oder zumindest begrenzt. Latent infizierte $CD4^+$ T-Zellen, Makrophagen, und dadurch später auch Astrozyten im Gehirn, etablieren sich als Virusreservoirs und können später jederzeit potenziell Zellen infizieren. Die Virusreplikation findet in den späteren Phasen hauptsächlich im lymphatischen Gewebe statt, wo deutlich mehr virale DNA gefunden werden kann als in Zellen des peripheren Blutes (Tenner-Racz, Stellbrink et al. 1998). Bei sogenannten HIV-Langzeitüberlebenden (Long term non-progressors, LTNP) finden sich, im Gegensatz zu Infizierten mit schnell fortschreitendem Krankheitsverlauf, eine große Zahl von HIV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen mit breiter Reaktivität gegen verschiedene Virusproteine (Goulder, Phillips et al. 1997). Die Methode der sogenannten Tetramer-Färbung ermöglicht es heute die Zahl HIV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen im Blut direkt zu bestimmen (Ogg, Jin et al. 1998). Eine HIV-spezifische $CD8$ -Antwort kann teilweise auch bei HIV-exponierten, aber nicht infizierten Personen beobachtet werden. Nef-spezifische $CD8^+$ Zellen wurden bei seronegativen heterosexuellen Partnern von HIV-1 infizierten Individuen, Env-spezifische bei seronegativen Krankenschwestern nachgewiesen (Pinto, Sullivan et al. 1995). Eine effektive Immunantwort eines Individuums auf die vorgehende Replikation von HIV im Organismus kann unter Umständen lange Zeit die sogenannte Viruslast in Grenzen halten. Medikamente die in einer frühen Phase der Infektion die Replikation unterdrücken können dazu ebenso in der Lage sein. Allerdings ist die Replikation von HIV außerordentlich fehlerträchtig und kennzeichnet sich durch eine sehr hohe Mutationsrate des viralen Genoms. Die Fehlerrate isolierter HIV-RT wird mit bis zu 10 Fehlern pro Genom in jeder Replikationsrunde angegeben, allerdings ist die Zahl der auftretenden Fehler während der HIV-Replikation in vivo um den Faktor 20 niedriger (Mansky and Temin 1995);(An and Telesnitsky 2001). Neben Mutationen, die zu Viren führen die gar nicht mehr replikationsfähig sind, entstehen bei der Virusreplikation eine Vielzahl nah verwandter, doch genetisch deutlich unterschiedlicher HIV-Varianten, sogenannte Quasi-Spezies. Medikamente und Komponenten des Immunsystems üben einen

sehr hohen Selektionsdruck auf Virusmutanten aus und begünstigen bzw. induzieren die Entstehung von sogenannten viralen "escape"-Mutanten, die nicht vom Immunsystem des Wirts erkannt werden. Durch die Bildung einer Vielfalt von "escape"-Mutanten wird die Erkennung durch CD8⁺ Zellen unmöglich. Andere Mechanismen, wie die bereits erwähnte Herabregulation der HLA-Klasse I-durch Nef, tragen langfristig u.a. auch dazu bei. LTNP weisen häufig ebenfalls neutralisierende Antikörper gegen eine Vielzahl von Isolaten auf (Carotenuto, Looij et al. 1998; Cecilia, Kleeberger et al. 1999), aber es ist ungeklärt, ob die neutralisierenden Antikörper bei Langzeitüberlebenden die Ursache für den langsamen Krankheitsverlauf ist oder lediglich Ausdruck eines relativ intakten Immunsystems.

Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht über einige derzeit verwendete Pharmaka zur direkten antiviralen Therapie von HIV (Forth, Henschler et al. 2001). Die überwiegende Mehrheit der antiviralen Mittel haben als therapeutisches Ziel die Reverse Transkriptase von HIV. Dies sind die Nukleotidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) und die Nicht-Nukleotidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI). Ein weiteres Ziel ist die virale Protease, die von Protease Inhibitoren (PI) gehemmt wird. Eine Klasse von bisher erst im Zulassungsverfahren befindlichen Therapeutika, die Eintritts-Inhibitoren (EI), zielen auf eine Verhinderung des Eintritts von HIV in Zielzellen ab. Andere Klassen von Therapeutika zur Behandlung von HIV sind im Moment nicht zugelassen. Die derzeit übliche Methode der antiviralen Kombinationstherapie (HAART) basiert auf der Anwendung von einem PI in Verbindung mit zwei NRTIs oder einem NNRTI oder einem weiteren NRTI. Untersuchungen mehrerer verschiedener Kombinationen zeigten kaum Unterschiede in der Wirksamkeit, weshalb die Art der Kombination in der Regel zunächst nach der Anzahl der einzunehmenden Kapseln oder Tabletten und später nach den auftretenden Resistenzen festgelegt wird (Forth, Henschler et al. 2001). Es ist von Bedeutung zu wissen, dass eine Therapie mit den genannten Medikamenten immer zu Nebenwirkungen mehr oder weniger großen Ausmaßes führt. Unverträglichkeiten und lange Einnahme führen in vielen Fällen dazu, dass der Organismus des Patienten zusätzlich erheblich geschwächt wird (Forth, Henschler et al. 2001). Neben der Resistenzentwicklung bei bestehenden anti-HIV Therapien ist ein weiteres Problem, dass derzeit keine Eliminierung der Infektion des Wirts erreicht werden kann und dass bereits infizierte Zellen nicht in der Expression von HIV-1

Genprodukten gehemmt werden können. Es besteht also grundsätzlich Bedarf an neuen, verträglichen Therapie-Ansätzen.

Name des Medikaments (Markenname)	Angriffsort / Wirkweise
AZT, Zidovudin (Retrovir ^R)	NRTI
Amprenavir (Agenerase ^R)	PI
Delavirdin (Rescriptor ^R)	NNRTI
Efavirenz (Sustiva ^R)	NNRTI
Didanosin (Videx ^R)	NRTI
Lopinavir (Kaletra ^R)	PI
Nelfinavir (Viracept ^R)	PI
Indinavir (Crixivan ^R)	PI
Ritonavir (Norvir ^R)	PI
Tenovovir (Viread ^R)	NRTI
Lamivudin (Epivir ^R)	NRTI
T-20 (Fuzeon ^R)	EI, in Zulassungsverfahren (US)
Stavudin (Zerit ^R)	NRTI
Saquinavir (Invirase ^R)	PI

Tabelle 1.1: Medikamente zur Therapie einer HIV-Infektion. Abkürzungen: NRTI, Nukleotidischer Reverse Transkriptase Inhibitor; NNRTI, nicht-nukleotidischer Reverse Transkriptase Inhibitor; PI, Protease Inhibitor; EI, Eintritts Inhibitor.

Anfang bis Mitte der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurden deshalb groß angelegte Suchunternehmen zur Identifikation von neuen, teilweise natürlichen Wirkstoffen initiiert (Cardellina, Munro et al. 1993; Cragg, Boyd et al. 1994). Besonders Länder der so genannten Dritten Welt setzten große Hoffnungen auf billige, möglicherweise aus einheimischen Pflanzen oder Tieren zu gewinnende, Wirkstoffe. Es wurde im Laufe der Zeit tatsächlich eine überwältigende Zahl von Substanzen mit Auswirkungen auf den Vermehrungszyklus von HIV gefunden. Diese neuen Substanzen brachten gelegentlich gute Erfolge, zumindest *in vitro*. Eine Auswahl als HIV-inhibitorisch identifizierter Naturstoffe ist in Tabelle 1.2 zusammengestellt. Eine Zusammenfassung über anti-mikrobiell (und anti-HIV) wirksame Pflanzensubstanzen gibt (Cowan 1999).

Bei näherer Überprüfungen *in vivo* konnten die meisten der Substanzen aber leider nicht das halten was sie versprochen oder es erfolgte bis jetzt nur eine unvollständige Charakterisierung.

Wirkungsweise/ Wirkungsort	Wirksamer Inhaltsstoff	Pflanze	Referenz
Reverse Transkriptase	Hydoxymaprunsäure	<i>Maprounea africana</i>	(Pengsuparp, Cai et al. 1995)
	Psychotrine	<i>Cephaelis Ipecacuanha</i>	(Tan, Pezzuto et al. 1991)
	Koriandrin	<i>Coriandrum sativum</i>	(Hudson, Graham et al. 1993)
	Glycyrrhizin	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	(Watanabe, Hayakawa et al. 2002)
Integrase	Curcumin	<i>Curcuma longa</i>	(Mazumder, Neamati et al. 1997)I
	Quercetin	<i>Quercus rubra</i>	(Fesen, Kohn et al. 1993)
Protease	Karnesolsäure	<i>Rosmarinus officinalis</i>	(Paris, Strukelj et al. 1993)
	Ursolsäure	<i>Geum japonicum</i>	(Xu, Wan et al. 2000)
Zelluläre Faktoren	Hypericin	<i>Hypericum</i>	(Hudson, Harris et al. 1993)
	Chrysin	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	(Critchfield, Butera et al. 1996)
Adsorption	Schumannifizin 1	<i>Schumanniophyton magnificum</i>	(Houghton 1996)
	Prunellin	<i>Prunella vulgaris</i>	(Yao, Wainberg et al. 1992)
Unbekannt	Thiarubrine	<i>Asteraceae</i>	(Hudson, Balza et al. 1993)
	Chrysin	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	(Hu, Chen et al. 1994)
	Hypericin	<i>Hypericum</i>	(Taher, Lammering et al. 2002)

Tabelle 1.2: Eine Auswahl an Naturstoffen aus Pflanzen die bisher auf ihre antivirale Wirksamkeit gegenüber HIV-1 untersucht wurden.

1.6 Auf der Suche nach neuen antiviralen Therapiemöglichkeiten

Derzeit wird eine Vielzahl neuer Ansatzpunkte für eine generell antivirale HIV-Therapie verfolgt. Einige neuere oder besonders viel versprechende Ansätze sind im Folgenden erwähnt.

Eintrittsinhibitoren

Als sehr aussichtsreich gelten die sogenannten Eintrittsinhibitoren („entry inhibitors“), die verhindern, dass Viruspartikel in die Zelle gelangen. Noch ist kein Medikament dieser Klasse zugelassen (Stand Juni 2003), doch die in den klinischen Studien oder dem Zulassungsverfahren befindlichen Produkte versprechen eine gute Zukunft für diesen Therapieansatz.

Es können innerhalb der „entry inhibitors“ grundsätzlich drei verschiedene Ansatzpunkte unterschieden werden: (i) Anlagerungs-Inhibitoren, die verhindern, dass HIV an Zellen bindet, (ii) Co-Rezeptor-Inhibitoren (Hartley, Dorgham et al. 2003); (Tsamis, Gavrillov et al. 2003) und (iii) Fusions-Inhibitoren (Huang, Zhang et al. 2003). Eine Übersicht über diese Klasse von neuen Therapeutika geben O'Brien (O'Brien 2003) und Huang et al. (Huang, Zhang et al. 2003).

Gentherapeutische Ansätze

Gentherapeutische Ansätze stellen nicht im eigentlichen Sinn eine neue Klasse von Medikamenten dar, sondern eher eine Darreichungsform für, an verschiedenen Stellen ansetzende, inhibitorische Faktoren.

So wurden beispielsweise neuronale Zellen mit der transdominant negativen Rev Mutante RevM10 mittels rekombinanter SV40 –Vektoren (rSv40) transduziert und damit die HIV-Replikation verhindert (Cordelier, Van Bockstaele et al. 2003). Dieselbe Arbeitsgruppe inhibierte die Prozessierung von gp160 zu gp120 durch die Anwendung von SV40-basierten Vektoren, die für Antitrypsin kodierten (Cordelier, Zern et al. 2003). Desweiteren wurde z.B. in primären T-Zellen, durch die Transduktion von MMLV basierten Expressions-Vektoren für anti-HIV-1 gag p17 scFv/Ck, die Virus-Replikation um 90% reduziert (Tewari, Notkins et al. 2003).

Unter anderem wurden für gentherapeutische Ansätze im Kontext einer HIV-Infektion auch schon Sindbis Expressions-Vektoren verwendet (van Marle, Ethier et al. 2003).

Das Potenzial für Gentherapie scheint gerade im Bereich der Krebs- und HIV-Therapie sehr groß zu sein, jedoch befindet sich bisher noch keine Ansatz im HIV-Bereich in sehr fortgeschrittenen Phasen der Erprobung (Dobbelstein 2003).

Impfungen und Immuntherapie

Auch ist die Suche nach einer Impfung zur Erzeugung einer Immunität gegenüber HIV noch nicht aufgegeben. Kaum ein Ansatz geht heute noch davon aus, dass mit einfachen Mitteln eine sterile Immunität gegenüber HIV erreicht werden kann, doch eine Begrenzung der Infektion und damit Verzögerung der Pathogenese wird für möglich gehalten (Gallo 2003). Ein Schwerpunkt ist derzeit die Erzeugung oder Förderung einer protektiven Funktion der Schleimhäute des Organismus, die damit die Aufnahme von Viruspartikeln begrenzen könnten (Lehner 2003). Ein weiterer interessanter Ansatz nutzt beispielsweise Virus-ähnliche Partikel, die eine Immunantwort hervorrufen ohne die Gefahr der Erzeugung einer Immundefizienz zu bergen, wie es bei attenuierten Viren der Fall wäre (Young and Ross 2003). Einige dieser Ansätze befinden sich bisher in präklinischer oder klinischer Untersuchung. Ist eine HIV-Infektion bereits erfolgt, kann versucht werden mit Hilfe einer Immuntherapie die Abwehrlage gegenüber der Infektion zu verbessern. Dies kann entweder begleitend mit HAART oder ohne geschehen.

Eine passive Immuntherapie mit polyklonalen Antikörpern gegen HIV Antigene, die in Ziegen erzeugt wurden, reduzierte in einer Phase-I Studie die nachweisbare HIV-1 RNA nach 29 Tagen um bis zu 2.2 log(10)-Stufen (Dezube, Proper et al. 2003). In Makaken wurden erfolgreich Gag DNA/Gag Protein in "prime-boost" Vaccinierungen eingesetzt um die Erzeugung von neutralisierenden Antikörpern zu induzieren sowie die Zahl der T-Zellen wieder zu steigern (Otten, Schaefer et al. 2003). Ausserdem wurden in HIV-infizierten Individuen synthetische Immunmodulatoren wie Murabutid (De La Tribonniere, Mouton et al. 2003) ebenso eingesetzt wie die umstrittene Injektion von gering aggressiven Malaria-Erregern (bewertet in (Nierengarten 2003)), um eine Aktivierung des Immunsystems zu erreichen. Auch wenn teilweise Steigerungen der Zahl an CD4⁺ T-Zellen erreicht werden konnten, waren die Effekte stets gering (De La Tribonniere, Mouton et al. 2003). Durch die immunpathogene Natur von HIV scheitern langfristig viele Versuche eine erneute virusspezifische T-

Zell Antwort oder eine Produktion neutralisierender Antikörper in infizierten Individuen zu erzeugen (Hardy, Imami et al. 2002).

Ribozyme und siRNAs

In den letzten Jahren wurden auch einige Versuche unternommen mittels Ribozymen oder siRNAs eine HIV-inhibitorische Wirkung zu erzielen.

Ribozyme wurden entwickelt spezifische RNA-Sequenzen im HIV-Genom zu erkennen, zu schneiden und so die Virusreplikation zu unterbrechen (MacPherson, Ely et al. 1999). Ebenso wurden siRNAs eingesetzt, die spezifisch gegen Regionen viraler RNA gerichtet waren um so einen Abbau dieser RNAs zu induzieren (Novina, Murray et al. 2002; Arteaga, Hinkula et al. 2003). Mit siRNAs wurden kurzfristig gute Erfolge bei der Unterdrückung der HIV-1 Replikation erzielt, jedoch waren diese nicht von sehr langer Dauer (Novina, Murray et al. 2002). Diese Einschränkung und die hohe Mutationsrate von HIV-1 könnten ernsthafte Probleme im therapeutischen Einsatz darstellen (Pomerantz 2002).

Inhibitoren regulatorischer Proteine

Sieht man sich die Tabelle 1.1 genauer an, so kann man feststellen, dass sich unter den Medikamenten die derzeit zur Behandlung einer HIV-Infektion verordnet werden, praktisch nur Therapeutika befinden die die virale RT und die PR angreifen. Medikamente die regulatorische Proteine zum Ziel haben, sind bisher nicht zugelassen. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass dieser Ansatz gerade in einer Kombinationstherapie vielversprechende Ergebnisse liefern würde. Sowohl Rev als auch Tat bieten durch ihre spezifische Funktion, ihre Unentbehrlichkeit für den viralen Lebenszyklus und die Vielzahl zellulärer Interaktionspartner ideale Ziele für eine antivirale Therapie. Die inhibition von Tat oder Rev bietet den Vorteil, dass in infizierten Zellen damit die Synthese pathogener HIV-Faktoren reduziert wird. Eine Reihe von Interaktionen mit zellulären Faktoren stellen Ziele für solche Medikamente dar und sind für Rev in Tabelle 1.3 und für Tat in Tabelle 1.4 aufgelistet.

Interaktionspartner	Referenz
Crml, Exportfaktor	(Yi, Bogerd et al. 2002)
Sam68, Scr-assoziiertes Mitoseprotein	(Li, Liu et al. 2002)
B23, Nukleoläres Protein	(Szebeni, Mehrotra et al. 1997)
Mikrotubuli, Aktin	(Hofmann, Reichart et al. 2001)
NLP-1, Nukleoporinähnliches Protein	(Farjot, Sergeant et al. 1999)
Poly(A)-binding protein 1, mRNA-Prozessierung	(Campbell, Borg et al. 1994)
Importin β , Importfaktor	(Truant and Cullen 1999)

Tabelle 1.3: Eine Auswahl zellulärer Interaktionspartnern von HIV-1 Rev. Die Interaktionen von Rev mit diesen könnten mögliche Angriffspunkte für antivirale Therapien bieten.

Interaktionspartner	Referenz
CDK9, Kofaktor für Transkription	(Ivanov, Kwak et al. 1999)
Spt5, Transkriptionsfaktor	(Bourgeois, Kim et al. 2002)
LSF, Transkriptionsfaktor	(He and Margolis 2002)
TF(II), Transkriptionsfaktor	(Weissman, Hwang et al. 2001)
P/CAF, p300, Histonmodifikatoren	(Benkirane, Chun et al. 1998)

Tabelle 1.4: Eine Auswahl zellulärer Interaktionspartnern von HIV-1 Tat. Die Interaktionen von Tat mit diesen könnten mögliche Angriffspunkte für antivirale Therapien bieten.

Es gab in den vergangenen Jahren einige Studien, die sich der Entwicklung von Hemmstoffen der regulatorischen Proteine Rev und Tat widmeten (Hamy, Felder et al. 2001; Fineberg, Fineberg et al. 2003). Eine Auswahl davon ist in Tabelle 1.5 zusammengestellt.

Wirkungsweise/ Wirkungsort	Wirksame Verbindung	Verbindungs- klasse	Referenz
Tat-TAR Interaktion	U16TAR	RNA-TAR Konstrukt	(Michienzi, Li et al. 2002)
RRE-Interaktion bzw. Spaltung	Cu ²⁺ Kanamycin A	Kupfer Aminoglykosid- Verbindung	(Sreedhara and Cowan 2001)
TAR-Bindung u.a.	NeoR	Neomycin-(Hexa) Arginin- Konjugat	(Litovchick, Lapidot et al. 2001)
Tat-Bindung	D-Penicillamin	Struktur analog von Cystein	(Demirhan, Kanyalkar et al. 2002)
RRE-Rev Interaktion	RRE-phosphoro thioat	Liposomal verpacktes RRE-Analog	(Duzgunes, Simoos et al. 2001)
RRE-Rev Interaktion	Rev-PNA	Rev-Peptide nucleic acid	(Kumagai, Takahashi et al. 2001)
Tat-TAR Interaktion	RBT-203	Mono-und Di-Guanidin Verbindungen	RiboTargets Ltd.
Rev-Import	RRE IIB, tRNA, ARM Peptides	RNA oder Peptid Fragmente	(Fineberg, Fineberg et al. 2003)

Tabelle 1.5: Eine Auswahl an chemischen Verbindungen, die bisher auf ihre antivirale Wirksamkeit gegenüber den regulatorischen Proteinen Rev und Tat untersucht wurden.

Problem neuer Hemmstoffe sind oft die geringe Spezifität oder Wirksamkeit, die Toxizität und die schlechten „Delivery-Eigenschaften“ der Verbindungen.

Es wurden bereits vielfältige Ansätze für eine Identifizierung neuer Rev/Tat-inhibitorischer Verbindungen entwickelt oder aber bestehende Methoden entsprechend für diese Aufgabe angepasst. Dazu zählen u.a. die in Tabelle 1.6 genannten.

Art des Assays	Test-System für (u.a.):	Referenz
Szintillations-Proximity-Assay (SPA)	Inhibition von Rev-RRE Interaktion	(Chapman, Stanley et al. 2002); (Van Ryk and Venkatesan 1999)
Fluorescence resonance Energy Transfer (FRET)	Interaktion	(Eis, Olson et al. 2001)
Hefe –oder Säuger 2- (oder 3-) Hybrid System (Y2H, M2H)	Interaktionen mit Tat oder Rev	(Loregian, Bortolozzo et al. 2003);(de Soultrait, Caumont et al. 2002);(Liu, Li et al. 2002)
Fluoreszenz Anisotropy (FA)	Inhibition von Rev-RRE Interaktion	(Zargarian, Benleumi et al. 2003);(Tok, Dunn et al. 2001);
Biochemische Ansätze: Gel Mobility shift u.a.	Bindung an Rev oder RRE	(Arimondo, Gelus et al. 2000)
<u>Reporter-Assays</u> GFP, β-Galactosidase, CAT	Inhibition von Rev- oder Tat-vermittelter Transaktivierung	(Richman, Meylan et al. 2002); (Michienzi, Li et al. 2002); (Dorsky, Wells et al. 1996), (Kitaura, Ohara et al. 2002)

Tabelle 1.6: Testsysteme zur identifikation potentieller HIV-Inhibitoren.

Alle in Tab. 1.6 erwähnten Assays besitzen natürlich Stärken und Schwächen und es muss vor der Anwendung geklärt werden was eine Assay leisten kann und was nicht. Ein neu entwickeltes System sollte wesentliche Verbesserungen oder Vereinfachungen in der Anwendbarkeit einführen, um eine „Daseinsberechtigung“ zu erhalten.

Testsysteme wie in Tab. 1.6 aufgeführt können nur zu einer Vorauswahl von möglichen HIV-Inhibitoren führen. Letztendlich sollte immer die Effektivität einer inhibitorischen Wirkung in einem Assay erprobt werden, dass das ganze HI-Virus involviert, am besten im Kontext eines lebenden Organismus (Ptak 2002).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

In der Vergangenheit fanden umfassende Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion des HIV-1 Rev Proteins in humanen Astrozyten bzw. Astrozytomzelllinien in der Arbeitsgruppe Retrovirale Regulation des Instituts für molekulare Virologie an der GSF statt. Die Ergebnisse legten die Anwesenheit von dominant negativ auf die Rev-Funktion einwirkenden Faktoren im Zytoplasma von Astrozyten nahe, die die zwingend notwendige Kern-Zytoplasmatische Beweglichkeit von Rev beeinträchtigten.

Diese Beobachtungen wiesen erstmalig darauf hin, dass die Funktionalität des HIV-Rev Proteins durch zelluläre Mechanismen reguliert werden kann.

Grundsätzlich könnten zelluläre Mechanismen zur Kontrolle der viralen Genexpression als therapeutische Ansätze zur Beeinflussung einer HIV-Infektion dienen. Deshalb ist es von großem Interesse Inhibitoren der HIV-Genexpression zu identifizieren.

In dieser Arbeit soll ein einfach einzusetzender Lebend-Zell-Assay entwickelt werden, um Inhibitoren der Rev-vermittelten Genexpression zu identifizieren. Die Brauchbarkeit des Assays soll anhand bereits bekannter Inhibitoren bestätigt werden. Desweiteren soll das entwickelte Verfahren angewendet werden um in cDNA-Bibliotheken aus Gehirn-Material bzw. Astrozyten nach Faktoren mit inhibitorischer Wirkung zu suchen.

Einen zusätzlichen Schwerpunkt soll, parallel zu dem bereits erwähnten Projekt, auf der weiteren Eingrenzung des Mechanismus der Astrozyten-vermittelten Funktionsbeeinträchtigung von Rev liegen. Dies soll durch die *in vivo* fluoreszenzmikroskopische Analyse unterschiedlicher Rev-Mutanten geschehen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Puffer und Lösungen

Lösungen für die Zellkultur wurden autoklaviert. Hier nicht aufgeführte Puffer und Lösungen sind im Methodenabschnitt oder in den Handbüchern der einzelnen Hersteller beschrieben.

Puffer

Bestandteile

Aufschlusspuffer für Protein-Extraktion
aus eukaryotischen Zellen

Tris, pH 7,4; 50 mM
NaCl 150 mM
Triton X-100 1%
Na-Desoxycholate (DOC; 1%)
SDS 0,1%
Aqua destillata

Elektrophorese-Puffer für
SDS-PAGE (10x)

Tris Base 250 mM
Glycin 1,92 M
SDS 1% (w/v)
Aqua destillata

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid 1% (w/v)
Aqua destillata

Gelauftragspuffer für SDS-PAGE (5x)

Tris pH 6,8; 250 mM
SDS 10%
β-Mercaptoethanol 12,5%

	Bromphenolblau 0,1% Aqua dest.
IPTG-Lösung	IPTG 0,2% Aqua dest.
Kochsalzlösung, physiologisch 0,9%	NaCl 154 mM
Phosphat gepufferte Kochsalzlg. pH 7,4 (PBS)	NaCl 140 mM KCl 5,4 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 9,7 mM KH ₂ PO ₄ 2 mM Aqua dest.
Probenauftragspuffer für Agarosegelelektrophorese	Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol FF 0,25% Ficoll 15% Aqua dest.
SDS-Lösung (10%)	Natriumdodecylsulfat 10% (w/v) Aqua dest.
TE-Puffer (1x)	Tris/HCl 10mM EDTA 1mM Aqua dest.
Tris Acetat EDTA Puffer (50x) (TAE)	Tris Base Essigsäure 5,71% EDTA pH 8,0 Aqua dest.
Tris/HCl, 1M (verschiedene pH-Werte)	Tris Base 1M Aqua dest. pH mit HCl (konz.) einstellen

Trypanblaulösung	NaCl 0,9% Trypanblaufarbstoff (0,5%) Aqua dest.
Trypsin-EDTA Lösung	NaCl 140 mM KCl 5,4 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 100 mM KH ₂ PO ₄ 2,2 mM Trypsin 0,05% EDTA 0,54% Aqua dest.
X-Gal Lösung	X-Gal 2% in 100% N,N-Dimethylformamid

Reagenzien

1-kb-DNS Längenstandard	Life Technologies, Eggenstein
2 log DNS Längenstandard	New England Biolabs, Schwalbach
Acrylamid	Biorad, München
Agarose (ME, Seakem)	Biozym, München
Shrimp alkalische Phosphatase (SAP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
AMV Reverse Transkriptase	Qiagen, Hilden Promega, Madison, USA
Antibiotika-Antimykotika Lsg. (AB/AM)	Life Technologies, Eggenstein
Aqua bidest.	Millipore, Eschborn
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Rinderserum Albumin (BSA)	New England Biolabs, Schwalbach
Kälber alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Schwalbach
Coomassie-Brilliant-Blau R-250	Serva, Heidelberg

dNTPs	Perkin Elmer Cetus, Überlingen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Fötiales Kälber Serum FKS (FCS)	Gibco, Karlsruhe
	Seromed, Berlin
FuGENE6™	Roche Diagnostics, Mannheim
Hoechst 33342	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Roche Diagnostics, Mannheim
L-Glutamin-Lsg. (100x)	Life Technologies, Eggenstein
Leptomycin B	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin -Lsg.(P./S.)	Life Technologies, Eggenstein
Polyethylenglykol	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinstandard („Kaleidoscope“)	Biorad, München
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics, Mannheim
	New England Biolabs, Schwalbach
	Promega, Madison, USA
RNAasin, RNase-Inhibitor	Promega, Madison, USA
RNase Zap	Ambion, Austin, USA
SDS (Pulver)	Merck, Darmstadt
T4 DNS Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
	New England Biolabs, Schwalbach
T4 Polynukleotidkinase	Roche Diagnostics, Mannheim
	New England Biolabs, Schwalbach
Tris	Löwe Biochemika, München
Tween20	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA Lösung	Biochrom, Berlin

Oligonukleotide wurden in der AG BIODV von Herrn Utz Linzner in der GSF, Neuherberg synthetisiert. Weitere Gebrauchswaren und Laborartikel wurden von den Firmen Abimed (Langenfeld), Amersham (Braunschweig), Beckman (München), Greiner Bio-one (Frickenhausen), Nunc (Wiesbaden), BD Falcon (Düren), Corning Costar (Cambridge, USA), Eppendorf (Hamburg), Gilson (Den Haag , Niederlande), Kremer & Kreiler (München) und Eastman Kodak (Rochester, USA) bezogen.

Sonstiges Verbrauchsmaterial

Filter 0,22µm	Nalgene, USA
Filterpapier, Whatman 3mm	Whatman, Maidstone, GB
Glasboden Petrischalen	MatTek, Ashland, USA
Immersionsöl (Immersol 518 F)	Carl Zeiss, Oberkochen
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell, Dassel
Plastikmaterial für Zellkultur	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, BD Falcon, Düren oder Nunc, Wiesbaden
Zählkammer Fast Read 106	Madaus Urotech, München

Verwendete Kits

Name:	Hersteller :
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford, USA
CalibriteBeads	BD Biosciences, Heidelberg
Expand HighFidelity PCR Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Nucleobond AX500/100 Kit	Macherey-Nagel GmbH, Düren
PCR-Polymerasen Kit (Taq)	Qiagen, Hilden
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Maxi/Midi Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange-Mutagenesis Kit	Stratagene,
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
RNeasy Kit	Qiagen Hilden
RLM-RACE	Ambion, Austin, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Medien

Bakterienmedien

LB-Medium (nach Luria-Bertani)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml mit AD, pH 7,0
Einfriermedium für Bakterien	2 Teile 80% Glycerol 1 Teil 10 mM MgCl ₂
SOC Vollmedium (Life Technologies, Invitrogen)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 mM KCl 20 mM Glucose ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,0

Medien für Säugetierzellen

Medium für alle verwendeten Zelllinien

DMEM mit Glutamax I, ohne Na-Pyruvat, 4,5 g/l Glucose, Zugabe von 10% FKS und bei Bedarf (besonders Zellen, die zur Transfektion in Schälchen ausgesät wurden) 1% AB/AM

Mikroskopiemedium

DMEM ohne Glutamax I, ohne Na-Pyruvat, 4,5 g/l Glucose ohne Phenolrot, Zugabe von 1-10% FKS und 1% Glutamin-Lsg

Einfriermedium:

DMEM mit Glutamax I, ohne Na-Pyruvat, 4,5 g/l Glucose, Zugabe von 20% FKS, 10% DMSO und 1% AB/AM

FKS wurde vor Gebrauch 0,5-1 h bei 56°C hitzeinaktiviert.

2.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper

- Monoklonaler Ratte-anti-Rev Antikörper (# 5C6-1-1)
(Dr. Elisabeth Kremmer, GSF, München)
- Monoklonaler Maus-anti-GFP Antikörper, Living Colors A.v. (BD Clontech, Düren)
- Polyklonaler Kaninchen-anti-dsRed Antikörper, Living Colors A.v. (BD Clontech, Düren)

Sekundäre Antikörper

- Meerettich-Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus Antikörper
- Meerettich-Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Ratte Antikörper
- Meerettich-Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper

Alle sekundären Antikörper wurden von DakoCytomation, Dänemark bezogen.

2.1.4 Plasmide

Rev Expressionsplasmide

pBsRev

Das Plasmid exprimiert Rev unter der Kontrolle der HIV-1 LTR und ist ein Derivat von pLsRev (Mermer, Felber et al. 1990). Die HIV-1 LTR/rev-Sequenzen wurde in den Bluescript Vektor pBsPI integriert, da dieser Vektor in hoher Kopienzahl in *E.coli* repliziert werden kann (G. Pavlakis, NCI, Maryland, USA).

pBsRevM10BL

Die M10-Mutation im nukleären Exportsignal NES an Position 78 / 79 L E → D L wurde mit PCR in das Wildtyp rev-Gen eingeführt (Malim, Bohnlein et al. 1989). Eine

zusätzliche Insertion von 4 Aminosäuren (EDLP) zwischen Position 82 und 83 (BL-Mutation) ergab das Endkonstrukt, welches ein transdominant-negatives Rev-Protein unter der HIV-1 LTR Kontrolle exprimiert (Stauber, Gaitanaris et al. 1995). Wildtyp-Rev kann mit RevM10BL konzentrationsabhängig gehemmt werden (G. Pavlakis, NCI, Maryland, USA).

pCRev

Rev-Expressionsplasmid unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Die *rev*-Sequenz stammt aus einem HIV-1 cDNA-Klon (lai) und wurde in den Basisvektor pBC12/CMV kloniert (B. Cullen, Durham, USA).

pCsRevsg143

Das *rev*-Gen wurde aus dem Vektor pBsRev amplifiziert und mit *NheI* geschnitten. Dieses Amplifikat wurde zunächst in den GFP-Vektor pFred25 kloniert (pCsRevsg25), später über dieselbe *NheI*-Schnittstelle in pFred143. Ein großer Vorteil des Konstrukts ist die Tatsache, dass kein internes Start-Kodon für GFP vorhanden und somit die Gefahr N-Terminal trunkierter Proteinprodukte gering ist (M. Neumann, GSF, Neuherberg).

pCRevM5sg143

Expressionskonstrukt für RevM5-GFP. Die M5-Mutation betrifft die Aminosäuren 38 und 39 in der NLS von Rev, die von RR zu DL mutiert wurden. Die Aminosäuresequenz für Rev entspricht auch außerhalb der M5- Mutation nicht zu 100% dem sRev aus pCsRevsg143, sondern der Sequenz von Rev in pCRev und pCRevM5 (Malim, Hauber et al. 1988). Siehe Tabelle 3.2.

pCsRevM10BLsg143

Die Rev-Mutante M10BL wurde aus pCsRevM10BLsg25 über *NheI* in pFred143 kloniert. Das Plasmid pCsRevM10BLsg25 wurde mit Hilfe der Plasmide pBsrevM10BL und pCsRevsg25GFP konstruiert (M. Neumann, GSF, Neuherberg). Siehe Tabelle 3.2.

pCsRevM5M10BLsg143

Dieses Plasmid kombiniert die Mutationen im *rev* Gen aus pCRevM5sg143 und pCsRevM10BLsg143 in sich. Es wurde durch Kombination der *Bam*HI-Fragmente beider Plasmide zusammengefügt (Birgit Kraus, GSF). Siehe Tabelle 3.2.

pCsSecSigRevsg143

sRev wurde mit *Nhe*I aus pCsRevsg143 ausgeschnitten und in den Vektor pCSecSigGFP kloniert. Siehe Tabelle 3.2.

pCsRevEDRsg143

Die Rev Mutante KAV->EDR wurde in den *Nhe*I-geschnittenen pFRed143 kloniert. Siehe Tabelle 3.2.

pCsRev-71-RexNESsg143

Das durch PCR erzeugte Hybrid-Konstrukt aus Rev und Rex –Sequenzen wurde in den mit *Sac*II und *Nhe*I geschnittenen pFred143 kloniert. Siehe Tabelle 3.2.

pSV40-RevRFP1

sRev wurde mit *Nhe*I aus pCsRevsg143 ausgeschnitten und in den Vektor pSV40-mRFP1 (Manja Ziegler, GSF) kloniert. Das Konstrukt führt zu einer Expression von rot fluoreszierendem Rev in den Nukleoli und im Zytoplasma, das funktionell ist.

Tat-Expressionsplasmide

pL3Tat

Das Plasmid exprimiert eine 72-AS Form von Tat unter der Kontrolle der HIV-LTR, allerdings besteht das Polyadenylierungssignal aus einer SV40-Sequenz (G. Pavlakis, NCI, Maryland, USA).

pCTat

Dieses Plasmid exprimiert eine 86 Aminosäure-Variante von Tat (HXB3) unter der Kontrolle des CMV (-immediate early) Promotors mit einem SV40-Polyadenylierungssignal (B. Cullen).

Reportervektoren

pB37R Dieses Plasmid exprimiert das p37 Gag aus HXB2 unter der Kontrolle der HIV-LTR (5' und 3') und damit Tat-abhängig. Die Expression ist durch die Anwesenheit der INS-Elemente in *gag* und der RRE, Rev-abhängig. (G. Pavlakis, NCI)

pLRed

Dieses Plasmid wurde durch den Verdau von pLRedR mit *KpnI* und die anschließende Religation des Vektors erhalten. Dadurch wurde der gesamte Bereich der RRE aus dem Plasmid entfernt.

Die Expression des rot fluoreszierenden Proteins *DsRed1* (Matz, Fradkov et al. 1999) steht damit nur unter der Kontrolle der HIV-1 LTR und ist nicht mehr Rev-abhängig.

pLRedR („Basis-Konstrukt“)

Dieses Plasmid wurde durch Einsetzen eines amplifizierten Leserahmens des *dsred1* Gens in den Vektor pB37R erzeugt (Schnittstellen *BssHII* und *ClaI*).

Die Expression des rot fluoreszierenden Proteins *DsRed1* steht unter der Kontrolle der HIV-1 LTR und kann weiter durch RRE-vermittelte Transaktivierung durch HIV-1 Rev gesteigert werden. Die Expression von *DsRed* ist weitgehend durch die LTR HIV-1 Tat- und, bis zu einem gewissen Maß, durch die RRE Rev-abhängig.

pLRedINSR

Das Plasmid wurde durch Einfügen eines Bereiches aus dem HIV-Genom (Nukleotidposition 379 -1424, bezogen auf die HIV-1 HXB2-Sequenz Acession-Nr.: K03455; M38432) nach dem Translationsstopp für das *DsRed* und vor der RRE generiert. Die eingefügten Sequenzen entsprechen in etwa der Region die für p17/p24 kodiert. Die Rev-Abhängigkeit der Expression von *DsRed* wird durch den mRNA-destabilisierenden Effekt, der in den Sequenzen enthaltenen Elemente, gegenüber pLRedR noch deutlich verstärkt. pLRedINSR ist identisch mit pLRedINS1+2R.

pLRedSNIR

pLRedSNIR wurde auf die gleiche Weise erstellt wie pLRedINSR, jedoch wurden die HIV-Sequenzen in Negativstrang Orientierung vor die RRE gesetzt. Dadurch kann

sich auf mRNA-Ebene der inhibierende Effekt nicht entwickeln und die Expression von *DsRed* zeigt im Wesentlichen die selbe Stärke an Rev-Abhängigkeit wie bei pLRedR (s. Abb. 3.8). pLRedSNIR ist identisch mit pLRedSNI1+2R.

pLRedINS(X)R

Diese Gruppe von Vektoren wurde erzeugt, indem das Plasmid pLRedR mit dem Enzym *Cla*I verdaut und an diese Stelle amplifizierte Sequenzen aus dem HIV-1 Genom (HXB2) eingesetzt wurden. Diese befinden sich in Plusstrang-Orientierung auf der transkribierten mRNA nach dem Translationsstopp für das *DsRed*. Dadurch entstanden die folgenden Vektoren (die Zahlen in den Klammern geben die Nukleotidposition von Anfang und Ende der eingefügten HIV-Sequenzen an (bezogen auf die HXB2-Sequenz)):

pLRedINS1R	(379-729)
pLRedINS2R	(730-1424)
pLRedINS4R	(2154-2499)
pLRedINS5R	(2898-3276)
pLRedINS6R	(3498-3777)
pLRedINS7R	(4209-4612)
pLRedINS5+6R	(2898-3777)
pLRed(2xINS6)R	(3498-3777) (3498-3777)
pLRedINS10R	(8581-8848)

pLRedINS1+2R ist identisch mit pLRedINSR.

pLRedSNI(X)R

Diese Gruppe von Vektoren entspricht der oben unter „pLRedINS(X)R“ genannten Gruppe, mit dem Unterschied, dass die eingefügten HIV-Sequenzen in Negativstrang-Orientierung vorliegen.

pLRedSNI1R	(729-379)
pLRedSNI2R	(1424-730)
pLRedSNI4R	(2499-2154)
pLRedSNI5R	(3276-2898)

pLRedSNI6R	(3777-3498)
pLRedSNI7R	(4612-4209)
pLRedSNI5+6R	(3777-2898)
pLRed(2xSNI6)R	(3777-3498) (3777-3498)
pLRedSNI10R	(8848-8581)

pLRedSNI1+2R ist identisch mit pLRedSNIR.

pLRed_{Quick}

Dieser Vektor entspricht dem Konstrukt pLRed, er kodiert jedoch für die Variante *DsRed_{Quick}* anstatt für *DsRed1* (nach (Bevis and Glick 2002)). Der größte Vorteil der *DsRed_{Quick}*-Variante gegenüber *DsRed1* liegt in ihrer sehr schnellen Fluoreszenzausbildung ($t_{1/2}$ = ca. 1h) und der Abwesenheit von grün emittierenden Intermediaten. Die Sequenz für *Red_{Quick}* wurde freundlicherweise von Manja Ziegler, GSF Neuherberg, zur Verfügung gestellt.

pLRed_{Quick}R

Dieser Vektor entspricht dem Konstrukt pLRedR, er kodiert jedoch für die Variante *DsRed_{Quick}* anstatt für *DsRed1*.

pLRed_{Quick}INSR

Dieser Vektor entspricht dem Konstrukt pLRedINSR, er kodiert jedoch für die Variante *DsRed_{Quick}* anstatt für *DsRed1*.

pLRed(2xINS)R

Dieses Plasmid ist eine Weiterentwicklung des pLRedINSR. Es sind zwei p17/p24 INS-Sequenzbereiche in Plusstrang Orientierung vorhanden, was zur vollständigen Unterdrückung einer Rev-unabhängigen Expression von *DsRed* führt.

Weitere Vektoren

pFB-Viraport fetal brain

cDNA-Bank auf Basis des pFB-Viraport Vektors. Sie wurde von Stratagene aus einem Pool von 10 fötalen Gehirnen durch die Anwendung eines Stratagen-cDNA

Kits erstellt. Sie ist einmal amplifiziert, weist eine durchschnittliche Insertgröße von etwa 1600 bp auf und wurde direktional kloniert. Die Inserts stehen unter der Kontrolle eines MMLV Promotors und der Vektor eignet sich bei Transfektion in entsprechende Zelllinien zur Bildung pseudotypisierter Partikel.

pBsPI

Bluescript-Vektor (Neumann, Felber et al. 1995), modifiziert von Stefan Schwartz (G. Pavlakis).

pFred143 (oligomaster) (KH1035)

GFP-Expressionsplasmid. Das sg143 *gfp*-Gen (Stauber and Horie 1998) steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und enthält das SV-40-Polyadenylierungssignal (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg).

pCSecSigGFP

Das synthetisch mittels PCR erzeugte Sekretionssignal der leichten Igk-Kette aus der Maus wurde in einen *SacII/NheI* –verdauten pFred143 kloniert.

PCR 2.1-TOPO®

PCR-Klonierungsvektor von Invitrogen, Karlsruhe. Der Vektor liegt geöffnet mit 3' überhängenden Thymidinresten und mit gebundener Topoisomerase vor.

2.1.5 Zelllinien

HeLa

Humane epitheloide Zervixkarzinomzelllinie (Fibroblasten). Die Zellen wurden von ATCC bezogen (CRL-7923).

HeLa H2B-mRFP1 (ZW)

Zelllinie basierend auf HeLa Zellen. Die Zellen exprimieren stabil Histon H2B fusioniert an mRFP1 (die Transfektion erfolgte mit pSV40-H2BmRFP1), wodurch der Zellkern eine rote Fluoreszenz zeigt (M. Ziegler und H. Wolff, Neuherberg).

HeLa Tat

HeLa-Zellen, welche durch die stabile Integration des Plasmids pL3Tat, HIV-1 Tat exprimieren. Die Zellen exprimieren desweiteren ein Gen zur Vermittlung von G418-Resistenz (B. Felber).

85HG66

CD4-negative Astrozytomzelllinie (Stavrou, Keiditsch et al. 1987; Stavrou, Bise et al. 1989);(Brack-Werner, Kleinschmidt et al. 1992), etabliert aus einem menschlichen Astrozytom.

U-87MG (U87)

Humane Astrozytom-/Glioblastomzelllinie aus einem Tumor III. Grades. Die Zellen wurden von ATCC bezogen (ATCC HTB-14, (Ponten and EH. 1968)) (Bagasra, Khalili et al. 1992; Bagasra, Lavi et al. 1996).

U-251MG (U251)

Humane GFAP-positive Astrozytomzelllinie aus einem Glioblastom (Bigner, Bigner et al. 1981; Besnard, Brenner et al. 1991).

U-251MG (U251) –Neo

Zelllinie basierend auf U251, stabil mit einem Plasmid transfiziert, dass für ein Neomycin-Resistenzgen kodiert. Ursprünglich als Kontrollzelllinie für stabile Nef-Expression in U251 verwendet (Kohleisen et al., AIDS,1999).

U-138MG (U138)

Humane Glioblastomzelllinie aus einem astrozytären Gliom III.Grades. Die Zellen wurden von ATCC bezogen (ATCC HTB-16, (Ponten and EH. 1968)) (Chiodi, Fuerstenberg et al. 1987; Bagasra, Khalili et al. 1992).

U138 H2B-mRFP1 (ZW)

Zelllinie basierend auf U-138MG. Die Zellen exprimieren stabil das Histon H2B fusioniert an mRFP1 (die Transfektion erfolgte mit pSV40-H2BmRFP1), wodurch der Zellkern eine rote Fluoreszenz zeigt (M. Ziegler und H. Wolff, Neuherberg).

2.1.6 Bakterienstämme

XL-10 Epicurian Coli

Kompetente, super-kompetente und ultra-kompetente „one shot“ Zellen zur chemischen Transformation ($\text{cfu}=1 \times 10^8$ - $5 \times 10^9/\mu\text{g}$, Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

XL-10 Epicurian Coli Ultracompetent

Ultra-kompetente Zellen zur chemischen Transformation ($\text{cfu} \geq 5 \times 10^9/\mu\text{g}$, Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

TOP10F'

Kompetente Zellen zur chemischen Transformation ($\text{cfu}=1 \times 10^8$ - $5 \times 10^9/\mu\text{g}$). Dieser Stamm überexprimiert den Lac-Repressor (*lacIq*-Gen) für eine besonders effektive Unterdrückung des lac-Promotors. Für eine blau/weiß-Selektion, vermittelt durch das LacZ Protein wird IPTG und X-GAL in den Agarplatten benötigt (Invitrogen, Karlsruhe).

XL-10 Epicurian Coli Viraport fetal brain cDNA-Library

E. coli mit $5,9 \times 10^9$ cfu/ml, transformiert durch pFB-Viraport fetal brain. Die Zahl der unabhängigen Klone beträgt ca. $3,1 \times 10^6$, die durchschnittliche Grösse der cDNA-Inserts etwa 1,6 kb.

2.1.7 Spezialsoftware

Axiovision 3.0, 3.1 und 4.0

CellQuest und CellQuest Pro

Endnote 6.0

Gene Construction Kit 2.5

IPLab 4.0

KyPlot

LSM 510

MacVector 6.5.1

Prism 2.0b für Mac

Quantity One 4.2.1

Simplicity 2.0R1

Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos

BD Biosciences, Düren

Niles Software, USA

Textco-SciQuest, USA

Scanalytics, Fairfax, USA

Kyence Inc. Tokyo

Carl Zeiss, Göttingen

Accelrys, SanDiego, USA

GraphPad, SanDiego, USA

Biorad, München

Berthold Detection Systems,

Pforzheim

2.1.8 Spezialgeräte

Cell Observer			Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Filtersatz-Bezeichnung (und Zeiss-Nr.)	Anregungsbereich und Strahlteiler in nm	Emissions-Bereich		
Bleach „BL01“	510-560 FT 570			
Red „00“	530-585 FT 600	LP 615		
CFP „47“	436/20 FT 455	BP 480/40		
YFP „46“	500/20 FT 515	BP 535/30		
FRET „48“	436/20 FT 455	BP 535/30		
DAPI	360/40 FT400	BP 460/50		
Dsred „15“	546/12 FT 580	LP 590		
Sg143GFP	475/40 FT 500	BP 530/50		
Orange	545/25 FT 570	BP 605/70		

Tabelle 2.1: Verwendete Filtersätze im Zeiss CellObserver.

Objektiv	Numerische Apertur, Phase	Imersion	Anwendung:
Plan Achromat 20x	0,75	Luft	Screening (96-Loch)
LD Achroplan 20x	0,4 Ph2	Luft	Screening (96-Loch)
Plan Neofluar 10x	0,3 Ph1	Luft	Screening (96-Loch)
LD Achroplan 40x	0,6 Ph2	Luft	6-, 12- Loch Platten
Plan Neofluar 40x	1,3 Ph3	Öl	Fusionen, Lokalisation
Plan Achromat 63x	1,4 Ph3	Öl	Lokalisationsstudien
α-Plan Fluor 100x	1,45	Öl	Lokalisation

Tabelle 2.2: Verwendete Objektive am Zeiss CellObserver.

FACScalibur Durchflußzytometrie BD Biosciences, Düren
 Anregungslaser: 488nm, 15mW
 Fluoreszenz-Detektoren: FL-1 (BP 530/30)
 FL-2 (BP 585/30)
 FL-3 (LP 650)
 Angeschlossenes Sorting- und Konzentrierungs-Modul

Celsius XEON600 Auswertungscomputer für Fujits Siemens
 Mikroskopie

LSM 510 Konfokales Mikroskop Carl Zeiss, Jena
 Anregungslaser: 488 nm, 543 nm
 Emissionsfilter: mehrfach variierbar

Objektiv	Numerische Apertur, Phase	Imersion	Benutz für:
Plan Neofluar 40x	1,3 Ph3	Öl	FRAP
Plan Neofluar 63x	1,25 Ph3	Öl	FRAP

Tabelle 2.3: Verwendete Objektive am Zeiss LSM 510.

Orion Luminometer Berthold, Pforzheim

„ProQuaLo“ Mikroskop und Zusatzkomponenten

Carl Zeiss, Jena, u.a.

Objektiv	Numerische Apertur, Phase	Imersion	Anwendung:
32x		Luft	Timelapse-Experimente

Tabelle 2.4: Verwendete Objektive am Zeiss Axiovert 135 TV (Proqualo).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken

Kultivierung von eukaryotischen Zellen und Zellzahlbestimmung

Alle Zelllinien wurden bei 37°C in mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Als Medium wurde DMEM mit, falls nicht anders angegeben, 10% FKS und 1% AB/AM-Lösung verwendet. Bei allen Kulturen handelte es sich um adhärenz wachsende Zellen, die zwei bis dreimal pro Woche umgesetzt wurden. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturgefäße gelöst. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien, wurden die Zellen in Verdünnungen von 1:5 (85HG66) bis 1:20 (HeLa-Tat) in frischem Medium aufgenommen und in neue Zellkulturgefäße gesät.

Für Experimente, in denen eine bestimmte Zellzahl eingesetzt werden sollte, wurden die Zellen ausgezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl mit der Zählkammer (Fast Read 106, Madaus) wurden 10 µl der Zellsuspension verwendet. Unter dem Lichtmikroskop konnte die Anzahl der Zellen pro ml bestimmt werden (Anzahl der Zellen in einem Kleinquadrat x 10⁴).

Die in Tabelle 2.5 eingesetzten Zellzahlen haben sich für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten bewährt.

	HeLa-Tat	HeLa	85HG66	U138
35 mm/6-Loch	2,5x10 ⁴	2,5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴
12-Loch	1x10 ⁴	1x10 ⁴	2x10 ⁴	3x10 ⁴
96-Loch	5x10 ³	5x10 ³	7,5x10 ³	1x10 ⁴

Tabelle 2.5: Zellzahlen verschiedener Zelllinien in Kulturschalen.

Auftauen und Einfrieren von Zellen

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden bei RT aufgetaut, in vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und die Zellsuspension in Kulturflaschen überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumswechsel. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen expandiert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA abgelöst und nach Zellzahlbestimmung in 50 ml Falcon Röhrchen 3 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium resuspendiert und in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in Nunc-Cryo Röhrchen überführt. Im Kryostaten (oder falls nicht vorhanden in Styropor-Schachteln) wurden die Zellen auf -20°C abgekühlt und anschließend ÜN bei -80°C gehalten. Die Zellen konnten in flüssigem Stickstoff bei -196°C dauerhaft gelagert werden.

Bestimmung der Lebensfähigkeit eukaryotischer Zellen

Zur Bestimmung der Toxizität von Substanzen oder exprimierter Proteine für eukaryotische Zellen wurde der CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay der Firma Promega benutzt, der sich für das 96-Loch Zellkulturplatten Format eignet. Dieser Test nutzt die Tatsache, dass der Anteil an ATP in lebenden Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen innerhalb einer Zellpopulation nahezu konstant ist. Dieses ATP wird als notwendiger Kofaktor einer Luziferin/Luziferase-Reaktion nachgewiesen und man erhält eine Lichtemission, die als relativer Wert zur Kontrolle Rückschlüsse auf eine beeinträchtigte oder weitgehend normale Proliferation der Zellen erlaubt. Abweichungen im ATP-Gehalt einer Zellpopulation ergeben sich durch verringerte Zellzahl, sowie beeinträchtigtem Energiestatus der einzelnen Zellen, was jeweils beispielsweise durch toxische Substanzen ausgelöst werden kann. Obwohl andere, noch genauere, Tests zur Bestimmung der Zytotoxizität existieren, haben sich die sogenannten Proliferations-Tests (zu denen auch der bekannte MTT-Test gehört) als Nachweis für die meisten Experimente gut bewährt.

Für den Test wurden die zu testenden Zellen in weiße 96-Loch Zellkulturplatten der Firma NalgeNunc ausgesät und nach 24 h Inkubation mit der zu testenden Substanz oder dem zu testenden Expressionsplasmid behandelt. Nach weiteren 24 h wurde eine auf RT equilibrierte Lösung des CellTiter-Glo Substrates, aufgelöst in CellTiter-Glo Puffer, auf die Zellen pipettiert und die Zellen zwei Minuten lang auf einem

Schüttler lysiert. Nach weiteren 10 min Inkubationszeit wurden die Lichtemission in einem Luminometer für 96-Loch Platten mit einer halben Sekunde Integrationszeit gemessen. Nach diesen 10 min Inkubationszeit blieb die Emission an Licht aus der Luziferin/Luziferase-Reaktion über 300 min weitgehend konstant ($t_{1/2}$ =ca. 500 min), was eine problemlose Messung aller Löcher der Platte ermöglichte. Es wurden für alle Tests mit diesem System jeweils vier Parallelen durchgeführt, um die Schwankungen beim Aussäen der Zellen mit der Mehrschrittpipette in 96-Loch Platten auszugleichen. Die erhaltenen Lichtemissionswerte aus den Messungen waren hoch reproduzierbar und bezogen auf die Zahl der eingesetzten Zellen über einen wesentlich weiteren Bereich linear, als beispielsweise bei einem entsprechenden MTT-Test (Daten nicht gezeigt).

Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid DNA mittels FuGENE6

Transfektionsreagenz

Transfektionen wurden mit dem FuGENE6 Transfektionsreagenz von Roche durchgeführt. Die Transfektionseffizienz liegt bei dieser Methode zwischen 10% bei 85HG66 und 80-90% bei HeLa-Tat. Über das Prinzip der DNA-Aufnahme in die Zellen liegen keine detaillierten Informationen vor, jedoch kann u.a. von einer Veränderung der Zellmembranen durch FuGENE6 ausgegangen werden.

Das gewünschte Plasmid wurde in ein Eppendorf-Gefäß, oder bei größeren Ansätzen in Mehrloch Platten, vorgelegt. Sollten mehrere Plasmide gleichzeitig transfiziert werden (Ko-Transfektion), so wurde darauf geachtet, die Plasmide gut miteinander zu durchmischen, um ungleichmäßige Transfektion der Zellen mit unterschiedlicher Plasmid-DNA zu vermeiden.

In ein zweites Gefäß wurden (für die Transfektion in einem 35 mm Schälchen) 200 μ l Medium (DMEM) ohne FKS vorgelegt. Pro μ g zu transfizierender DNA wurden 2,5 μ l FuGENE6 in das Medium gegeben und nach 5 min Inkubation auf die DNA-Lösung getropft. Die Mischung wurde 15 min inkubiert und dann in das Medium zu den Zellen gegeben. Durch leichtes Schwenken der Kulturgefäße wurde für eine gleichmäßige Verteilung gesorgt. Die Zellen wurden dann wie gewohnt inkubiert und nach gegebener Zeit (in der Regel 24-48 h) weiter untersucht. FuGENE6 schien dabei das Wachstum und die Vitalität der verwendeten Zelllinien nicht merklich zu beeinflussen.

Für einige Experimente wurden die Zellen 6 h nach erfolgter Transfektion mit PBS gewaschen und mit neuem Medium versorgt und auf diesem Weg von überschüssigem Transfektionsreagenz und DNA befreit.

Um eine bessere Vorstellung von den zur Transfektion einzusetzenden Mengen an DNA zu bekommen, wurden mit GFP-Expressionsplasmid transfizierte Zellen durch FACS-Analyse mit standardisierten GFP-markierten Beads (BD Biosciences, Heidelberg) verglichen. Daraus wurden die Abhängigkeit der GFP-Synthese von der Menge transfizierter DNA nach einer bestimmten Zeit (24 h) nach Transfektion bestimmt.

Dabei stellte sich heraus, dass die Transfektion von 500 ng pCsRevsg143 in HeLa Zellen nach 24 h zu einer Expression weit außerhalb des linearen Meßbereiches des FACS-Gerätes führte (mehr als 5×10^6 Moleküle). 100 – 200 ng Plasmid erzeugten eine GFP-Fluoreszenz, die mit etwa $1-2 \times 10^6$ Molekülen bestimmt werden konnte.

Abbildung 2.1 zeigt die am FACS mit Hilfe der Beads erstellte Eichkurve. Mit den dabei verwendeten Geräteeinstellungen wurden später mit pCsRevsg143 transfizierte oder stabil GFP-Fusionsprotein exprimierende Zellen analysiert. In Abbildung 2.2 ist das Ergebnis der Quantifizierung gezeigt, wie es nach einem „Fitting“ (mit der Software Prism) erzeugt wurde.

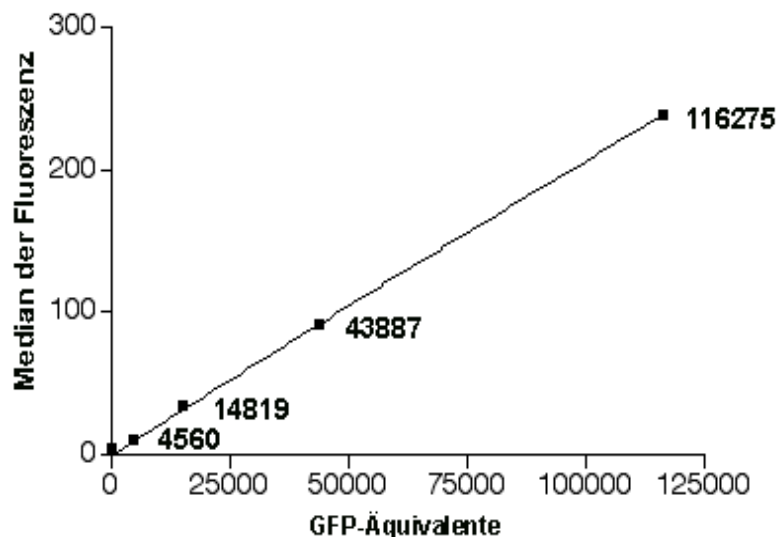


Abbildung 2.1: Eichkurve, die aus den Medianen von 5 Populationen EGFP-markierter Beads berechnet wurde. Die Zahlen an der Gerade geben die Anzahl der EGFP-Moleküle der Bead-Population an.

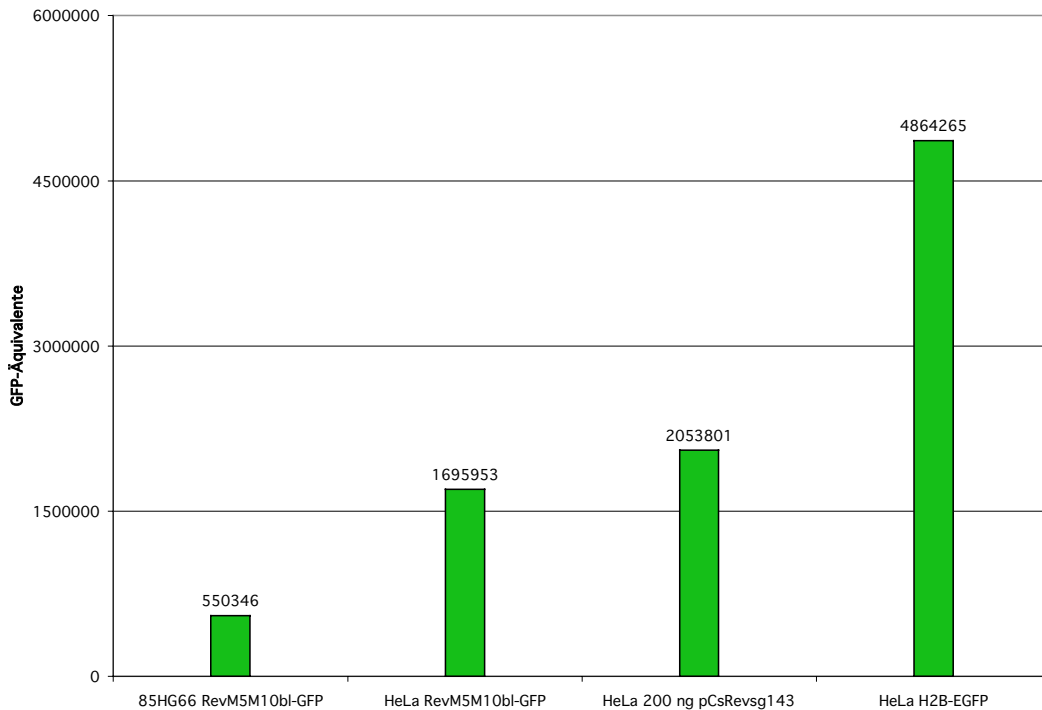


Abbildung 2.2: Zahl exprimierter GFP-Fusionsprotein Moleküle in 85HG66 und HeLa Zellen. Zur Ermittlung der Zahl wurde die Autofluoreszenz der Zellen substrahiert. Die Bestimmung ergab, daß bei Transfektion von 200 ng pCsRevsg143 in HeLa Zellen (35 mm Schale) nach 24 h im Median etwa so viele GFP-Moleküle vorhanden waren wie in der stabilen Zelllinie HeLa RevM5M10bl-GFP. Eine ähnlich hergestellte stabile 85HG66 Zelllinie exprimiert nur 1/3 der GFP-Moleküle, die Zelllinie HeLa H2B-EGFP hingegen (Kanda et al) mehr als das 2,5 fache.

Die Optimierung der verwendeten DNA Menge war sowohl für die phänotypische Untersuchung von GFP-gekoppelten Rev-Mutanten, die Untersuchung der Expression durch Westernblot, als auch für funktionelle Untersuchungen von großer Bedeutung, da besonders zu hohe Mengen von Expressionskonstrukten zu artifiziellen Ergebnissen führen können.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben sich die in der Tabelle 2.6 aufgeführten Mengen an DNA bewährt. Die Mengen gelten für analytische Experimente und Plasmid-DNA mit CMV-getriebenen Genen, wie z.B. pFred143 oder pCsRevsg143. Für Plasmide mit schwächeren Promotoren, oder um Zelllinien stabil mit bestimmten Konstrukten zu transfizieren, wurden die Mengen in einzelnen Fällen auf ein Vielfaches erhöht.

	HeLa-Tat	85HG66
35 mm Schale	100-200 ng	250-500 ng
1 Well einer 96-Loch Platte	10-25 ng	50-100 ng
10 cm Schale	1 μ g	2 μ g

Tabelle 2.6: Bewährte DNA-Mengen von sg143-GFP-Expressionsplasmid für zwei Zelllinien und unterschiedliche Kulturgefäße.

Herstellung stabiler Zelllinien

Um Zelllinien stabil mit gewünschten Konstrukten zu transfizieren, wurden in eine 60 mm Schale ausgesäte Zellen mit 500 ng - 3 μ g Plasmid-DNA transfiziert.

Für eine sicherere Integration des Konstruktes in die genomische DNA der Zellen, wurde das Plasmid teilweise vorher durch den Einsatz eines Restriktionsenzym linearisiert.

Die Zellen wurden nach der Transfektion mindestens 3 (HeLa, HeLa-Tat) bis 7 (85HG66) Tage kultiviert und, sofern eine Antibiotika-Resistenz auf dem Plasmid vorhanden war, dann mit entsprechendem Antibiotika-haltigem Medium behandelt. In allen Fällen wurden die Zellen dann über mindestens zwei weitere Passagen expandiert.

War die Selektion nach der Expression fluoreszierender Proteine möglich und gewünscht, so wurden die Zellen nun geerntet und in PBS einem Sortiervorgang am FACS-Gerät unterzogen und die angereicherte Population weiterkultiviert. Die unsortierte oder die angereicherten Population von Zellen wurde nach zwei weiteren Passagen geerntet und vereinzelt in 96-Loch Platten überführt, wo Zell-Klone heranwachsen konnten. Diese wurden weiter expandiert und dann mit geeigneten Mitteln (Fluoreszenzmikroskopie, funktionelle Tests) auf die stabile Integration des Konstrukts überprüft.

Sobald möglich wurden Aliquots von polyklonalen und monoklonalen Zellpopulationen eingefroren.

2.2.2 FACS-Analyse

Durch eine Analyse mit einem „Fluorescence Activated Cell Sorter“ (FACS) kann eine Vielzahl von Zellen einzeln auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht werden. In einem FACS-Gerät werden durch einen Laserstrahl an Antikörper gekoppelte oder in Nukleinsäuren interkalierende Farbstoffe oder exprimierte fluoreszierende Proteine zur Emission angeregt und diese Fluoreszenz mit Detektoren erfasst und an einen Computer weitergeleitet. Als wichtige primäre Parameter werden die Größe der Zellen durch das sogenannte Vorwärts-Streulicht (FSC), d.h. die Ablenkung des Lasers nach vorne, und die Granularität durch das Seitwärts-Streulicht (SSC), d.h. die Streuung des Lasers zur Seite, erfasst. Die so ermittelten Daten können als Histogramme oder als Punkt-Plots in der Auswertungs- und Aufnahme-Software dargestellt werden. Mit den Informationen der Größe und Granularität der Zellen kann eine homogene Zellpopulation zur Auswertung ausgewählt werden, die möglichst frei von Zell-Debris, Zell-Dubletten, mehrkernigen Riesenzellen, apoptotischen Zellen oder ähnlichen Störfaktoren ist. In der so bestimmten Population werden die Fluoreszenzeigenschaften einzelner Zellen gemessen und nach unterschiedlichen Kriterien, wie Gesamt-Fluoreszenz oder Fluoreszenz-Verteilung, ausgewertet.

Mit dem zur Verfügung stehenden FACSCalibur Gerät können in der Grundausstattung beispielsweise die fluoreszierenden Proteine GFP, YFP, DsRed und mRFP1 angeregt und detektiert werden, desweiteren natürlich eine Vielzahl von anderen Fluorochromen wie FITC, Cy3, Propidium Iodid oder ähnliche.

Für typische FACS-Experimente im Rahmen dieser Dissertation wurden Zellen 24 - 48 h vor dem Experiment mit Expressionskonstrukten für fluoreszierende Proteine transfiziert. Für die Experimente war es essentiell, mit der Menge an exprimiertem fluoreszierendem Protein nicht den Sättigungsbereich der Fluoreszenzdetektoren zu erreichen (siehe Abschnitt Transfektionen). Für die Analyse wurden die Zellen trypsiniert und gewaschen, danach in PBS aufgenommen und kurzfristig bis zur FACS-Analyse bei 4°C gelagert. In Ausnahmefällen wurden die Zellen nach der Ernte in 2% Paraformaldehyd-Lösung fixiert, um eine spätere Analyse zu ermöglichen. Es wurde darauf geachtet, nicht Experimente mit fixierten und unfixierten Zellen direkt miteinander zu vergleichen, da sich die ermittelten Zelleigenschaften durch den Fixiervorgang veränderten.

Je nach Dichte der Zellsuspension wurden die Zellen mit FACSFlow verdünnt oder unverdünnt in PBS analysiert. Für eine typische Analyse wurden mindestens 5×10^5 - 1×10^6 Zellen verwendet, soweit vorhanden.

Sollten die Zellen mit Hilfe des FACS-Gerätes sortiert werden, wurde darauf geachtet, dass die maximale Durchflußrate 800 Zellen pro Sekunde nicht überschritt und alle Puffer im System des Gerätes frei von Azid waren.

Grundsätzlich wurden vor einer Serie von Experimenten am FACS-Gerät Proben vorbereitet, die als Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle für die Kalibration dienten, d.h. Zellen die die erwarteten Fluoreszenzen in allen Kombinationen konstitutiv zeigten. Anhand dieser Proben wurden die Einstellungen der Detektor-Sensitivität und der Kompensationen der Fluoreszenzkanäle vorgenommen. Fluoreszenzen in Kanal 1 (FI-1) wurden gegen Kanal 2 (FI-2) (und umgekehrt), FI-2 gegen FI-3 (und umgekehrt) so kompensiert, dass Proben, die nur eine Fluoreszenz zeigen möglichst wenig Signal in anderen Kanälen zeigten. Die Detektor-Sensitivität bzw. Verstärkung wurde so eingestellt, dass sowohl nicht oder schwach fluoreszierende Zellen als auch stark fluoreszierende Zellen einer Population gleichzeitig in einem Plot mit logarithmischer Darstellung gesehen werden konnten. Wenn ein signifikanter Teil einer Zellpopulation außerhalb des Plots lag, wurden quantitative Auswertungen nicht mehr vorgenommen. Abbildung 2.3 zeigt einen Plot mit Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, sowie einen Fluoreszenz-Plot.

Weiterführende Anleitungen, sowie Informationen zur Funktionsweise des FACSCalibur Gerätes, mit dem die Experimente durchgeführt wurden, können auf der Cell Quest Software-CD abgerufen werden.

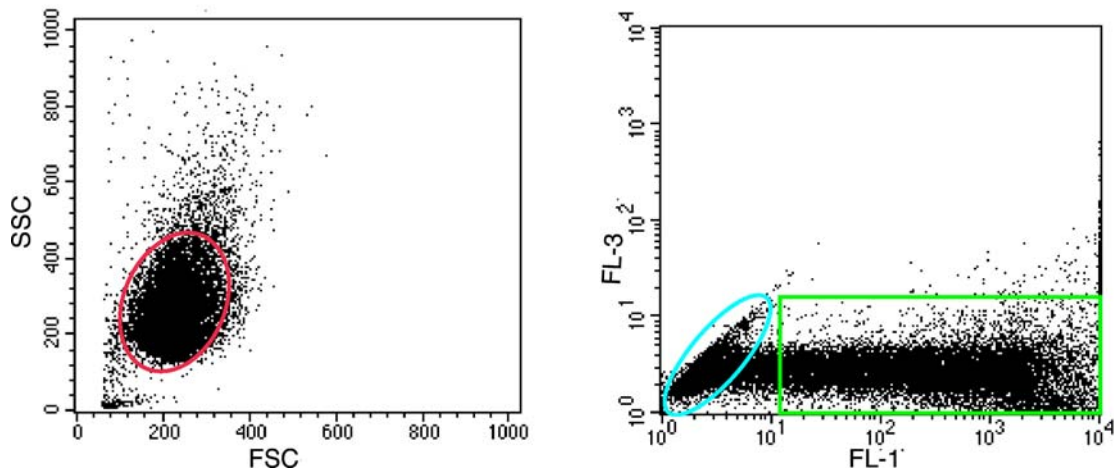


Abbildung 2.3: FACS-Plots von HeLa Zellen, die Rev-GFP exprimieren. **Links:** Plot mit Vorwärts (x-Achse) und Seitwärts (y-Achse)-Streulicht. Jeder Punkt (dot) entspricht einer einzelnen Zelle, bzw. einem Partikel. Rot umrandet ist die als homogen anzusehende Zellpopulation, die für die Auswertung verwendet werden kann. Die umliegenden „dots“ stellen Zelltrümmer (nahe dem Ursprung des Plots) bzw. ungewöhnliche/unnatürliche Zellen dar. **Rechts:** Plot mit grüner Fluoreszenz (FL-1) bzw. roter Fluoreszenz (FL-3). Die Population praktisch nicht fluoreszierender Zellen ist blau markiert. Die eindeutig als grün zu bezeichnende Population ist grün umrandet. Oberhalb des grünen Rechtecks liegen Zellen, die aufgrund der Stärke ihrer Fluoreszenz auch ein leichtes Signal im roten Kanal zeigen (FL-3), ohne tatsächlich rot zu sein (sog. „Crosstalk“).

2.2.3 Auswertung von FACS-Experimenten

Die Auswertung der aus FACS-Analysen gewonnenen Daten konnte grundsätzlich auf zwei verschiedene Arten geschehen. In der Regel kam es bei den durchgeführten Experimenten auf das Verhältnis von grüner und roter Fluoreszenz in einer Zellpopulation an, wobei die grüne Fluoreszenz nach Transfektion normalerweise konstitutiv von den Zellen exprimiert werden konnte und als Kontrolle der Transfektionseffizienz diente. Daher wurde zur Auswertung einerseits die Zahl der Zellen ermittelt, die innerhalb der grünen Zellpopulation auch deutliche rote Fluoreszenz zeigten. Andererseits wurde innerhalb einer Zellpopulation, die grüne und rote Fluoreszenz zeigte, der jeweilige Median der roten und grünen Fluoreszenzstärken ermittelt und ein Quotient gebildet. Beide Auswertungsmethoden fanden für verschiedene Fragestellungen Anwendung. Die Daten eines typischen

Experiments, sind so, wie sie durch die Software Cell Quest dargestellt werden, in Abbildung 2.4 gezeigt. Die dazugehörige Auswertung nach den beiden erwähnten Methoden in Tabelle 2.7.

Reporter-positiv (rot/grün)	Transfiziert (grün)	Anteil an Reporter-positiven Zellen in der transfizierten Population
619	5797	10,67 %
Median der roten Fluoreszenz	Median der grünen Fluoreszenz	Quotient grüner/roter Fluoreszenz- Median
39,60	1144,44	28,9

Tabelle 2.7: Auswertung eines FACS-Experimentes (s. Abb. 2.4) nach zwei verschiedenen Methoden. Oben nach der Methode des Anteils an Reporter-positiven Zellen, unten nach der Methode des Quotienten der Fluoreszenz-Mediane.

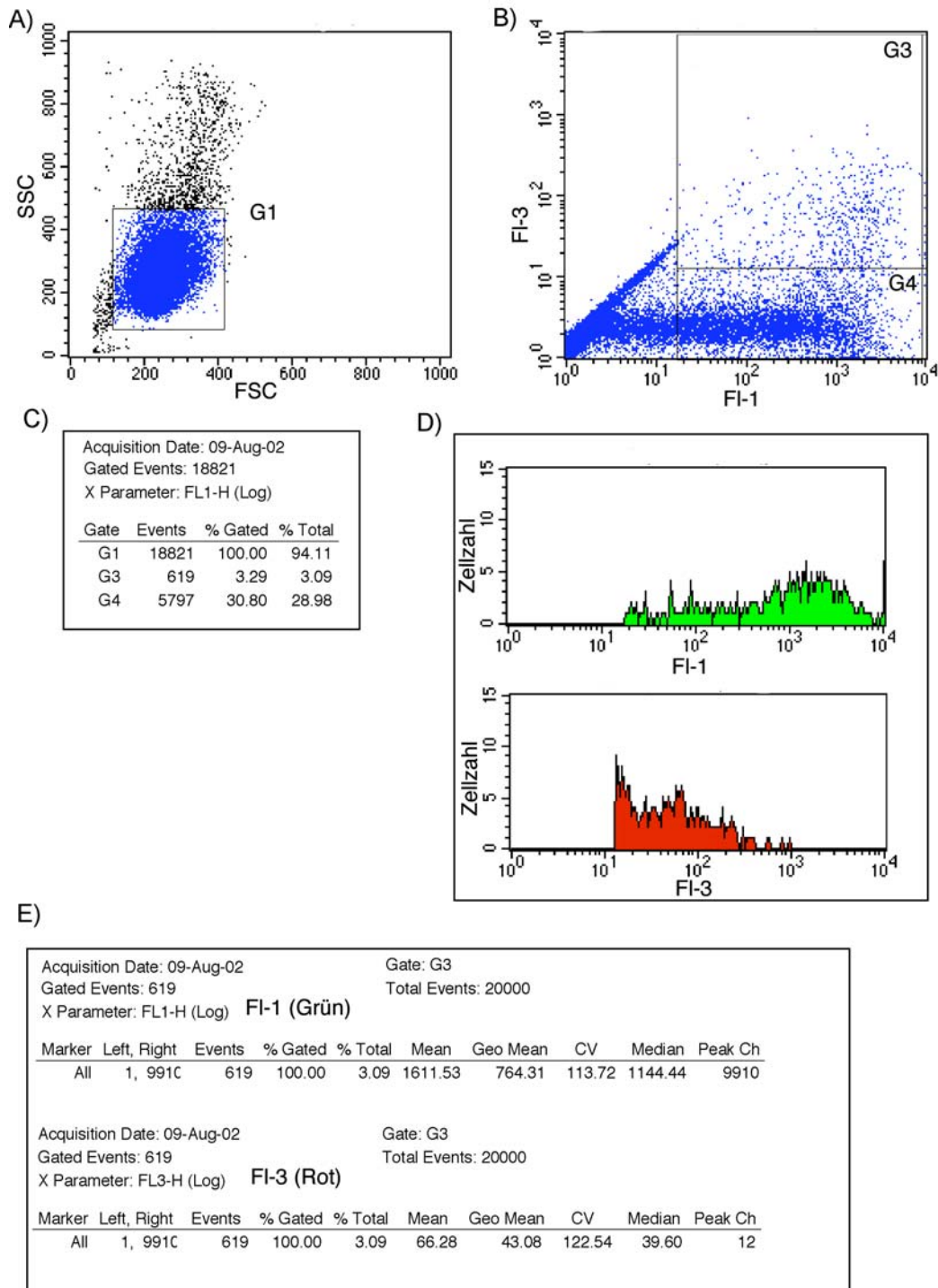


Abbildung 2.4: Rohdaten aus einem typischen FACS-Experiment. **A)** Dot Plot mit Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht zur Ermittlung einer homogenen Zellpopulation, die mit einem „Gate“, „G1“, markiert wurde (in blau). Der Fluoreszenz-Plot für rote (FI-3) und grüne Fluoreszenz (FI-1) in **B)** zeigt nur die Zellpopulation die in A) mit „G1“ selektiert wurde. Die Population, die nahezu alle transfizierten Zellen umschließt, wurde mit „G4“ markiert, die rot-grün doppelt fluoreszierenden Zellen, innerhalb G4, mit „G3“. **C)** zeigt in einer Statistik, wie viele Zellen einer bestimmten, festgelegten Population („Gate“) angehören. **D)** Histogramme zur Ermittlung des grünen (FI-1, oben) und roten (FI-3, unten) Fluoreszenz-Medians. Die Histogramme zeigen nur die Zellen die in B) mit „G3“ markiert wurden. **E)** In den Histogramm-Statistiken (die sich auf C) beziehen) sind sowohl für rote (unten), als auch grüne (oben) Fluoreszenz der Mittelwert, Median und weitere Daten ablesbar.

2.2.4 Durchführung von Rev-Funktionsanalysen

Mit Hilfe der generierten Reporterkonstrukte wurden Rev-Funktionsanalysen im unterschiedlichen Maßstab durchgeführt. Prinzipiell konnten die Analysen entweder mit der Reporter-Zelllinie HeLa-Tat ROD (red on demand) oder durch transiente Transfektionen mit dem Reporter-Konstrukt pLRedINSR und seinen Derivaten durchgeführt werden.

Zum Ablauf des Assays mit der Zelllinie HeLa-Tat ROD:

Zellen wurden in geeignete Zellkulturgefäße ausgesät, dies konnten Platten im 6-, 12-, oder 96-Loch Format sein, sowie Schalen mit 35, 60 oder 100 mm Durchmesser. Es wurden dafür Zellzahlen benutzt, wie für HeLa-Tat Zellen bereits weiter oben beschrieben. Sollte der inhibitorische Effekt einer Substanz oder eines Plasmids getestet werden, wurde nach 24 h dieses Agens zu den Zellen gegeben. Wenn der Assay nur dazu dienen sollte, die Funktionalität verschiedener Rev-Mutanten zu testen, so entfiel dieser Schritt. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen, mit neuem Medium versorgt und nun, wie bereits beschrieben, mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für Rev, Rev-GFP oder Rev-Mutanten kodierten. Die Menge des transfizierten Plasmids richtete sich nach dem benutzten Kulturgefäß bzw. der Menge der Zellen. Für 96-Loch Platten wurden 10 ng, für 12-Loch 50 ng und für 6-Loch 100 ng Expressionsplasmid benutzt.

Nach weiteren 24 h wurden die Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet, wie beschrieben geerntet und einer FACS-Analyse unterzogen.

Zum Ablauf des Assays mit transienter Transfektion:

Die gewünschten Zellen wurden in geeignete Zellkulturgefäße ausgesät, dies konnten Platten im 6-, 12-, oder 96-Loch Format sein, sowie Schalen mit 35, 60 oder 100 mm Durchmesser. Es wurden dafür Zellzahlen benutzt, wie für die entsprechenden Zelllinien bereits weiter oben beschrieben. Sollte der inhibitorische Effekt einer Substanz oder eines Plasmids getestet werden, wurde nach 24 h dieses Agens zu den Zellen gegeben bzw. die Zellen mit dem Plasmid transfiziert. Wenn der Assay nur dazu dienen sollte, die Funktionalität verschiedener Rev-Mutanten zu testen, so entfiel dieser Schritt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit neuem Medium versorgt und die notwendigen Reporter-Plasmide und Rev-Expressions-

Plasmide transfiziert. Wurden für die Versuche nicht HeLa-Tat Zellen verwendet, musste ein geeignetes Tat-Expressionsplasmid zugegeben werden.

Unten stehende Tabelle 2.8 zeigt einen typischen Transfektionsmix für drei häufig verwendete Zelllinien im 6-Loch Format. Die Einhaltung dieser Mengen war essentiell, da eine zu geringe Expression die Auswertbarkeit der FACS-Analyse beeinträchtigte und eine zu starke Expression die technischen Möglichkeiten des FACS-Gerätes überstieg.

Nach 24 h wurden die Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet, wie beschrieben geerntet und einer FACS-Analyse unterzogen.

Zelllinie	HeLa	U138 MG	85HG66
Rev-Plasmid pCsRevsg143 (bzw. pFred143)	100 ng	200 ng	250 ng
Reporter-Plasmid pLRed(2xINS)R	1 µg	1.5 µg	1.5 µg
Tat-Plasmid pPL3Tat bzw. pCTat	100 ng bzw. 200 ng	200 ng bzw. 400 ng	200 ng bzw. 400 ng

Tabelle 2.8: Zu transfizierende Mengen an Plasmiden im transienten Reporter-Assay in den drei Zelllinien HeLa, U138 MG und 85HG66.

Abbildung 2.5 zeigt noch einmal schematisch den Ablauf der beiden Reporter-Assay Varianten. Gelegentlich konnte von den im Protokoll angegebenen Zeitabständen etwas abgewichen werden (besonders bei zu hoher Auslastung des FACS-Gerätes), ohne große Beeinträchtigungen der Auswertbarkeit zu riskieren. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden aber niemals mit anderen Ergebnissen direkt verglichen, sondern dienten immer nur einer qualitativen Abschätzung der Funktion bzw. Inhibition, d.h. wurden nur im Bezug zur internen Kontrolle ausgewertet.

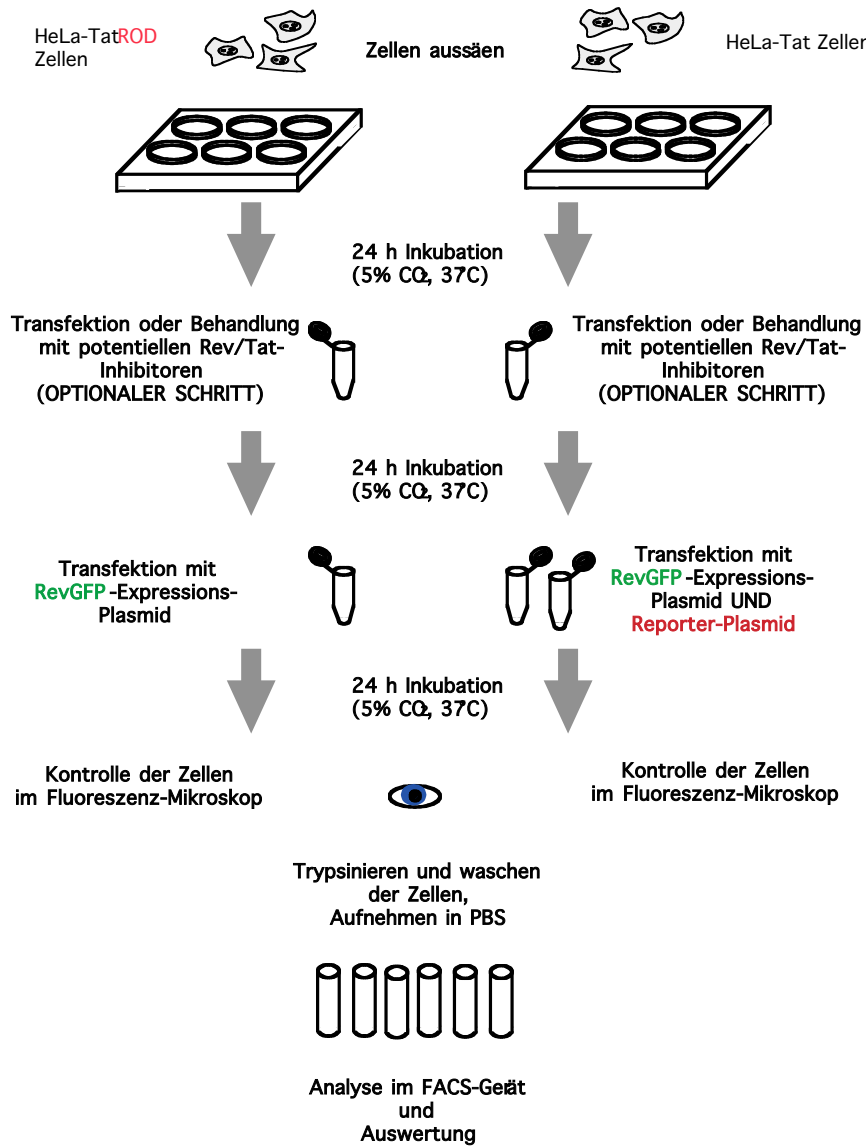


Abbildung 2.5: Schematischer Ablauf der beiden Varianten des Reporter-Assays.

2.2.5 Assay zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von INS-Regionen

Dieser Assay wurde grundsätzlich im 6-Loch Format mit HeLa-Tat Zellen durchgeführt. Er wurde stark in Anlehnung an den oben beschriebenen Reporter-Assay im transienten System durchgeführt, mit einigen Abwandlungen. Die ausgesäten Zellen wurden nach 24 h mit 100 ng pFred143 und dem zu testenden INS-haltigen Plasmid (z.B. pLRedINS5R) transfiziert. Die Menge an INS-Plasmid richtete sich nach der Größe bzw. dem Molekulargewicht des Plasmids und wurde stets auf 1 mg des Basiskonstrukts pLRedR standardisiert. Ein Plasmid, das also beispielsweise ein um 10% größeres Molekulargewicht besaß als pLRedR, wurde in 10% größerer Menge eingesetzt um Äquimolarität zu garantieren.

5-6 h nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen und mit neuem Medium versorgt. Dies verhinderte eine übermäßige Aufnahme von Expressionsplasmiden durch die Zellen und sicherte die Auswertbarkeit mittels FACS nach weiteren 24 h.

2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopie von fixierten oder lebenden Zellen, die fluoreszierende Proteine exprimierten, geschah großteils wie bereits in der Literatur beschrieben (Neumann, Afonina et al. 2001) . Zellen wurden in Kulturschälchen ausgesät, transfiziert und nach einer Inkubation von 24-48 h lebend oder fixiert mikroskopiert. Für eine Lebendbeobachtung wurden die Zellen in phenolrotfreiem Medium während des Vorgangs in einer Inkubationskammer auf dem Mikroskop gehalten. Vor oder während der Bildaufnahme wurden die Zellen teilweise noch mit unterschiedlichen Methoden behandelt. Dazu gehörte die Behandlung mit Leptomycin B, Durchführen von Zellfusionen oder das Bleichen von fluoreszierenden Proteinen mit einem Laser. Digitale Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 10x bis 63x mit einer gekühlten CCD-Kamera aufgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass zu vergleichende Bilder unter den gleichen Bedingungen, wie Filter, Belichtung und Vergrößerung aufgenommen wurden.

Photobleich-Experimente (FRAP) am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM)

Das irreversible Bleichen von fluoreszierenden Proteinen, die an zu untersuchende Proteine fusioniert wurden, und die Verfolgung der Fluoreszenzverteilung über die Zeit, erlaubt Studien von Proteindynamik in lebenden Zellen, die ohne diese Technik nicht zugänglich wären (Reits and Neefjes 2001). Diese Technik wird *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) genannt, obwohl der Ausdruck *Redistribution* an Stelle von *Recovery* angebracht wäre, da nicht die „Erholung“ der Fluoreszenz eines Fluorochroms beobachtet wird, sondern die Umverteilung von nicht fluoreszierenden und noch fluoreszierenden Signalen.

Hierbei wird ein zur Anregung bzw. zum Bleichen eines Fluorochroms geeigneter Laser mit hoher Intensität auf ein definiertes Areal der Zelle gerichtet und dabei das Fluorochrom irreversibel gebleicht, d.h. in seiner Fluoreszenz zerstört. Kurz vor diesem Vorgang, sowie in definierten Zeitintervallen danach, wurde die Fluoreszenz der betroffenen Zelle(n) mit geringer Laserintensität aufgenommen. Hierbei wurde beachtet, dass jeder Bleichvorgang in einer Zelle mit der Produktion von freien Radikalen einhergeht, die in der Lage sind die Zelle, besonders deren DNA, zu schädigen. Daher musste die Laserintensität für die Bildaufnahme und für den Bleichvorgang generell so gering wie möglich gehalten werden, um die Schädigung der Zelle auf ein absolut notwendiges Maß zu begrenzen. Die Zeitintervalle der Bildaufnahme, sowie die verwendeten Objektive, Filter und Laser richteten sich stark nach der zu beantwortenden Frage und dem experimentellen Aufbau.

Generell wurden die zu verwendenden Zellen in Glasboden-Schälchen ausgesät und mit entsprechendem Expressionsplasmid 24 h vor dem FRAP-Experiment transfiziert. Während des Experiments wurden die Zellen auf einem beheizten (37°C) Mikroskop-Tisch mit CO₂ -begaster (5%) Inkubationskammer gehalten. Für die Experimente wurden nie extrem schwach oder extrem stark exprimierende Zellen gewählt, um Artefakte aufgrund von zu schwachen Signalen oder von Aggregation durch Überexpression zu vermeiden.

Typische technische Einstellungen am Mikroskop für ein Experiment zum Bleichen von Rev-GFP waren wie folgt:

- Objektiv: 40x oder 63x Plan Apochromat
- Laser: Kr/Ar-Laser mit 488 nm Laserlinie, HFT 488, NFT 490, BP 505-530
- zum Bleichen:* 20 Wiederholungen auf der zu bleichenden Region bei 100% Transmission und 75% Gesamt-Laserintensität
- zur Bildaufnahme:* 2faches Averaging eines 12bit Bildes (512x512 Pixel Auflösung) bei 1% Transmission bei 75% Gesamt-Laserintensität

Die erhaltenen Bilddaten wurden in der Regel einer weiteren Quantifizierung der Fluoreszenz unterzogen (siehe unten), um die beobachtete Dynamik in einem Graphen darzustellen.

Quantifizierung von fluoreszierenden Proteinen in der Zelle

Die Quantifikation zellulärer Proteine nach Transfektion wurde grundsätzlich wie bereits beschrieben durchgeführt (Neumann, Afonina et al. 2001). Um objektive Einschätzungen treffen zu können, wie sich die Lokalisation von Proteinen, die mit fluoreszierenden Proteinen markiert wurden, in lebenden Zellen verhält, war eine Auswertung der Fluoreszenzintensitäten in einzelnen Zellkompartimenten notwendig. Diese konnte entweder eine Änderung der Fluoreszenzverteilung in Zellkompartimenten über die Zeit oder nach besonderen Behandlungen dokumentieren. Auch wenn der Anwendung dieser Methode natürliche Grenzen gesetzt sind (insbesondere beim Vergleich von Zelltypen mit sehr unterschiedlicher Morphologie), erlaubt sie doch in der Regel eine bessere Abschätzung der Realität, als eine Betrachtung mit dem bloßen Auge.

Zellen, die fluoreszierende Proteine stabil exprimierten oder mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert wurden, wurden nach geeigneter Zeit (i.d. Regel 24 h) mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Vor oder während der Bildaufnahme wurden die Zellen teilweise noch mit unterschiedlichen Methoden behandelt. Dazu gehörte die Behandlung mit Leptomycin B, Durchführen von Zellfusionen oder das Bleichen von fluoreszierenden Proteinen mit einem Laser. Es wurde stets ein Phasen-oder Interferenz-Kontrast Bild aufgenommen, sowie Fluoreszenzbilder mit für das Fluorochrom geeigneten Filtern und festen Belichtungszeiten für jeden Kanal. Die Abbildung 2.6 zeigt beispielhaft wie mit den

erhaltenen Bildern als Rohdaten eine computerbasierte Quantifizierung der Zellsignale durchgeführt wurde.

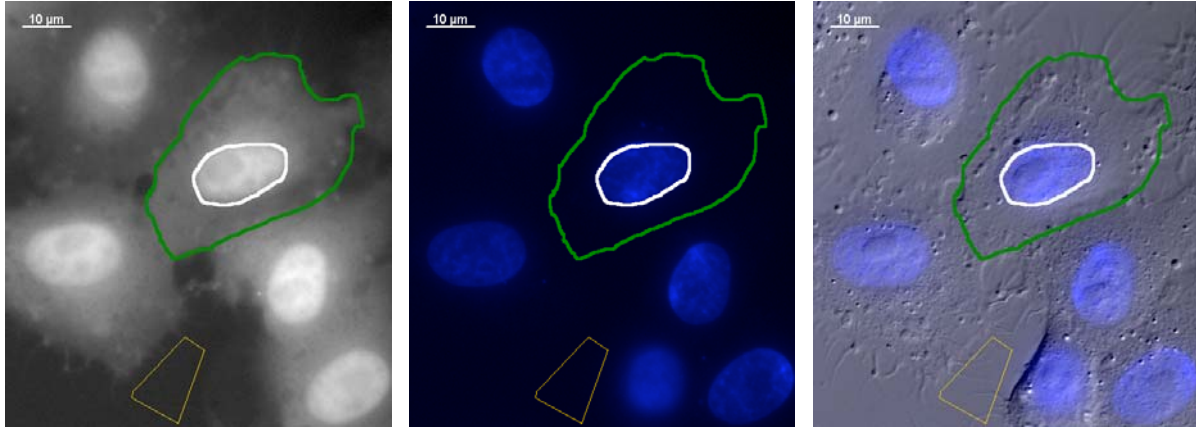


Abbildung 2.6: Beispiel für die Segmentierung der zu quantifizierenden Bilder anhand einer HeLa Zelle, die RevM5M10bl-GFP exprimiert. **Links:** GFP-Fluoreszenz. Grün eingegrenzt ist der Zellumriss (erstellt an Hand des Interferenzkontrastbildes, **ganz rechts**), weiß umrandet der Zellkern (Hoechst 33342-Kernfärbung (blau), **in der Mitte**) und das rechteckige, gelbe Segment definiert einen Hintergrundbereich an dem sich keine Zelle befindet. Die erstellten Segmente wurden auf das GFP-Fluoreszenzbild überlagert und die Quantifizierung der Fluoreszenz wie beschrieben durchgeführt.

Die Bilder der aufgenommenen Zellen wurden per Hand segmentiert, um die einzelnen Kompartimente getrennt quantifizieren zu können.

Diese Segmentierung konnte bei Bedarf auch durch einen Schwellenwert-Algorithmus durch das Programm automatisch durchgeführt werden, was erst eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung von einer großen Zahl an Bildern oder Zeitreihen möglich machte.

Durch das Programm IPlab wurde dann die Fluoreszenzintensität eines Segments (beispielsweise eines Zellkompartiments wie dem Zellkern) als Integral ermittelt und danach ein individueller Hintergrundwert abgezogen.

Je nach Bedarf wurde aus den Bilddaten auf diese Weise das Verhältnis der Fluoreszenzsignale im Kern zum Zytoplasma ermittelt.

2.2.7 Molekularbiologische Methoden

Plasmid-DNA (pDNA)-Isolierung aus Bakterien

Die hier beschriebene Methode wurde nach dem Protokoll der Qiagen GmbH, Hilden durchgeführt. Die erhaltene DNA wurde für Transfektionen und alle Standardmethoden der Molekularbiologie eingesetzt.

Über Nacht, bei 37°C gewachsene Bakterienkulturen wurden zentrifugiert und das Bakterienpellet durch eine alkalische SDS-Lösung aufgeschlossen. Proteine wurden durch saures Kaliumazetat ausgefällt. Die pDNA befand sich im Überstand und wurde über eine Anionenaustauscher-Säule (Qiagen GmbH, Hilden) zunächst gebunden. Durch zweimaliges Waschen wurde die gebundene pDNA von Verunreinigungen befreit und konnte anschließend eluiert werden. Die gefällte pDNA wurde in A.d. oder 1x Tris-Puffer pH 8,5 aufgenommen. pDNA wurde standardmäßig entweder in Maxi- und Minipräparationsansätzen isoliert.

Plasmidmaxipräparation

Für eine Plasmidmaxipräparation wurden 9 ml LB-Medium (100 mg/ml Ampicillin) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ÜN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit 1 ml der gewachsenen Vorkultur wurden 400 ml LB-Medium mit Ampicillin in einem 2 l Schikane-Kolben angeimpft und ÜN bei 37°C geschüttelt. Die Kulturen wurden am nächsten Tag 10 min bei 5000 x g zentrifugiert und das Bakterienpellet in 10 ml gekühltem Puffer P1 (mit 100 µg/ml RNase Endkonzentration) resuspendiert. Die Isolation der Plasmide wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Es konnten somit 50-500 µg pDNA aus einer 100 ml Bakterienkultur isoliert werden.

Alternativ zur Verwendung des Qiagen Kits wurde die Plasmidmaxipräparation mit dem Nucleobond Kit AX500 von Macherey-Nagel, Düren, durchgeführt, die auf dem gleichen Prinzip basiert und grundsätzlich vergleichbar durchgeführt wird.

Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die DNA- und RNA-Konzentrationen, ebenso wie die Reinheit der Präparationen, wurden mit Hilfe eines UV-Spektralphotometer bestimmt. Hierzu wurde die Absorption der DNA- bzw. RNA-Lösungen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Nach Sambrook (Sambrook 1989) entsprechen 50 µg/ml doppelsträngiger (ds) DNA bei 260 nm einer Absorption von 1. Beispielhaft sind in Abbildung 2.7 Messungen der DNA-Konzentrationen von 12 Miniprep DNA-Präparationen abgebildet. Zur Überprüfung der Reinheit des DNA-Materials wurde der Quotient A_{260}/A_{280} gebildet. Bei sehr reinen DNA-Präparationen liegt der Quotient zwischen 1,7 und 2. In Abbildung 2.8 sind die Messergebnisse zur Reinheit der in Abbildung 2.7 gezeigten DNA-Präparationen dargestellt.

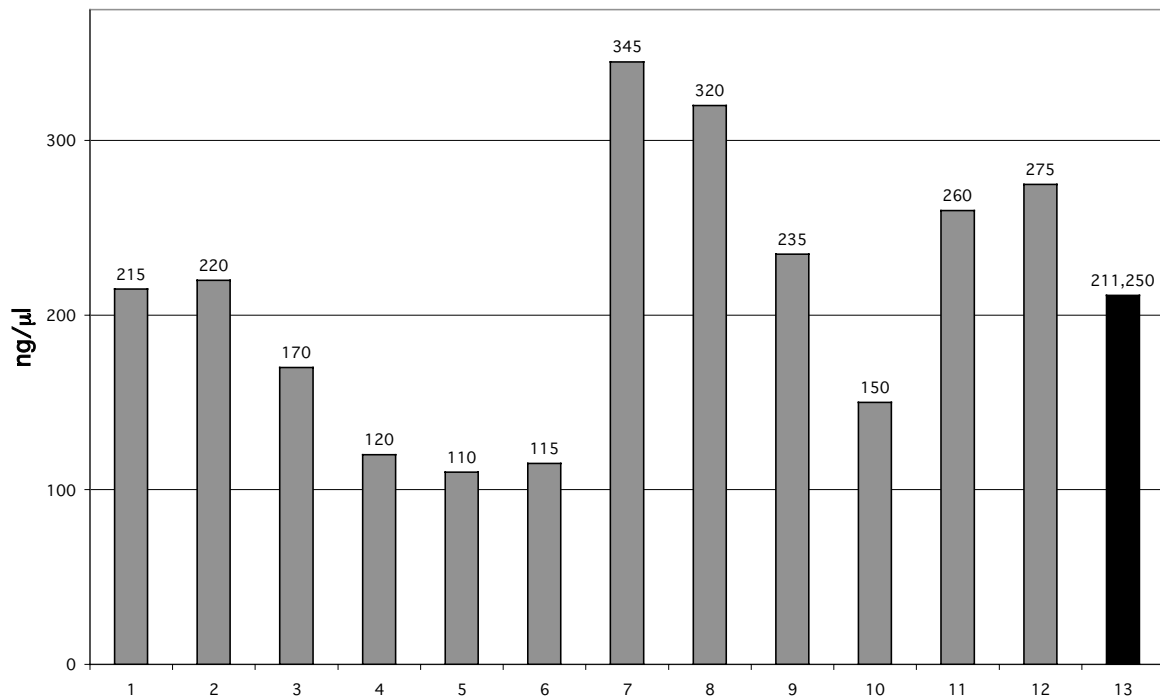


Abbildung 2.7: Plasmid DNA aus einer Mini-Präparation von einer cDNA-Bank („Viraport fetal brain“, Stratagene) im 96-Loch Format. Jeweils 3 µl von 12 zufällig ausgewählten Präparationen wurden mit 297 µl A.d. verdünnt und die DNA-Konzentration (in ng/ml) photometrisch bei 260 nm bestimmt. Es ist die bestimmte Konzentration der 12 Mini-Präparationen gezeigt (graue Balken) sowie die durchschnittliche Konzentration (schwarzer Balken).

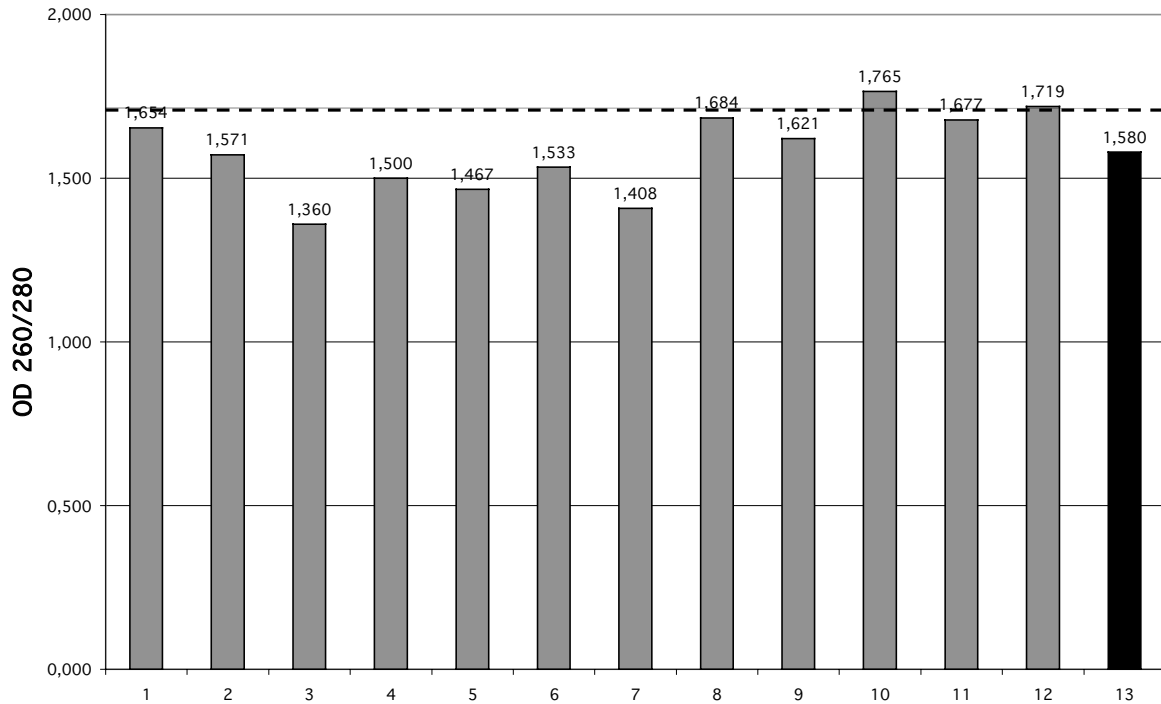


Abbildung 2.8: Plasmid DNA aus einer Mini-Präparation von einer cDNA-Bank („Viraport fetal brain“, Stratagene) im 96-Loch Format. Jeweils 3 μ l von 12 zufällig ausgewählten Präparationen (identische Proben wie in Abb. 1.1) wurden mit 297 μ l A.d. verdünnt und das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Es ist die OD 260/280 der 12 Mini-Präparationen gezeigt (graue Balken), sowie das durchschnittliche Verhältnis (schwarzer Balken). Die gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert für eine reine DNA-Präparation.

Plasmidminipräparation

Diese Methode wurde einerseits angewandt, um Plasmid DNA zu analytischen Zwecken zu gewinnen, und andererseits, um DNA von cDNA-Banken für Transfektionszwecke zu erhalten. Für ersteren Zweck wurde von einer Agar-Platte mit einer Impföse eine Bakterienkolonie gepickt und in 7 ml LB-Medium (mit 100 mg/ml Ampicillin) angeimpft. Nach ÜN Inkubation in einem 37°C-Schüttler wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension in Eppendorf-Reagenzgefäßen 5 min bei 4500 x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 300 μ l Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 μ l Puffer P2 wurde die Bakteriensuspension 5 min bei RT inkubiert und die Bakterien aufgeschlossen. Nach Zugabe von 300 μ l Puffer P3 wurden die Proben für 15 min auf Eis inkubiert um Proteine und genomische DNA auszufällen. Die ausgefällten Proteine wurden 15 min bei 25000 x g zentrifugiert, 600 μ l des Überstandes mit der Plasmid DNA in neue Eppendorf-Reagenzgefäße überführt. Die DNA wurde dann mit 500 μ l Isopropanol 15 min bei 25000 x g gefällt.

Das entstandene Pellet wurde mit 100 µl Ethanol (80% Vol.) gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA im Pellet wurde danach in 100 µl A.d. durch Inkubation für 30 min bei 65°C und anschließendem Schütteln resuspendiert.

Um pDNA für Transfektionszwecke in größeren Ansätzen zu gewinnen, wurde ein abgewandeltes Protokoll der oben beschriebenen Prozedur verwendet.

In eine 2 ml 96-Loch Platte wurden mit Hilfe einer Multischritt-Pipette jeweils 1,9 ml LB-Medium mit Ampicillin in jede Vertiefung gefüllt und anschließend jede Position der Platte mit einer Bakterienkolonie von einer 15 cm Agar-Platte beimpft. Hierzu wurden sterilisierte oder autoklavierte Zahnstocher benutzt. Die Platten wurden mit selbstklebenden Folien, in die zuvor mit Zahnstochern Löcher für die Luftversorgung gestochen wurden, verschlossen und dann bei 37°C für 48 h im Schüttler inkubiert.

Die Kulturen wurden danach bei 4500 Upm für 5 min abzentrifugiert und das entstandene Pellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Alle weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt, weitgehend unter Zuhilfenahme von Mehrschritt- oder Mehrkanal-Pipetten. Entscheidend für den Erfolg der Präparation war dabei, den Isopropanol-Fällungsschritt für 45 min bei 4500 Upm durchzuführen.

Mit dieser Methode konnten ohne Probleme gleichzeitig zwei bis vier Platten mit jeweils 96 DNA-Minipräparationen bearbeitet werden, was zwischen 192 und 384 Präparationen entspricht. Abbildung 2.9 zeigt das Ergebnis einer zufällig ausgewählten Präparation auf einem Agarosegel aufgetragen, was stichprobenartig durchgeführt wurde. Zu erkennen ist, dass im gezeigten Beispiel 9 Präparationen keine sichtbaren Mengen DNA enthalten, während die restlichen 87 Präparationen DNA von weitgehend ähnlicher Qualität und Konzentration enthalten.

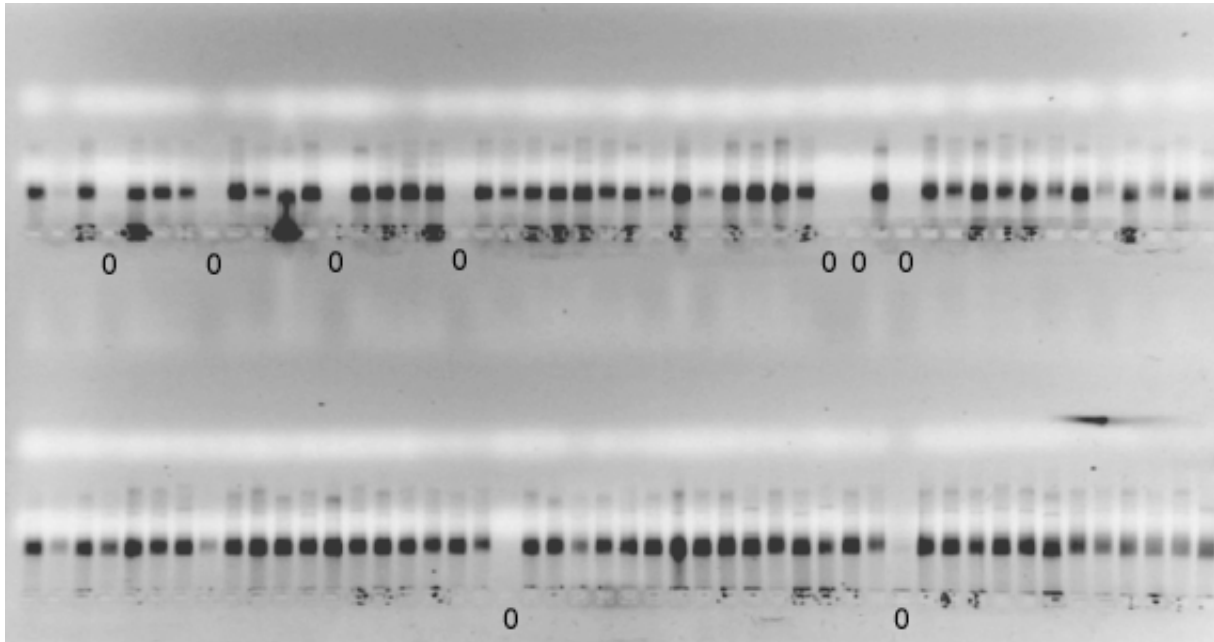


Abbildung 2.9: Plasmid DNA aus einer Mini-Präparation von einer cDNA-Bank („Viraport fetal brain“, Stratagene) im 96-Loch Format. Jeweils 10 µl der Einzel-Präparationen wurden auf ein mit Ethidium-Bromid gefärbtes „Centipede“ Agarosegel (1%) aufgetragen (Laufrichtung des Gels im Bild nach oben). Mit „0“ gekennzeichnete Spuren markieren Ausfälle in der Präparation. Aus Platzgründen konnte kein DNA-Längen-Standard aufgetragen werden.

DNA-Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden im Wesentlichen mit Enzymen der Firma New England Biolabs, Schwalbach durchgeführt. Die für ein Enzym jeweils optimalen Pufferbedingungen wurden durch Verwendung eines geeigneten 10fach-Reaktionspuffers und, falls nötig, Zugabe einer 10fach konzentrierten BSA-Lösung erreicht. Die Inkubationstemperatur und die Zeitdauer einer Reaktion wurden den jeweiligen Notwendigkeiten angepasst und weitgehend nach den Empfehlungen des Herstellers gewählt. Für einen typischen analytischen Restriktionsverdau wurden etwa 500 ng - 1 µg Plasmid-DNA und 1-5 Units Enzym in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 1-2 h inkubiert. Es wurde dann die Hälfte dieses Ansatzes für eine Analyse auf einem Agarose-Gel benutzt.

Bei Restriktionsverdau die zu präparativen Zwecken durchgeführt wurden, wurden bis zu 5 µg DNA mit 30-40 Units Enzym für mindestens 2 h in bis zu 100 µl Volumen inkubiert.

Agarosegelelektrophorese

Mit der Agarosegelelektrophorese wurden DNA Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt (Sambrook 1989). Dies diente zur Analyse von Plasmid-DNA, Fragmenten aus PCR-Reaktionen oder zur Auftrennung von DNA-Stücken die später isoliert und gereinigt werden sollten. Um die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen, wurden 10 µl Ethidiumbromidlösung pro 100 ml TAE-Gel verwendet. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer mit Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Puffer. Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe und Konzentration des Gels bei Spannungen zwischen 50 V und 150 V in horizontalen Gelkammern. Nach einer ausreichend langen Elektrophoresedauer (in der Regel wurden 75% der Länge des Gels ausgenutzt) wurde die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA unter UV-Licht betrachtet. Die Größe der DNA wurde anhand eines aufgetragenen Längenstandards (z.B. 1kb-Leiter von Roche Diagnostics Mannheim oder 2log Standard von New England Biolabs) ermittelt.

DNA-Isolierung aus Agarose Gelen

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren, wurden die durch EtBr unter UV Licht sichtbaren Fragmente mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die DNA nur so kurz wie möglich der schädigenden UV-Strahlung ausgesetzt war. Das ausgeschnittene Stück wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Die Isolierung fand nach dem Protokoll von Qiagen mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen statt. Dabei wurden je 100 mg des Gels zuerst 300 µl eines chaotropen Puffers zugegeben und, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hatte, bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Isopropanol wurde die Mischung auf eine Säule mit einer Silica-Membran gegeben und 1 min bei 14000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Dabei wird die DNA an der Membran gebunden. Die Säulchen wurde dann mit 750 µl Wasch-Puffer 1 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Die Elution erfolgte mit 50 µl Tris-HCl Puffer durch einen weiteren Zentrifugationsschritt von 1 min bei 14000 Upm.

DNA-Ligation

Durch Ligation wurden DNA-Fragmente in linearisierte Vektoren eingefügt. Es wurde der Rapid DNA Ligation Kit von Roche Diagnostics, Mannheim, nach den Angaben

des Herstellers, verwendet. Das Verhältnis Vektor zu Insert wurde in der Regel so gewählt, dass das Insert in nicht mehr als einem 3fachen molaren Überschuss vorlag. Es wurde, wenn möglich, eine Ansatzgröße von 10 µl für die Ligation gewählt. Um bei Ligationen eine mögliche Religation von 3'- und 5'-Enden bei glatten Enden („blunt ends“) oder kompatiblen Restriktionsschnittstellen zu vermeiden, wurde der Vektor dephosphoryliert. Dazu wurde die DNA noch während des Restriktionsverdaus mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Ein Reaktionsansatz wurde 1 h vor Beendigung der Restriktionszeit mit 1-5 Units alkalische Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt. Die alkalische Phosphatase wurde stets durch eine Gelaufreinigung entfernt.

2.2.8 Klonierungstechniken

Transformation kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden kompetente, superkompetente oder ultrakompetente XL10 Gold Epicurian Coli[®] von Stratagene, Niederlande verwendet. Die kompetenten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und nötigenfalls aliquotiert. Nach Zugabe von 4 µl 1,4 M β-Mercaptoethanol (Stratagene) pro 100 µl erfolgte eine Inkubation von 10 min auf Eis. Anschließend wurden 2-5 µl DNA eines Ligationsansatzes oder 25 ng eines zu transformierenden Plasmids zu den Bakterien gegeben. Nach 30-60 min auf Eis wurden die Bakterienzellen einem Hitzeschock unterzogen (30 s bei 42°C) und erneut auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 200-500 µl SOC-Medium wurde die Plasmid-Bakteriensuspension für 60-120 min in einem 37°C-Schüttler inkubiert. Jeweils 100 µl (bei Retransformationen die Hälfte) und der Rest des Ansatzes wurden auf zwei LB-Ampicillin Agarplatten (50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und ÜN in einen 37°C Brutschrank gestellt. Am folgenden Tag wurden die Platten aus dem Inkubator geholt, Einzelkolonien gepickt und in 3-7 ml LB-Medium mit Ampicillin ÜN in einem 37°C-Schüttler inkubiert.

Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der selektiven enzymatischen Vervielfältigung bzw. Vervollständigung von Nukleinsäuresequenzen. Für alle Reaktionen wurde der

Expand High Fidelity PCR Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet, der ein ausgezeichnetes Verhältnis von Prozessivität und geringer Fehlerrate aufweist. Die PCR-Reaktionen wurden in den Thermocyclern Perkin Elmer GeneAmp9600 oder 2400 oder dem Modell Eppendorf Gradient durchgeführt. Für unterschiedliche Projekte wurde eine Vielzahl von variierenden Protokollen eingesetzt. Es soll hier ebenfalls wieder auf die einschlägige Methodenliteratur verwiesen werden, was die Optimierung von anzusetzenden Reaktionen und Zyklusprotokollen betrifft, da die PCR zu komplex ist, um ihr in diesem Rahmen gerecht zu werden. In Kürze einige spezielle Richtlinien, die als Leitfaden bei den Ansätzen dienen:

- Pro 500 Basen zu erwartender Länge des Amplifikats wurden 45 sek Elongationszeit eingesetzt.
- Bei sehr langen (>75 Basen) Oligonukleotid-Primern im Ansatz wurde ein sog. „Hot Start“ angewendet, d.h. die Polymerase wurde erst nach 2 min Denaturierungszeit bei 94°C in den Ansatz pipettiert.
- Je länger die Primer, desto länger der Denaturierungsschritt.
- Annealingtemperatur grundsätzlich so hoch wie möglich, um unspezifische Amplifikate zu vermeiden.
- Zykluszahl grundsätzlich so niedrig wie möglich, um die Zahl der fehlerhaften Amplifikate zu begrenzen.
- Bei extrem hohen Mengen an eingesetztem Template, Primern oder Polymerase wurde zusätzliches MgCl₂ eingesetzt.
- Generell wurde die Gesamtdauer der PCR so kurz wie möglich gehalten, um die thermische Denaturierung der Polymerase(n) zu begrenzen.

Ein typischer Ansatz für eine durchgeführte PCR ist unten gezeigt:

Reaktions-Ansatz:

Template (z.B. ca. 10-50 ng Plasmid)	1 µl
dNTPs (1.25 mM Stocklösung)	16 µl
5' Primer (20 µM)	2 µl
3' Primer (20 µM)	2 µl
10x PCR Puffer (+MgCl ₂)	10 µl

Polymerase-Mix		0,75 µl
Aqua.dest.	ad	100 µl

Eine typische PCR-Reaktion, um das HIV-1 *rev* Gen im Eppendorf Gradientencycler zu amplifizieren, ist unten gezeigt:

Protokoll:

4 min	94°C		
30 s	94°C	}	27 Zyklen
30 s	60°C		
30 s	72°C		
7 min	72°C		
halten bei	4°C		

Primer für die durchgeführten PCR-Reaktionen wurden am Computer mit der Software Gene Construction Kit unter Berücksichtigung einiger grundsätzlicher Überlegungen generiert:

- Standardprimer sollten zwischen 20 und 30 Basen lang sein und ungefähr 55-65°C Annealingtemperatur aufweisen.
- Ein eventueller Überhang sollte nicht mehr als 30-50% der gesamten Primerlänge betragen.
- Am 5'-Ende des Primers sollte sich ein A oder T und am 3'-Ende ein G oder C befinden.
- Wenn das PCR-Produkt ohne Zwischenklonierung an, mit den Primern eingeführt, Restriktionsschnittstellen geschnitten werden sollte, ist auf einen ausreichenden Basenüberhang (ja nach benutzter Schnittstelle) zu achten.
- Repetitive Sequenzen sollten vermieden werden, besonders solche die zu einer Selbsthybridisierung des Primers führen könnten.
- Bei sehr langen Primern musste besonders am 5'-Ende mit fehlerhaften Sequenzen gerechnet werden, was die Gesamtlänge auf maximal 80, in Ausnahmefällen auf ca. 100 Nukleotide Länge beschränkte.

Für die detaillierte Analyse von Oligonukleotiden steht desweiteren eine Vielzahl an Computer-Programmen zur Verfügung (OligoEd, MacVektor, GCG u.ä.) deren Hilfe allerdings nur in seltenen, problematischen Fällen notwendig wird. Üblicherweise ist die Methode der PCR robust genug, um die mit „blickdiagnostischen Mitteln“ des Anwenders generierten Primer zu dulden.

Klonierung von PCR Fragmenten

PCR-Produkte wurden standardmäßig in sogenannte PCR-Klonierungsvektoren eingebracht. Die PCR-Produkte werden dabei unspezifisch in Plasmide ligiert, in Bakterien transformiert, stark vermehrt und wieder extrahiert. Restriktionsenzyme finden in diesen Klonierungsvektoren gute Bedingungen zum DNA-Verdau vor und eine Sequenzierung des PCR-Produkts ist meist durch Standardprimer schnell und unproblematisch möglich.

Bei dem „TOPO-TA Kloning Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) liegt der Klonierungsvektor pCR®2.1-TOPO® linearisiert mit einzelnen 3'-Tymidin (T) überhängenden Enden vor. Das Enzym Topoisomerase I ist kovalent an diese Enden gebunden und stabilisiert sie. Die Taq-Polymerase besitzt die Aktivität einer Terminaltransferase, unabhängig von der DNA-Matrize, welche ein Adenosin (A) an das 3' Ende des PCR-Produktes anfügt. Der Expand® HighFidelity PCR-Kit von Roche enthält einen hohen Anteil an Taq Polymerase. Ausgenutzt wird nun die Ligaseaktivität der Topoisomerase, die zu einer effizienten Ligation der einzelnen überhängenden T und A Nukleotide führt.

Danach erfolgte eine Transformation in TOP10F⁺ chemisch kompetente *E. coli* (Invitrogen, Karlsruhe). Die Transformation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Positive Klone konnten ermittelt werden, da das PCR Produkt in den Leserahmen des Gens für das lacZ- α -Peptid inseriert wird, diesen unterbricht, und dadurch weiße anstatt blaue Kolonien auf X-Gal/IPTG LB-Agarplatten wachsen. Genauere Untersuchungen der inserierten DNA konnten durch PCR bzw. Sequenzierungen mittels beidseitig der Inserierungsstelle liegenden M13 forward/reverse Primern durchgeführt werden. PCR-Produkte die zu weiteren Klonierungsschritten benötigt wurden, wurden obligatorisch auf die korrekte Sequenz durch Sequenzierung überprüft.

Sequenzierung

Für die Sequenzierungsreaktion wurde klonierte, gereinigte DNA verwendet, da Proteinbestandteile oder Primer, sowie Ethanolreste, die Sequenzierreaktion stören würden. Die Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve, Vaterstetten im Auftrag durchgeführt. Die Erfahrung von Sequiserve ermöglichte in Ausnahmefällen (besonders um Zeit zu sparen) auch Miniprep-DNA zur Sequenzierung zu verwenden, wenn die DNA-Konzentration ausreichend hoch war.

2.2.9 Proteinanalytik

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Die Methode wurde modifiziert nach Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Mit der SDS-PAGE werden SDS-denaturierte Proteine entsprechend ihrer Größe in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Das quervernetzte Polyacrylamid des Gels wirkt dabei als Molekularsieb. Durch Vergleich mit einem Längenstandard kann das Molekulargewicht der aufgetrennten Banden annähernd ermittelt werden.

Proteinisolierung aus Zellkulturmaterial

Transfizierte Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit PBS gewaschen, dann mit 1 ml Aufschlußpuffer für 5 min bei RT lysiert, mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurde das Lysat mit dem Zelldebris 15 min bei 4°C und 24000 x g zentrifugiert. Aus den Überständen wurde mit einem an der Spitze gekrümmten Zahnstocher genomische DNA entfernt und der Proteingehalt der Zelllysate bestimmt. Eine bestimmte Proteinmenge (10-50 µg) wurde mit Gelauftragspuffer (5x) versetzt. Nach Denaturierung der Proben für 5 min bei 95°C wurden diese sofort auf das Gel aufgetragen.

Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf 4-12% TrisAcetat-Gradientengelen (Invitrogen, Karlsruhe) in vertikalen Gelkammern (Trenngelgröße 10 x 10 x 0.1 cm). Die Gele bestanden aus einem Sammel- und einem Trenngel. Der Gellauf erfolgte

bei 60 V - 120 V und einer konstanten Stromstärke von 10 mA/Gel. Das Pufferreservoir an Anode und Kathode war mit Elektrophorese-Puffer gefüllt.

Western Blot

Die auf dem Gel aufgetrennten Proteine wurden durch ein sogenanntes Halbtrocken-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell) übertragen. Dieses Verfahren eignet sich grundsätzlich nicht zu einem vollständigen Transfer der Proteine von dem Gel auf die Membran, stellt aber einen sehr guten Kompromiss zwischen Ausbeute und Zeitaufwand dar.

Die benötigte Nitrozellulose (NC) Membran, sowie die feucht aufzulegenden Whatman-Filterpapiere, wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und die Proteine für 2 h bei 90 mA vom Gel auf die Membran übertragen.

Um mögliche Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen, an die die Antikörper unspezifisch binden könnten, wurde die NC-Membran nach dem Proteintransfer für mindestens 12 h bei 8°C in PBS mit 10% Milchpulver (oder alternativ mit H-Milch mit 3,5 % Fett-Anteil) geblockt. Nach diesem Sättigungsschritt wurde die Membran einmal 5 min mit PBS gewaschen. Der 1. Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS mit 1 % Milchpulver für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran für mindestens 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Die Inkubation des 2. Antikörpers (mit Meerrettichperoxidase markiert) erfolgte in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS mit 1 % Milchpulver für 1 h. Nach erneuten Waschsritten (3 x 10 min, in PBS) wurde die NC-Membran 1 min in vorgemischtem ECL-Substrat von Amersham getränkt und zwischen zwei Folien in eine Expositionsmappe gelegt. Das Licht, der auf der Membran stattfindenden Chemilumineszenz- Reaktion, wurde auf einem Kodak-Film exponiert und anschließend entwickelt oder mit einem digitalen Geldokumentationsgerät (Biorad) aufgenommen.

2.2.10 RNA-Methoden

RNA-Isolierung aus Zellkulturmaterial mit RNEasy Kit (Qiagen)

Es wurde sorgfältig darauf geachtet, Kontaminationen mit RNA-abbauenden Enzymen (RNasen) zu vermeiden. Wo möglich, wurden gebackene Glasgefäße oder neue RNase-freie Plastikware verwendet und alle verwendeten Geräte mit RNaseZap gereinigt. Material, das zur Weiterverarbeitung in enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden sollte, wurde nach dem Auftauen prophylaktisch RNasin (Promega) zugesetzt, was die Aktivität von RNasen effektiv hemmt.

Zur Isolierung von Gesamt RNA aus Zellkulturmaterial wurde der RNEasy Kit von Qiagen verwendet. Die RNA-Isolierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf der Bindung der aus den Zellen freigesetzten RNA an im Kit enthaltene Säulen. Nach mehrmaligen Waschschritten wurde die RNA mit RNase-freiem Puffer oder Aqua dest. eluiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte in einer 1:100 Verdünnungen bei Wellenlänge von 260 und 280 nm. Die Proben wurden aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Isolierung von polyA-haltiger RNA aus Gesamt-RNA

Um aus zuvor aus eukaryotischen Zellen isolierter Gesamt-RNA die polyA-haltige RNA zu isolieren, wurde der polyAttract Kit von Promega nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Durch die Bindung der Gesamt-RNA an polyT-beschichtete magnetische Kügelchen (Beads) wurde über mehrere Wasch-Schritte und unter Zuhilfenahme eines magnetischen Reaktionsgefäß-Halters saubere polyA-haltige RNA isoliert. Diese diente als Ausgangsmaterial für RT-PCRs und reduzierte im Vergleich zu Gesamt-RNA unspezifische Amplifikation von nicht mRNA-Fragmenten.

Herstellung von cDNA-Banken aus Astrozytom-Zellen

Für die Herstellung von Plasmid-Klonbanken wurde isolierte RNA aus Astrozytom-Zelllinien (RNEasy Kit) verwendet und nach dem Verfahren der RLM-RACE (RNA-Ligation mediated rapid amplification of cDNA ends, Ambion) verarbeitet.

Für ein vollständiges Protokoll der gesamten Prozedur wird hier auf das Handbuch der Firma Ambion verwiesen. In Kürze: Es wurde isolierte RNA oder polyA-angereicherte RNA verwendet und mit alkalischer Phosphatase versetzt, um 5'-trunkierte RNAs zu dephosphorylieren. Nach einer Reinigung der RNA wurde TAP

(tabacco acid pyrophosphatase) zugegeben, die spezifisch die Cap-Struktur am 5'-Ende von vollständigen RNAs entfernt. Damit besitzen nur 5'-vollständige RNAs in der Mischung einen Phosphatrest, an den mittels einer T4 RNA Ligase ein RNA-Primer ligiert wird. In einer nachfolgenden RT-Reaktion wird mit einem Primer, der an die ligierte RNA-Sequenz bindet, einzelsträngige cDNA synthetisiert, die schließlich mit einer PCR (und einem polyA-Primer) zu doppelsträngiger cDNA wird. Dieser Pool an cDNAs wird dann entweder bidirektional in Topo-Vektoren ligiert oder mit *XhoI/BamHI* geschnitten und in den geschnittenen pFB-Vektor ligiert. Danach erfolgt eine Transformation von ultrakompetenten *E.coli* (Stratagene). Die so erhaltene cDNA-Bank wird entweder in Flüssigkultur expandiert und eingefroren oder auf 10 cm Agar-Platten ausgebracht und nach Inkubation abgeschabt und eingefroren.

2.2.11 Statistik

Um festzustellen, ob sich zwei Datensätze signifikant unterscheiden, können verschiedene statistische Tests durchgeführt werden. Eine Voraussetzung für viele aussagekräftige Tests ist, dass die Variation der Stichprobenmittelwerte einer Normalverteilung folgt. Allerdings folgen nicht viele biologische Merkmale und Charakteristika und somit auch nicht die darauf aufbauenden experimentellen Ergebnisse einer perfekten Normalverteilung, sondern eher einer mehr oder weniger schiefen Verteilung. Große Stichprobenmengen können die Notwendigkeit für perfekte Normalität teilweise kompensieren, aber in der Regel weiß man nicht, wie groß die Stichprobenmenge sein muss, um eine „gute Normalität“ der Mittelwert-Verteilung zu sichern.

Verfahren, die keine Normalverteilung voraussetzen, heißen parameterfrei (oder verteilungsunabhängig) und sind eine praktische Alternative. Der Mann-Whitney Test (auch Rangsummentest) ist solch ein parameterfreier Test zum Vergleich unabhängiger Stichproben. Er sollte jedoch auch nur dann angewandt werden, wenn sich die zu vergleichenden Merkmalsverteilungen nur in ihrer Lage, nicht aber in ihrer Form unterscheiden. Der zweiseitige Mann-Whitney Test muss angewandt werden, wenn keine Information darüber besteht, welche der zu vergleichenden Grundgesamtheiten die größere ist.

Der dann erhaltene zweiseitige p-Wert zeigt die Wahrscheinlichkeit an, mit der sich zwei Stichproben zufällig unterscheiden. Ein kleiner p-Wert bedeutet also, dass der Unterschied zwischen zwei Stichproben nicht zufällig, also signifikant ist. Es hat sich in der Naturwissenschaft etabliert, dass p-Werte die kleiner 0,05 sind dem entsprechenden Experiment eine statistische Signifikanz bescheinigen. Ergebnisse die mit $p < 0,05$ signifikant sind, treten in weniger als einem von 20 Fällen (<5%) zufällig auf. Die Tests wurde mit Hilfe der Graphpad Software Prism 2.0 für Apple Macintosh oder Kyence KyPlot 3.0 für Windows durchgeführt.

2.2.12 Online Datenbanken

Für computerbasierte Sequenzanalysen, sowie Recherchen, wurden die unten aufgeführten Online-Datenbanken verwendet.

NCBI :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- BLAST: Sequenzvergleich (Altschul, Madden et al. 1997)
- PubMed: Literaturrecherche

EMBL:

<http://www.embl-heidelberg.de/srs5/>

Sequenzdatenbank

Genomatix Software GmbH:

<http://www.genomatix.de>

- EIDorado: annotierter genomischer Sequenzvergleich und -kartierung

3 Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit bestand die Notwendigkeit ein System verfügbar zu haben, mit dem die Funktion von HIV-1 Rev und Tat im zellulären Kontext darstellbar wird. Dieses System könnte dann einerseits dazu dienen die Funktionalität von Mutanten der HIV-1 Proteine zu überprüfen, andererseits auch um inhibitorische Einflüsse auf diese regulatorischen Proteine und damit die HIV-1 Genexpression festzustellen.

3.1 Entwicklung und Charakterisierung eines neuen Tat/Rev- Reporter Assays

3.1.1 Erzeugung neuer Reporter-Plasmide für die Tat- und Rev Funktionsanalyse

In der Arbeitsgruppe waren seit längerer Zeit schon Assay-Systeme für die Tat- und Rev-Funktion etabliert, die auf der Bestimmung der Synthese eines HIV-1 Gag proteins durch ELISA (p24-ELISA) bzw. des CAT-Proteins beruhen. Diese hatten hinsichtlich einer einfachen Handhabung im Zusammenhang mit großen Probenzahlen deutliche Nachteile zu verzeichnen. Abgesehen davon ist speziell der p24-ELISA durch seine hohen Anschaffungskosten nicht sehr wirtschaftlich einzusetzen. Desweiteren erlauben diese Assays keine Analysen auf Einzelzellebene mit eventuell anschließender Selektion bestimmter Zellen.

Deshalb sollte ein neues, fluoreszenzbasiertes System etabliert werden, da zur Auswertung eines solchen Systems sowohl die Methodik der Fluoreszenz-Mikroskopie als auch der FACS-Analyse in der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen. Ausgangspunkt sollte das Plasmid pB37R sein, das bereits bei der Durchführung des p24-ELISA eingesetzt wurde. Dieses Plasmid exprimiert unter der Kontrolle der HIV-LTR ein p37 Gag Protein. Durch die HIV-LTR als Promotor ist die Expression fast vollständig Tat-abhängig, durch die Instabilitäts-Elemente in der gag Sequenz und die 3' auf der RNA enthaltene RRE zusätzlich stark Rev-abhängig. Dieses wichtige Ausgangs-Plasmid ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.

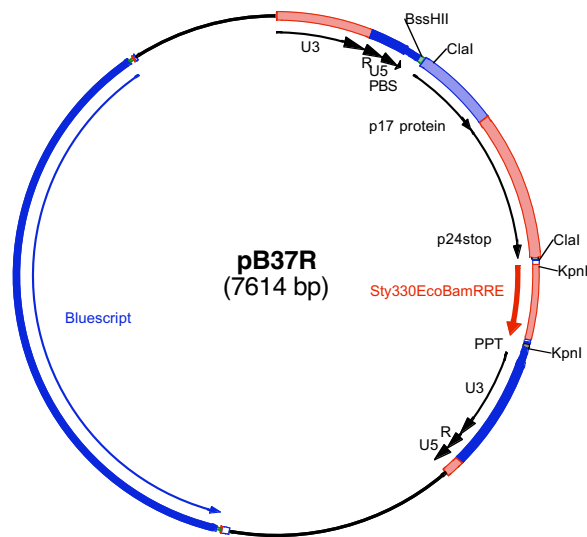


Abbildung 3.1: Das Plasmid pB37R. Wichtige Restriktionsstellen sind angegeben. Die HIV-LTRs sind mit ihren Regionen U3, R und U5 gezeigt. Die Positionen des ORFs für p17/24 und für die RRE sind ebenfalls angegeben.

Im folgenden Abschnitt wird kurz die Entstehung vier wichtiger Plasmide geschildert, die als schematische Übersicht in Abbildung 3.6 dargestellt sind. Diese Plasmide stellen die Grundlage für einen Großteil der durchgeführten Arbeiten dar und werden im nächsten Abschnitt hinsichtlich ihrer Expressionseigenschaften näher charakterisiert.

Das Plasmid pLRedR (Basiskonstrukt)

Als erster Schritt zur Erlangung eines neuen, fluoreszenzbasierten Reporter-Vektors wurde mittels PCR das Gen für das rot fluoreszierende Protein *DsRed1* amplifiziert (Matz, Fradkov et al. 1999), wobei pDsRed1-N1 (Clontech) als Template diente. Dieses Amplifikat sollte über die eingefügten Restriktionsschnittstellen *BssHIII* und *ClaI* anstelle der p17/p24-Sequenz in pB37R eingesetzt werden. Dazu wurde pB37R zuerst in einen methylierungsdefizienten Stamm von *E.coli* transformiert, um die Schnittstelle *ClaI* für eine Restriktion zugänglich zu machen. Nach Präparation des

unmethylierten Plasmids und nachfolgendem Restriktionsverdau wurde das *dsred1* Gen in den Vektor ligiert, wodurch das Plasmid pLRedR erhalten wurde. Dieses Plasmid stellt für viele weitere Ansätze eine wesentliche Grundlage dar und ist daher in Abbildung 3.2 gezeigt. Nach Transfektion von HeLa-Zellen wird in Anwesenheit von Tat das DsRed1-Protein und damit eine rote Fluoreszenz in der ganzen Zelle exprimiert, die spätestens nach 24 h im Mikroskop bzw. FACS-Gerät leicht nachgewiesen werden kann. Diese rote Fluoreszenz der Zellen kann noch in gewisser Weise durch die Anwesenheit von Rev gesteigert werden, da sich auf der RNA, die von diesem Plasmid transkribiert wird, die RRE befindet. Trotzdem ist das Niveau der DsRed1 Expression auch ohne Rev sehr hoch (s. Ergebnisteil 3.1.3).

Zu einem späteren Zeitpunkt im Verlauf dieser Arbeit wurde eine weitere Variante dieses Konstrukts, genannt pLRed_{Quick}R erzeugt. pLRed_{Quick}R ist bis auf einige Mutationen in der Aminosäuresequenz des rot fluoreszierenden Proteins identisch mit pLRedR.

Da DsRed1 eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von etwa 11 h für die Ausbildung seiner Fluoreszenz besitzt und noch dazu bei der Reifung des Fluorochroms grün fluoreszierende Zwischenstufen (zu etwa 1%) entstehen, wird in metabolisch wenig aktiven Zellen teilweise nur eine relativ schwache rote Fluoreszenz entwickelt, oder es muss die transfizierte Plasmidmenge entsprechend höher gewählt werden.

In der als Red_{Quick} bezeichneten Variante wurden (nach (Bevis and Glick 2002)) 9 Mutationen eingeführt, die gegenüber *DsRed1* eine deutlich schnellere Fluoreszenzausbildung ermöglichen ($t_{1/2}$ = ca. 0,7 h). Die transfizierten Plasmid-Mengen können daher also generell niedriger gewählt werden und eine Analyse der Fluoreszenz wird dadurch teilweise schon nach weniger als 24 h, und auch in problematischen Zellen, möglich.

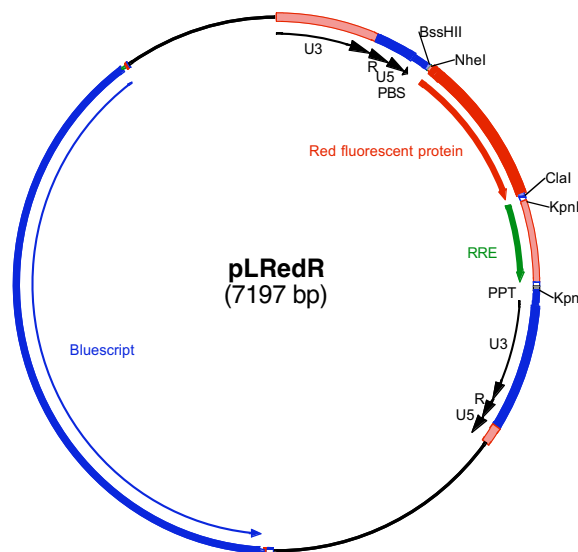


Abbildung 3.2: pLRedR. Benennung großteils wie in Abb. 3.2. In den ersten AS des ORFs für *DsRed1* wurde eine *NheI* Schnittstelle für weitere Klonierungen eingeführt.

Das Plasmid pLRed (Tat-Reporter)

Um die Tat-abhängige Expression von rot fluoreszierendem Protein (RFP) bestimmen zu können, wurde die RRE aus pLRedR entfernt. Damit sollte die Synthese von RFP in erster Linie von der Aktivierung des HIV-Promotors durch Tat abhängen.

Dazu wurde pLRedR mit dem Restriktionsenzym *KpnI* verdaut, was zur vollständigen Entfernung der etwa 350 bp langen RRE-Sequenz aus pLRedR führt. Danach wurde das Plasmid wieder religiert und dadurch pLRed erhalten. Die Expression von RFP ist immer noch stark von Tat abhängig, kann aber durch Rev nicht mehr gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). Von pLRed existiert ebenfalls eine Version pLRed_{Quick}, deren veränderte Eigenschaften mit den bereits bei pLRed_{Quick}R beschriebenen vergleichbar sind.

Das Plasmid pLRedINSR (Rev-Reporter1)

Wie sich bei der Expression von RFP durch pLRedR zeigte, war die Anwesenheit der RRE auf der transkribierten RNA nicht ausreichend, um eine vollständige Rev-Abhängigkeit der Expression zu gewährleisten. Es wurde daher vermutet, dass weitere, die RNA-destabilisierende Elemente in das Reporter-Konstrukt eingefügt werden mussten, um eine deutlichere Abhängigkeit der RFP-Expression von Rev zu erreichen. Solche Elemente, die Auswirkungen auf die Stabilität von mRNA und damit die Expression der Proteine haben, kommen natürlicherweise im HIV-Genom vor und sind für die Regulation der Genexpression notwendig (siehe Einleitung). Es wurden bisher mehrere solcher RNA-wirksamer Elemente, besonders im Bereich der *gag*-Sequenz von HIV, beschrieben (Cochrane, Jones et al. 1991);(Maldarelli, Martin et al. 1991);(Schneider, Campbell et al. 1997). Daher wurden die zuvor aus technischen Gründen für die Klonierung entfernten p17/p24-Sequenzbereiche stromabwärts des ORF für RFP wieder in das Konstrukt eingefügt, allerdings ohne die 14 N-terminalen AS dieser Sequenz (und ohne START-Methionin). Da natürlicherweise im HIV-Genom die RRE 3' der *gag* Gensequenzen liegt, wurde die Anordnung in dem entstehenden Konstrukt ebenfalls so gewählt. Der zuvor aus pB37R durch *Cla*I-Verdau isolierte Sequenzbereich wurde in den ebenso verdauten und dephosphorylierten pLRedR-Vektor ligiert und damit pLRedINSR erhalten. Da die Insertion des p17/p24-Sequenzbereichs bidirektional erfolgen konnte, wurde gleichzeitig das Plasmid pLRedSNIR erzeugt, das die Sequenzen in Negativstrang-Orientierung enthält. Die RFP-Expression von pLRedINSR zeigt sich noch immer Tat-abhängig, aufgrund einer geringeren Basisexpression zusätzlich aber deutlich Rev-abhängiger als bei pLRedR. Das Plasmid pLRedSNIR weist durch den orientierungsabhängigen Effekt der INS-Elemente auf der RNA praktisch keinen Unterschied zu pLRedR im RFP-Expressionsverhalten auf. Wichtig zu erwähnen ist, dass die eingefügten *gag*-Sequenzen nur auf DNA- bzw. RNA-Ebene präsent sind und durch die Anwesenheit von STOPP-Kodons 3' des RFP-ORFs, sowie das Fehlen eines START-Kodons, nicht in Protein translatiert werden können. Dass von diesem Konstrukt kein Protein erzeugt wird, das in seinem Molekulargewicht von *DsRed1* abweicht, wurde durch Westernblot ebenfalls bestätigt (s. Abbildung 3.3).

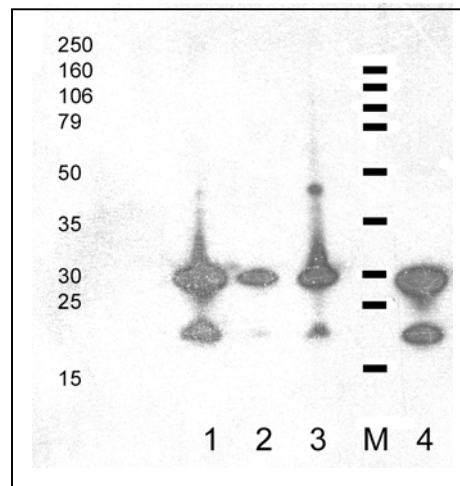


Abbildung 3.3: Westernblot-Analyse von Lysaten von HeLa-Tat Zellen, transfiziert mit verschiedenen Reporter-Konstrukten. Primärer Antikörper: DsRed LivingColors (Peptid). M: Größenstandard (links: Molekulargewicht in kDa); 1:pLRedSNIR; 2:pLRed; 3:pLRedR; 4: pLRedINSR. Die Hauptbanden der Proteinexpression sind jeweils bei ca. 30 kDa zu finden, was gut mit dem Molekulargewicht von DsRed1 von etwa 29 kDa übereinstimmt. C-terminale Abbaubanden von DsRed1 sind ebenfalls zu sehen (etwa 20 kDa) und wurden in der Literatur bereits beschrieben (Gross, Baird et al. 2000). Die auf das Gel aufgetragenen Proteinmengen variieren je nach der Expressions-Stärke von RFP.

Von pLRedINSR existiert ebenfalls eine Version pLRed_{Quick}INSR, deren veränderte Eigenschaften mit den bereits bei pLRed_{Quick}R beschriebenen vergleichbar sind.

Das Plasmid pLRed(2xINS)R (Rev-Reporter2)

Da die RFP-Expression nach Transfektion von pLRedINSR in HeLa-Tat Zellen, selbst in Abwesenheit von Rev, sowohl im Fluoreszenz-Mikroskop als auch im FACS, nach 24 h noch deutlich detektierbar war, wurde beschlossen ein weiteres Konstrukt zu generieren, um diesen Hintergrund an roter Fluoreszenz zu beseitigen. pLRed(2xINS)R entstand auf dem selben Weg wie pLRedINSR, mit dem Unterschied, dass die molaren Verhältnisse bei der Ligation der p17/p24-Sequenzbereiche in den Vektor pLRedR so gewählt wurden, dass eine doppelte Insertion der Sequenzen in Plusstrang-Orientierung erhalten werden konnte.

Selbst bei größeren Mengen an in HeLa-Tat Zellen transfiziertem pLRed(2xINS)R konnte nach 24-48 h keine Basis-Expression von RFP in Abwesenheit von Rev detektiert werden. Erst durch die Zugabe von Rev wurde die Expression von RFP ausgelöst. Dieses Konstrukt orientierte sich in seinem Aufbau so weit wie möglich an dem Aufbau Rev-abhängiger viraler Transkripte. Ein wesentlicher Unterschied ist aber, dass, im Gegensatz zu viralen Transkripten, das Reporter-Transkript keine erkennbaren Spleißstellen enthält.

Abbildung 3.4 stellt die viralen Transkripte und das Reporter-Transkript schematisch gegenüber.

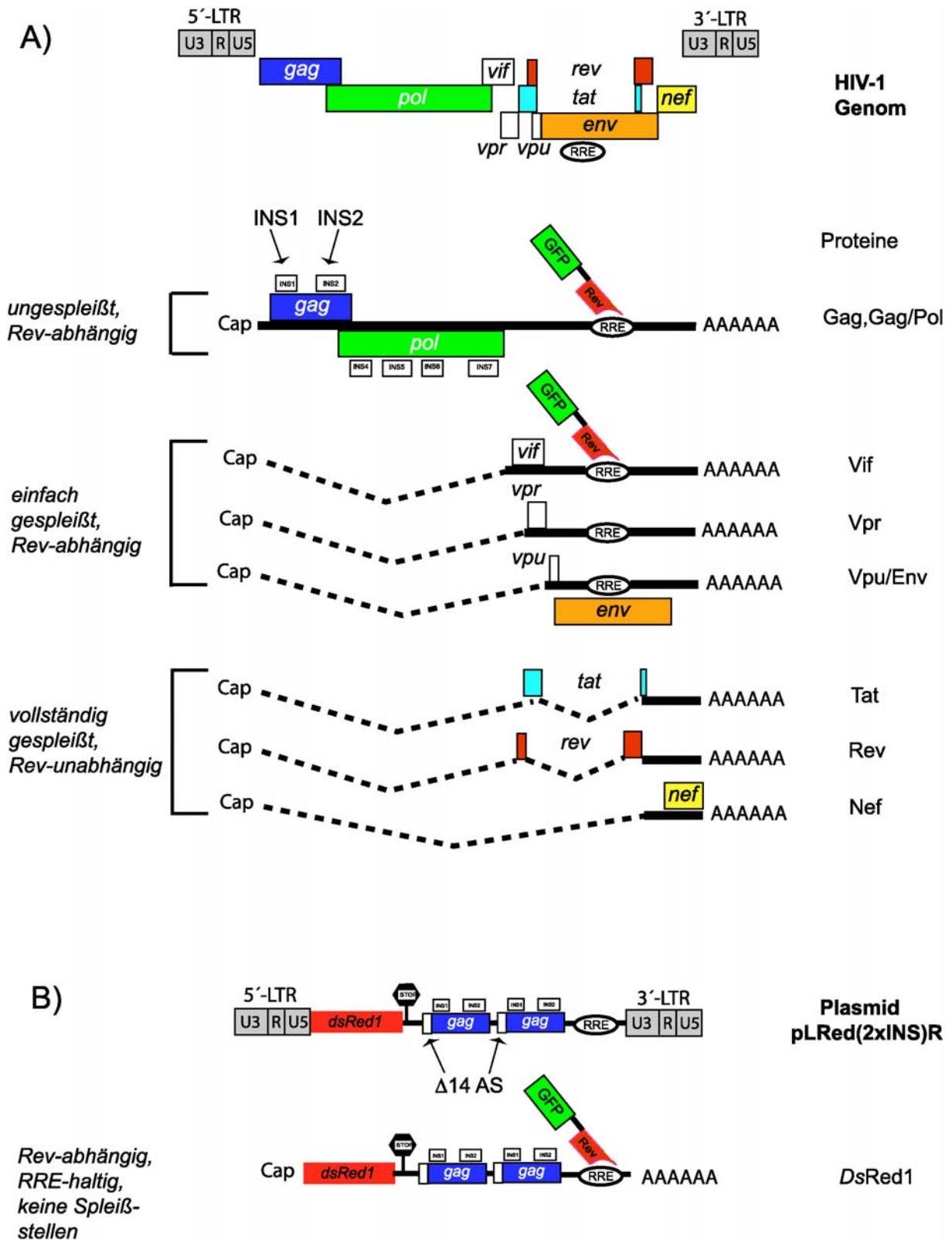


Abbildung 3.4: Genom und Transkripte von HIV und dem Reporter-Plasmid pLRed(2xINS)R. **A)** Rev-abhängige und -unabhängige HIV-Transkripte. INS1 und INS2: INS-Regionen in gag. **B)** Das Reporter-Transkript. Die mit $\Delta 14$ AS bezeichneten weißen Bereiche signalisieren die Deletion der 14 N-terminalen AS im gag Gen an dieser Stelle. Abbildung nicht maßstabsgetreu. Modifiziert und vereinfacht nach (Freed 2001).

Die experimentellen Untersuchungen ergaben, dass sich das Expressionsverhalten des Konstrukts mit dem aus dem Aufbau vorhergesagten Verhalten deckte.

Dadurch wurde die Grundlage für einen Einsatz des Konstrukts in Funktionsanalysen gelegt.

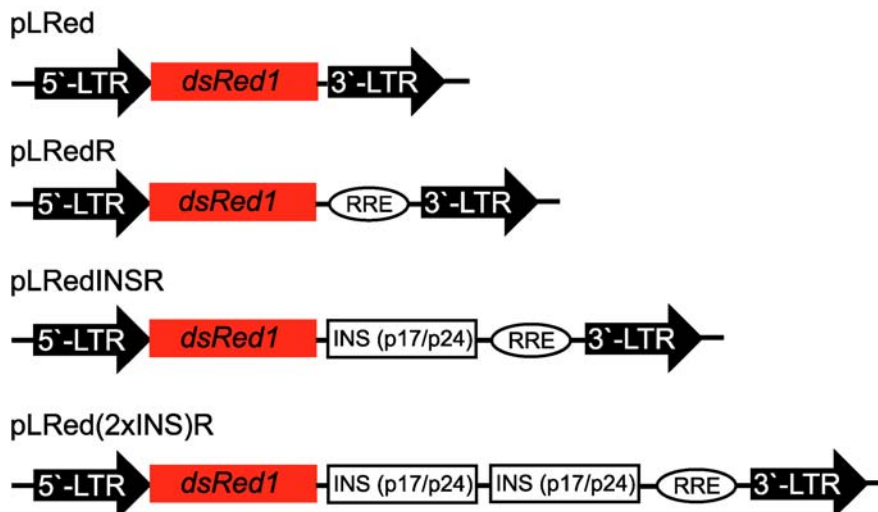


Abbildung 3.6: Die im Text beschriebenen Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Von oben nach unten: pLRed, pLRedR, pLRedINSR und pLRed(2xINS)R. In rot gezeigt ist der ORF für das rot fluoreszierende Protein DsRed1. In schwarz/weiß gehalten, die nur auf mRNA-Ebene enthaltenen *gag*-Sequenzen, sowie die RRE.

3.1.2 FACS-Analyse der RFP-Expression der Reporter-Plasmide

Um eine quantitative Aussage über die jeweilige Stärke der Expression von RFP bei Transfektion der einzelnen Konstrukte treffen zu können, wurde die Technik der Durchflußzytometrie (auch FACS-Analyse) angewandt.

Dafür wurden mit den oben beschriebenen Plasmiden HeLa-Tat Zellen transfiziert. Hierbei wurden jeweils äquimolare Mengen an Plasmid benutzt, um eine quantitative Aussage der RFP-Expressionsstärke treffen zu können. D.h., wenn von dem Basiskonstrukt pLRedR 1 mg Plasmid benutzt wurden, so waren dies bei pLRed nur 0,95 mg, da dieses Plasmid nur das 0,95 fache der Größe von pLRedR besitzt. Das im Vergleich zu pLRedR 1,29 fach größere Plasmid pLRed(2xINS)R wurde hingegen mit etwa 1,29 mg eingesetzt. Zweitens war eine interne Transfektionskontrolle von

Nöten, um bei der Auswertung der Experimente Schwankungen in der Transfektionseffizienz sowie in der metabolischen Aktivität der Zellen möglichst gut korrigieren zu können. Als Transfektionskontrolle wurde, aufgrund der sehr gut charakterisierten Eigenschaften, das Plasmid pFred143 gewählt, das unter der Kontrolle des CMV (immediate early) Promotors das Gen für die sg143-Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) exprimiert.

GFP wurde in diesen Ansätzen also konstitutiv von den Zellen exprimiert und war aufgrund seiner guten Detektierbarkeit im FACS eine ideale Transfektionskontrolle. Allerdings durften von diesem Plasmid in einem Transfektionsansatz (pro 35 mm Schälchen) bei HeLa-Tat Zellen nur 100 ng transfiziert werden. Wurden bei diesen Versuchen 200 ng überschritten, überstieg nach 24 h die Stärke der GFP-Fluoreszenz den Detektionsbereich des FACS-Gerätes und eine quantitative Auswertung war nicht mehr, oder nur noch eingeschränkt, möglich.

Abbildung 3.7 zeigt Dot Plots der durchgeführten FACS-Experimente in HeLa-Tat Zellen OHNE die Zugabe von Rev, nur mit pFred143 als Transfektionskontrolle.

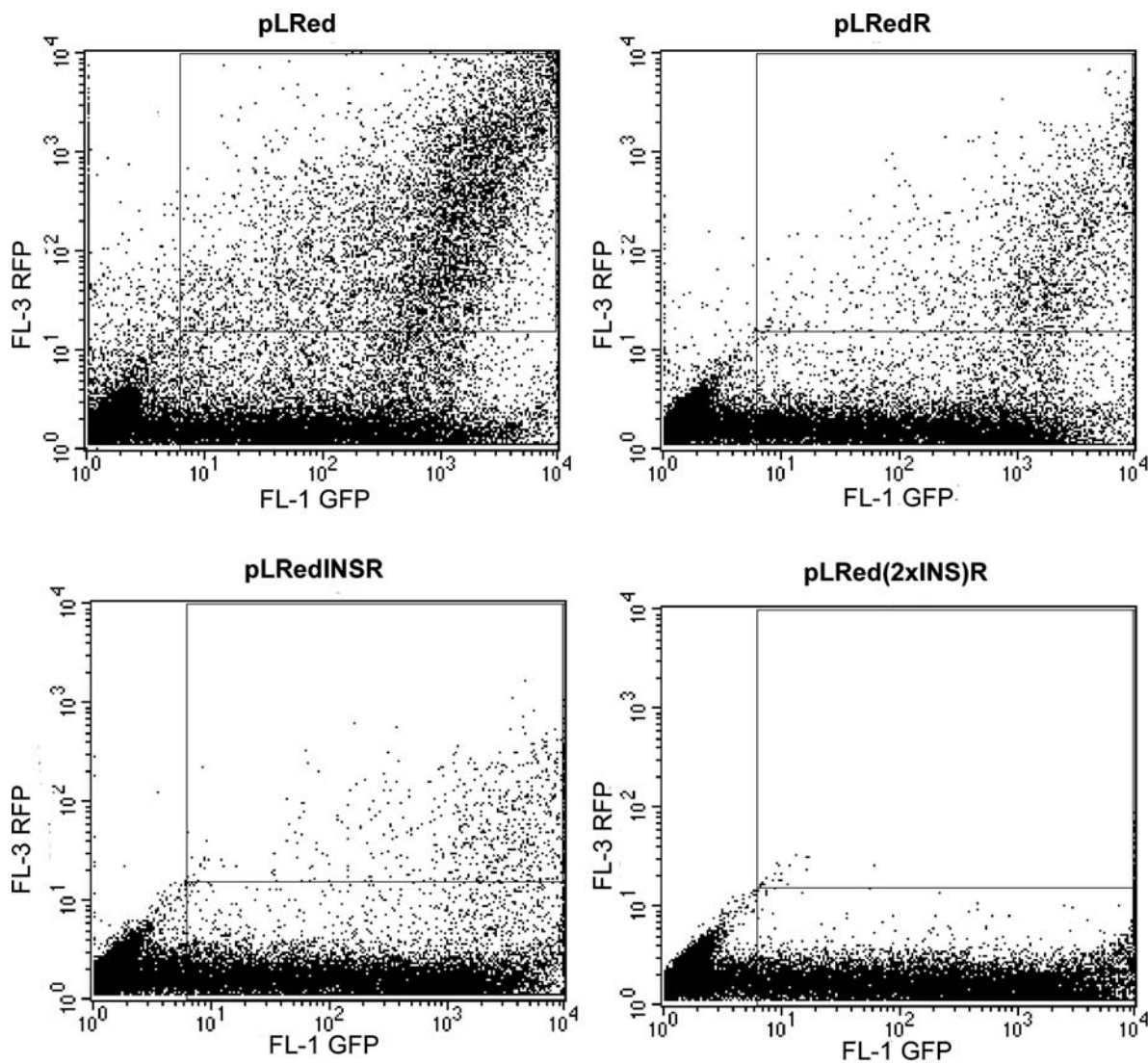
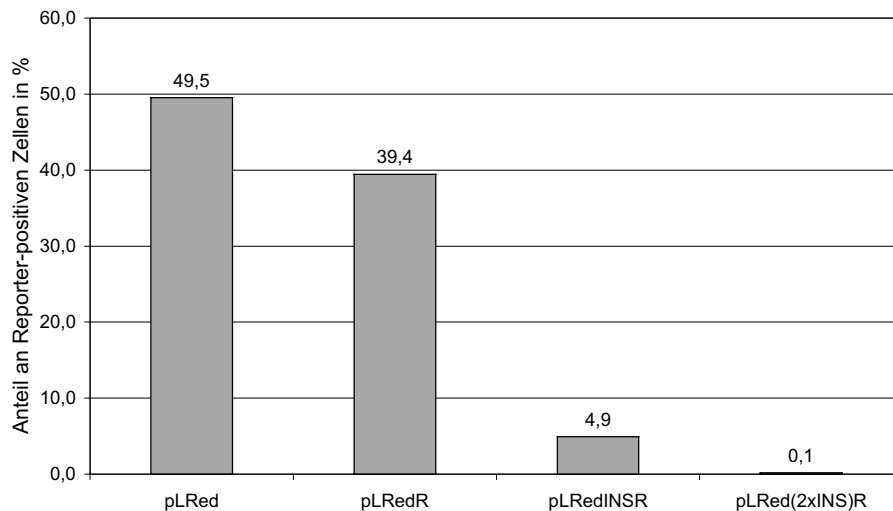


Abbildung 3.7: Vier Dot Plots eines FACS-Experiments. Mit den Plasmiden pLRed, pLRedR, pLRedINSR und pLRed(2xINSR)R wurden HeLa-Tat Zellen transfiziert und einer FACS-Analyse unterzogen. Auf der x-Achse ist jeweils logarithmisch die Intensität der grünen Fluoreszenz des GFP aufgetragen, auf der y-Achse die der roten Reporter-Fluoreszenz von RFP. Jeder Punkt repräsentiert eine Zelle. Die nadelförmige Population im linken unteren Eck ist jeweils die Population der nicht transfizierten Zellen. Der Quadrant oben rechts stellt die Population der doppelt fluoreszierenden Zellen dar. Die Zahl der analysierten Zellen variierte in den Experimenten zwischen $1,5 \times 10^4$ und $2,4 \times 10^4$ Zellen.

Die Auswertung der Daten erfolgte wie im Methodenteil beschrieben und konnte grundsätzlich auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden: (i) Es wurde der Anteil der RFP-positiven Zellen an der Zahl der insgesamt transfizierten Zellen (GFP-positiv) ermittelt oder (ii) es wurden aus Histogramm-Daten der GFP- und gleichzeitig RFP-exprimierenden Zellpopulation die jeweiligen Mediane der grünen und roten Fluoreszenz ermittelt und der Quotient gebildet.

Beide Auswertungsverfahren besitzen Vor- und Nachteile die noch diskutiert werden. Die Auswertungen der gezeigten Experimente mit beiden Verfahren sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

A)



B)

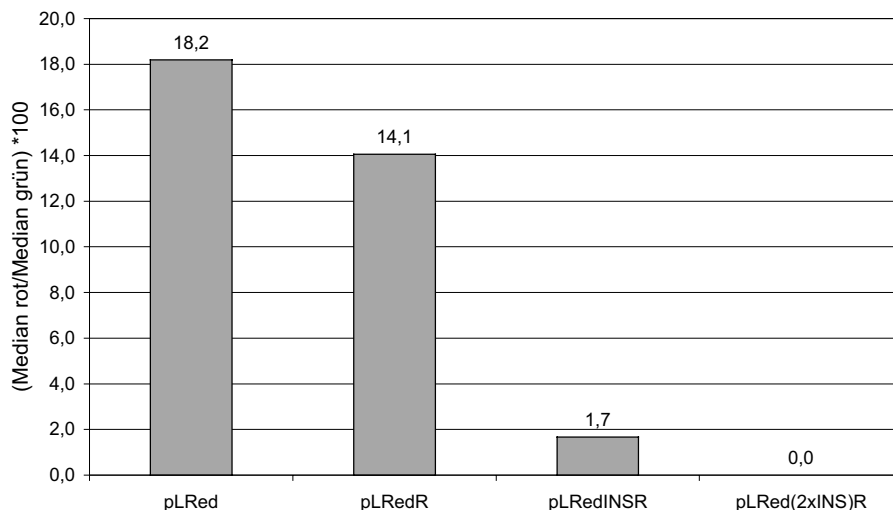


Abbildung 3.8: RFP-Expression der Plasmide pLRed, pLRedR, pLRedINSR und pLRed(2xINS)R nach Transfektion in HeLa-Tat. Es ist ein repräsentatives Experiment gezeigt (n=7). A) und B) wurden aus den Rohdaten desselben Experiments berechnet (siehe Abb. 3.7). A) Auswertung durch Ermittlung des Anteils an roten Zellen in der transfizierten Population. B) Auswertung durch Bildung eines Quotienten der roten und grünen Fluoreszenz der doppelt fluoreszierenden Population. Für pLRed(2xINS)R kann hier kein Wert ermittelt werden, da die Anzahl der doppelt fluoreszierenden Zellen gegen Null geht.

Deutlich zu erkennen ist, dass das Niveau der Expression von RFP (standardisiert auf die GFP-Expression) bei beiden Auswertungsmethoden von pLRed über pLRedR, pLRedINSR nach pLRed(2xINS)R deutlich abnimmt. Dies lässt sich damit erklären, dass mit wachsendem Anteil an INS-Bereichen auf der RNA die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die entsprechende RNA nicht ins Zytoplasma zur Translation gelangt, sondern vorher im Zellkern zurückgehalten und abgebaut wird. Auswertungsbedingt kann für pLRed(2xINS)R bei der zweiten Methode kein Wert berechnet werden, da die Zahl der doppelt fluoreszierenden Zellen in diesem Fall in der Regel Null ist, und daher zur Berechnung durch Null dividiert werden müsste.

Es konnte also grundsätzlich gezeigt werden, dass die INS-Elemente tatsächlich auf RNA-Ebene eine die Reporter-Expression unterdrückende Funktion erfüllen.

Wurden in einem weiteren Ansatz diese Plasmide in Zellen transfiziert, die nicht konstitutiv Tat exprimierten, wie z.B. HeLa Zellen, kam es bei keinem der Plasmide nach 24 h zu einer detektierbaren Expression von RFP. Lediglich einzelne Zellen ($\ll 0,1\%$) in den Zellkulturschalen zeigten ein abweichendes Verhalten und entwickelten rote Fluoreszenz. Dieses Experiment zeigte also ebenfalls, dass die entwickelten Konstrukte in ihrer Expression auf HIV-1 Tat angewiesen waren.

Nach mehreren Tagen (72 h oder mehr) der Expression entwickelt sich aber, besonders bei pLRed, in einem gewissen Prozentsatz (1-2%) der Zellen eine moderate RFP-Expression (Daten nicht gezeigt), die aber für die hier durchgeführten Assays nicht relevant war, da diese spätestens 48 h nach der Transfektion bereits abgeschlossen waren.

Induktion der RFP-Expression durch Tat

Um zu überprüfen, ob sich das Plasmid pLRed ebenfalls für eine Quantifizierung der dosisabhängigen Transaktivierung durch Tat eignet, wurden HeLa Zellen mit 1 μg von pLRed, 100 ng pFred143 und steigenden Mengen pCTat transfiziert. Um durch die steigenden Mengen an Tat-Expressionsplasmid nicht die Transfektion des Reporter-Plasmids zu beeinflussen, wurden alle Ansätze immer auf eine gleiche Menge Plasmid mit pBsPL aufgefüllt.

Abbildung 3.9 zeigt die dosisabhängige Aktivierung der Reporter-Expression durch Tat.

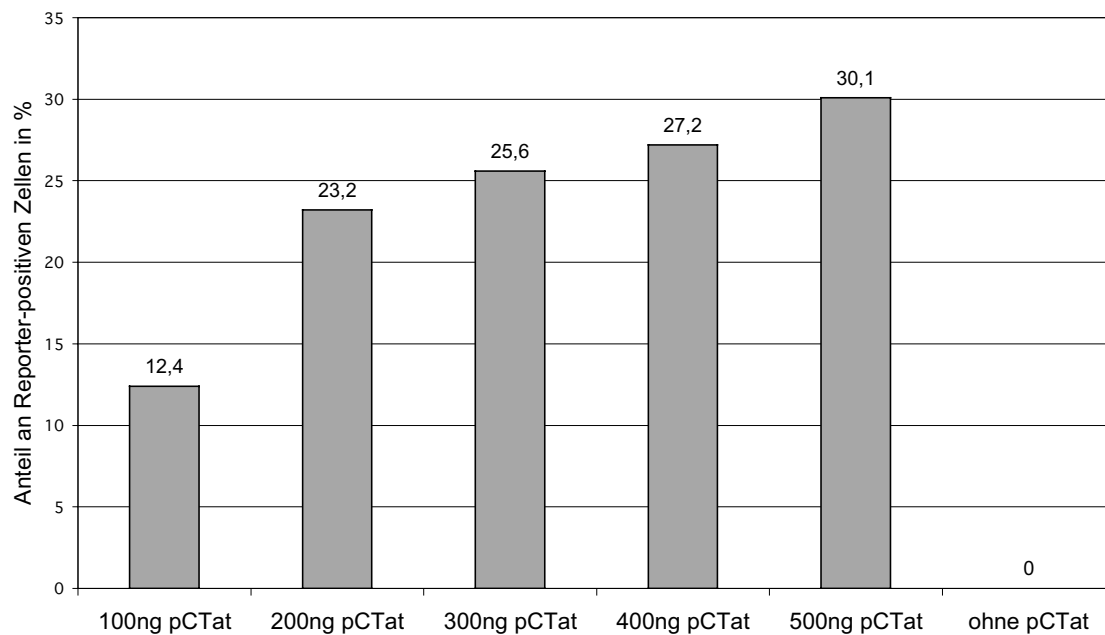


Abbildung 3.9: Dosisabhängige Aktivierung der RFP-Expression von pLRed in HeLa Zellen. Bei etwa 200 ng pCTat ist bereits eine fast maximale Transaktivierung erreicht. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment (n=4).

Wie die Experimente zeigen, eignete sich das Reporter-Plasmid pLRed sehr gut um die Transaktivierungseigenschaften von Tat zu analysieren. Die Experimente zeigten aber auch, dass in den HeLa Zellen nicht dieselbe Stärke der RFP-Expression erreicht wird wie in HeLa-Tat Zellen (s. Abb. 3.8). Dies hing offenbar einerseits mit der besseren Transfizierbarkeit der HeLa-Tat Zellen zusammen (bis zu 20% mehr GFP-positive Zellen als bei HeLa), andererseits mit der konstitutiven Expression von Tat in den HeLa-Tat Zellen. Tat-Transaktivierungs-Experimente wurden auch mit den Astrozytomzelllinien U251 und U251-Neo, durchgeführt, wobei aber pLRed_{Quick}, verwendet wurde. pLRed_{Quick} eignet sich, wie bereits weiter oben erwähnt, besonders als Expressionsreporter in metabolisch weniger aktiven oder schlecht zu transfizierenden Zellen. Es wurden mehrere Experimente analog zu den bereits für HeLa Zellen beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Eines davon ist in Abbildung 3.10 gezeigt.

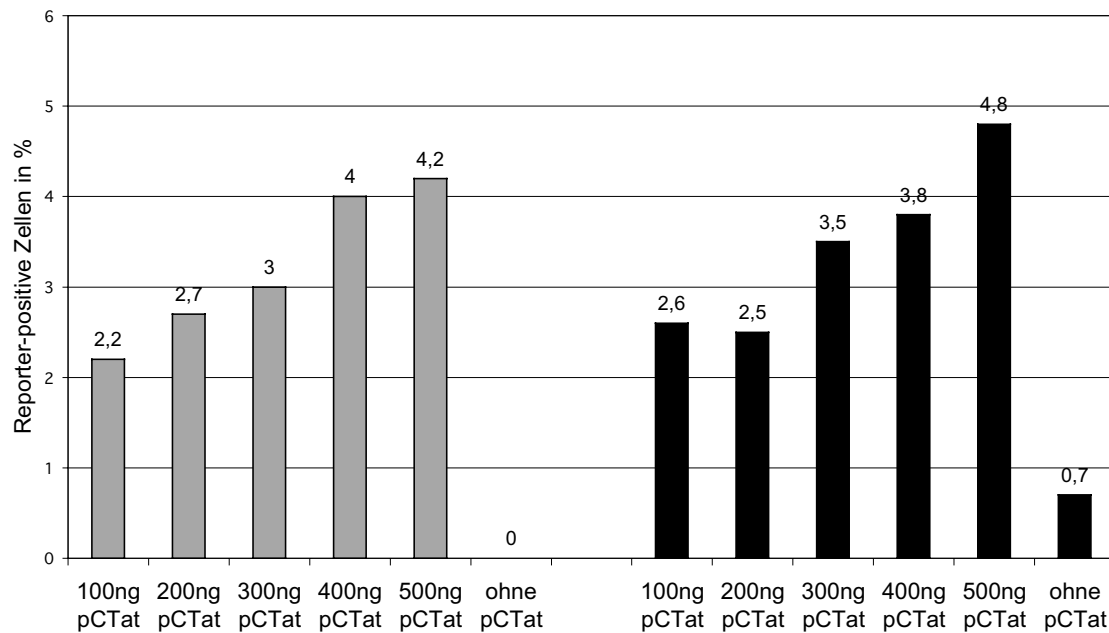


Abbildung 3.10: Tat-Transaktivierung in U251 Zellen (links, graue Balken) und U251-Neo (rechts, schwarze Balken) mit steigenden Mengen pCTat.

Auch in U251 und U251-Neo Zellen kann eine konzentrationsabhängige Transaktivierung beobachtet werden, die aber deutlich niedriger liegt als in HeLa Zellen (etwa 8 fach) und auch bei 500 ng pCTat noch keine Sättigung zu zeigen scheint. Das dargestellte Experiment zur Tat-Transaktivierung ist aber unter mehreren durchgeführten das Einzige das eine Auswertung erlaubte und es ist daher nicht sicher, ob es wirklich als repräsentativ anzusehen ist. In der Regel war bei den anderen Experimenten die Transfektionseffizienz so gering (<1%), dass eine FACS-Analyse nicht möglich war (in einem Fall war jedoch auch die GFP-Expression so unerwartet stark, dass nicht mehr ausgewertet werden konnte).

Induktion der RFP-Expression durch Rev

Nach Klärung der Tat-Abhängigkeit der Reporter-Expression war nun eine weitere wichtige Frage, ob sich der beobachtete RNA-destabilisierende Effekt der INS-Elemente in pLRed(2xINS)R durch die Anwesenheit des Rev Proteins, zumindest zum Teil, wieder aufheben ließ. Die grundsätzliche Voraussetzung der Bindung von Rev an die Reporter-RNA war durch die Anwesenheit der RRE gegeben.

Die Auswertung eines Experiments zur Feststellung, ob Rev diese Funktion in einem Reporter-Assay auszuführen vermag, ist in Abbildung 3.11 dargestellt. pLRed(2xINS)R führte, wie auch in Abbildung 3.8 gezeigt, ohne die Anwesenheit von Rev nicht zu einer feststellbaren Expression von RFP. Es wurde daher in einem Experiment eine Transfektion von pLRed(2xINS)R in HeLa-Tat Zellen einmal mit und einmal ohne Kotransfektion eines RevGFP-Expressionsplasmids gegenübergestellt. Hierzu wurde das RevGFP-Expressionsplasmid pCsRevsg143 gewählt, das auf dem Plasmid pFred143 aufbaut und in diesem Fall ein RevGFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-"immediate early" Promotors exprimiert.

Das RevGFP Fusionsprotein kann gleichzeitig als Transfektionskontrolle durch seine GFP-Fluoreszenz und als Transaktivator dienen, da es als funktionell aktives Protein bereits beschrieben wurde (Stauber, Gaitanaris et al. 1995). pCsRevsg143 ist, abgesehen von der Anwesenheit des *rev* Gens, identisch aufgebaut wie pFred143. Dies gewährleistet, dass keine unbekanntem Einflüsse bei der Transfektion und Expression die Auswertung der Daten erschweren.

Abbildung 3.11 stellt die Transfektion von pLRed(2xINS)R einmal mit Kotransfektion von pFred143 und mit Kotransfektionen von steigenden Mengen an pCsRevsg143 gegenüber. Hierfür wurden HeLa-Tat Zellen in 6-Loch Platten ausgesät und jeweils immer 1 μ g Reporter-Plasmid pLRed(2xINS)R zusammen mit 200 ng CMV-getriebenem Expressions-Plasmid transfiziert. Beispielsweise also 180 ng pFred143 und 20 ng pCsRevsg143, ergibt 200 ng GFP-Expressionsplasmid. So war gewährleistet, dass die exprimierte Menge an GFP näherungsweise bei allen Transfektionen konstant blieb und auch Effekte durch Transfektion promotorhaltigen Plasmids ausgeglichen waren.

Die Experimente wurden ausgewertet, indem der Anteil der RFP-positiven Zellen an der transfizierten Population ermittelt wurde (s. oben beschriebene Methode (i)), da bei der Verwendung des Plasmids pLRed(2xINS)R keine doppelt fluoreszierende Population in der Kontrolle ohne Rev entsteht (s. Abb. 3.8).

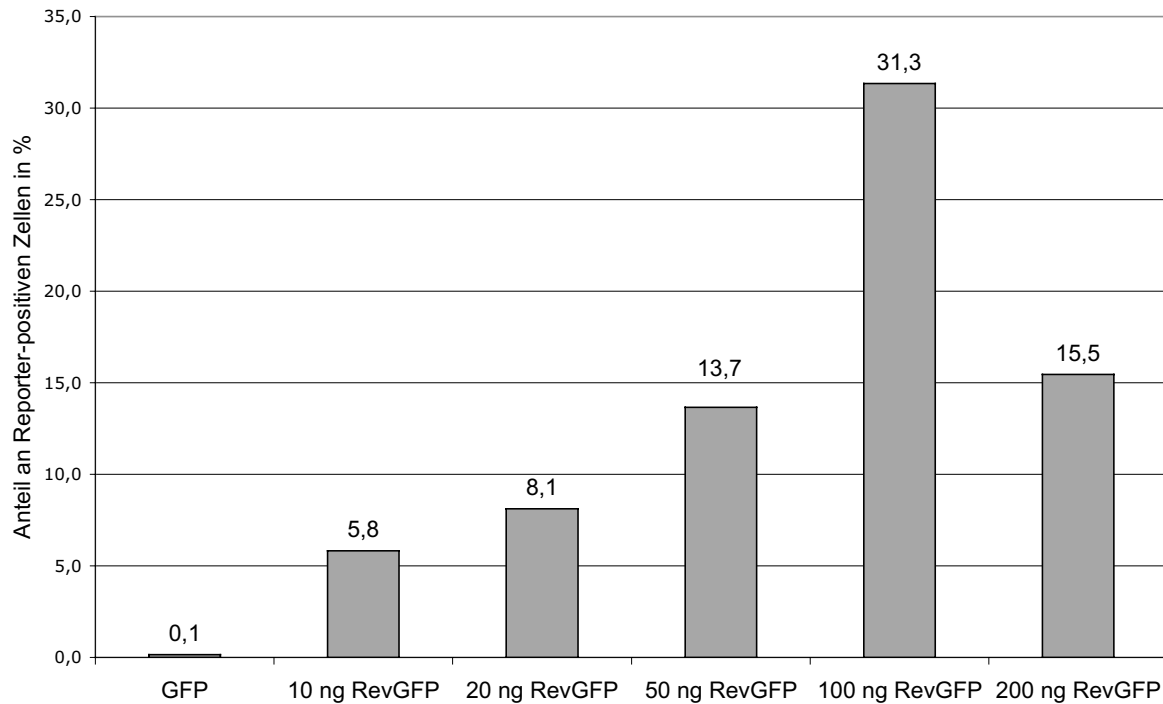


Abbildung 3.11: Dosisabhängige Induktion der RFP-Expression in HeLa-Tat Zellen durch RevGFP. Das Experiment wurden in 6-Loch Platten mit HeLa-Tat Zellen und 1 μ g pLRed(2xINS)R durchgeführt. Es ist ein repräsentatives Experiment gezeigt (n=8).

Deutlich zu sehen ist die Expression von RFP in einem großen Anteil von Zellen bei Kotransfektion von RevGFP Expressionsplasmid. Hingegen ist praktisch keine Expression des Reporter-Proteins RFP in den Zellen zu sehen die nur mit GFP-Expressionsplasmid transfiziert wurden. Die mit der Konzentration von RevGFP zunehmende Expression von RFP ist bis zu einer Menge von 100 ng RevGFP zu beobachten. Ob die deutliche, stets beobachtete, Abnahme der RFP-Expression bei 200 ng RevGFP auf eine zelluläre Ursache zurückgeht oder durch die Methodik der Auswertung bedingt ist, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Diese Ergebnisse legten nahe, dass das in HeLa-Tat Zellen entwickelte System grundsätzlich zur Überprüfung der Rev-Funktion anwendbar ist, allerdings wurde vor der weiteren Optimierung und Etablierung des Systems noch ein weiterer Test durchgeführt. Es wurde erprobt, ob die als transdominant negativ bekannte Wirkung der Rev-Mutante M10bl (siehe Einleitung) in der Lage ist die Aktivierung der RFP-Expression durch RevGFP zu unterdrücken.

Dazu wurden Experimente angesetzt, die entsprechend den oben beschriebenen Rev-Transaktivierungs-Experimenten durchgeführt wurden. Hierbei wurde jeweils 50 ng RevGFP Expressionsplasmid (+150 ng pFred143) verwendet und dieses einmal

mit 50 ng RevM10bIGFP Expressionsplasmid (+100 ng pFred143) und einmal mit 100 ng RevM10bIGFP Expressionsplasmid (+50 ng pFred143) kotransfiziert. Das Ergebnis der Experimente ist in Abbildung 3.12 dargestellt.

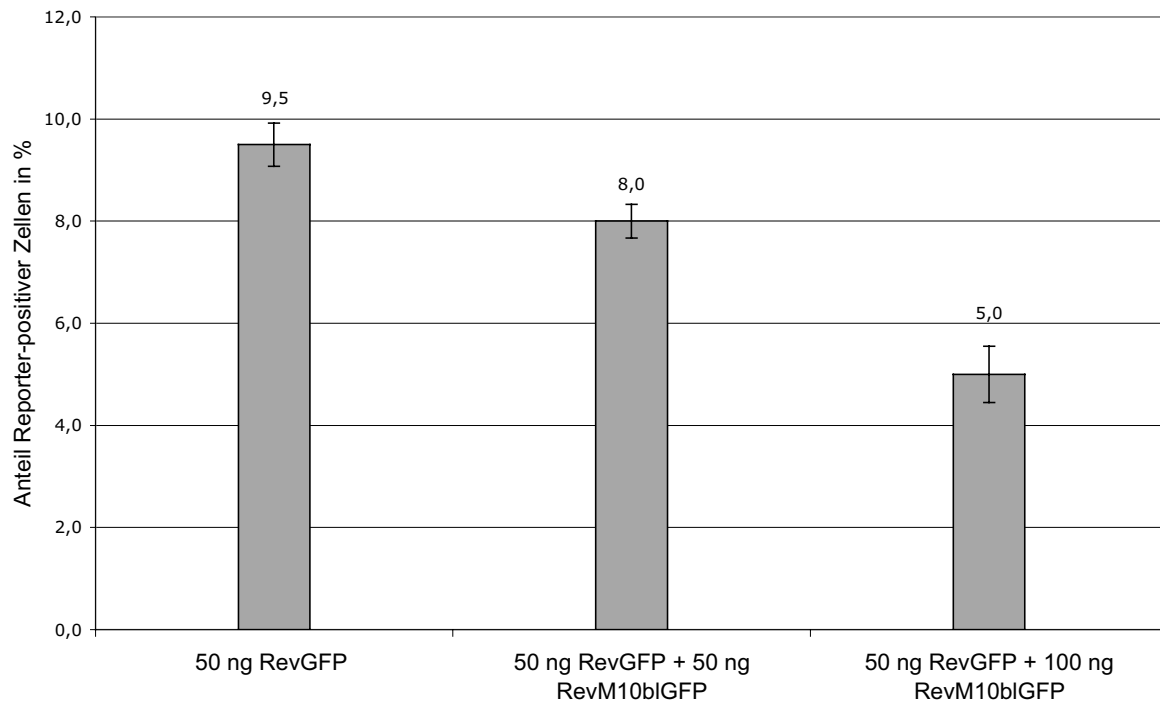


Abbildung 3.12: Inhibition der RevGFP vermittelten RFP-Expression durch transdominant negativ wirkendes RevM10bIGFP. Mittelwerte der Daten aus vier repräsentativen Experimenten und die Standardabweichungen sind gezeigt.

Wie Abbildung 3.12 zeigt, war RevM10bIGFP in der Lage die RevGFP-vermittelte RFP-Expression zumindest teilweise zu unterdrücken. Dies legte nahe, dass die Steigerung der RFP-Expression durch RevGFP einem spezifischen Mechanismus unterlag, der ebenso spezifisch durch RevM10bIGFP wieder gehemmt werden konnte. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass sich dieses System für die Analyse und Identifikation inhibitorischer Faktoren oder Rev-Mutanten eignet.

Die gezeigten Ergebnisse stellen zusammen genommen eine gute Grundlage für die weitere Nutzung des Reporter-Systems für Funktionsanalysen bzw. die Suche nach inhibitorischen Faktoren dar.

3.1.3 Analyse von neu identifizierten INS-Regionen im HIV-Genom

Als erste experimentelle Anwendung des neuen, fluoreszenzbasierten Reporter-Systems wurde ein Projekt zur Analyse von Sequenzen, die potenziell RNA-destabilisierend wirken sollten, gewählt. Das Reporter-System sollte in der Lage sein, eine Veränderung der Reporter-RNA-Stabilität in derselben Weise in einer Veränderung der Fluoreszenz abzubilden.

Wie bereits erwähnt, ist die Anwesenheit von Elementen, die die Expression von HIV mRNAs inhibieren, so genannten "inhibitory sequences" (INS), im HIV-Genom schon lange bekannt und untersucht. Experimentell bestätigt werden konnten in unterschiedlichen Assays verschiedene Regionen, besonders im Bereich der *gag* und *env* Sequenzen. Unklar ist aber der Mechanismus der Inhibition durch diese Regionen und die Charakteristika der an der Inhibition beteiligten Sequenzelemente. Eine Sequenzanalyse dieser experimentell ermittelten Regionen führte nicht zur Identifizierung eines einfachen, konservierten Sequenzmotivs. Es wurden zwar Gemeinsamkeiten dieser Regionen zueinander gefunden, wie der generelle AT-Reichtum (der aber prinzipiell für HIV ebenso gilt), aber es konnten trotzdem keine weiteren Regionen mit INS-Aktivität durch Sequenzvergleiche ermittelt werden.

Am Institut für Säugetiergenetik der GSF in der AG BIODV wurde von Dr. R. Schneider und PD Dr. T. Werner ein neuer Weg zur Identifizierung INS-aktiver Bereiche im HIV-Genom gegangen.

Mit einem Satz an Trainingssequenzen, die experimentell bestätigte INS-Aktivität hatten, wurde eine Matrix-basierte Analyse gestartet, die zur Ermittlung von vier Matrix-Motiven führte (Wolff, Brack-Werner et al. 2003). Eine wichtige Erkenntnis, die aus den Matrix-basierten Analysen gewonnen wurde, war die, dass NICHT ein einziges Motiv ausreicht um alle experimentell bestätigten Bereiche wieder zu identifizieren. Eine weitere war die geringe Sequenzkonservierung der identifizierten Bereiche zueinander.

Wenn die Matrix-Motive im Zusammenhang mit der Sequenz des HIV-Genoms betrachtet werden, ergeben sich einige Bereiche, in denen „Treffer“ der vier Matrizes gehäuft auftraten. Diese wurden jeweils zusammengefasst und bekamen als INS-Regionen mit einer Länge von etwa 300-500 bp die Bezeichnungen INS4 bis INS10. INS1 und INS2 waren bereits zuvor experimentell bestätigt worden (Maldarelli, Martin et al. 1991);(Schwartz, Felber et al. 1992);(Schneider, Campbell et al. 1997).

Für eine Analyse mit dem entwickelten Reporter-System wurden mehr oder weniger willkürlich die INS-Regionen 4, 5, 6, 7 und 10 gewählt. Diese sind in Abbildung 3.13 in ihrem genomischen Kontext zu den viralen Genen *gag*, *pol*, *env* und *nef* schematisch dargestellt.

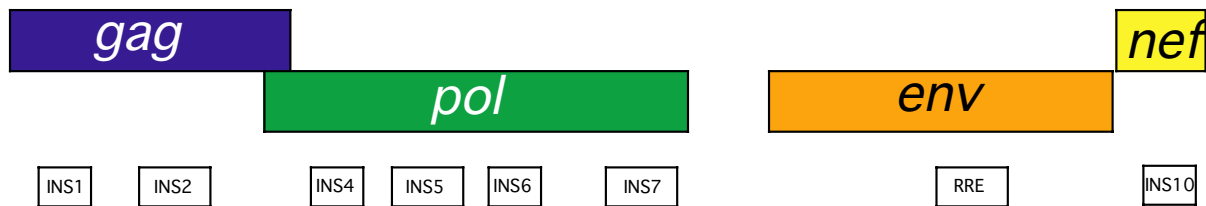


Abbildung 3.13: Schematische Übersicht über die in den Studien verwendeten INS-Elemente im Kontext des HIV-Genoms. *Gag*, *pol*, *env* und *nef* Gene sind farblich dargestellt. Einzelne INS-Elemente sowie die RRE in ihrer ungefähren Lage im HIV-Genom sind gezeigt. Darstellung nicht maßstabsgetreu. Weitere Gene sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

Die inhibitorische Aktivität der vorhergesagten INS-Regionen sollte hier experimentell bestätigt werden. Die ausgewählten INS-Regionen wurden mit Primern aus dem HXB2-Genom (das Plasmid HXB²-fbBamHI diente als Template) amplifiziert und 5'- sowie 3'- mit einer *Cla*I-Schnittstelle versehen. Außerdem wurde ebenfalls ein Bereich amplifiziert der sowohl INS5 als auch INS6 umfasste.

Die erhaltenen Amplifikate wurden mittels dieser Schnittstelle bidirektional in das Basiskonstrukt für die Untersuchungen pLRedR ligiert. Dies geschah entsprechend der Vorgehensweise wie bereits weiter oben für pLRedINSR beschrieben. Wurde beispielsweise INS4 in pLRedR ligiert, so wurde dabei pLRedINS4R erhalten, und so weiter. Abbildung 3.14 zeigt eine Übersicht über die Klonierung. Mit den erhaltenen Konstrukten wurden Transfektionen mit HeLa-Tat Zellen durchgeführt. Dies geschah im Prinzip wie bereits weiter oben und im Methodenteil beschrieben. Hervorzuheben ist, dass jeweils 100 ng pFred143 und 1 µg pLRedR, oder eine äquimolare Menge der anderen Plasmide, pro Loch einer 6-Loch Platte transfiziert wurden (s. dazu auch 2.2.1, 2.2.2 und 2.2.5 im Methodenteil). Ein wichtiger Punkt im Ablauf der Experimente war, dass die Transfektionsmischung nach 5-6 h wieder von den Zellen gewaschen wurde und die Zellen möglichst nach genau 24 h geerntet, in PBS aufgenommen und analysiert wurden.

Die INS-Effekte der einzelnen Sequenzbereiche wurden dann dadurch berechnet, dass anhand von FACS-Histogram Daten die roten sowie grünen Fluoreszenz-Mediane der doppelt fluoreszierenden Zellpopulation ermittelt wurden. Danach wurde für alle Transfektionen eines Experiments der Quotient von rotem zu grünem Median gebildet, der Wert der mit pLRedR ermittelt wurde, auf 1 gesetzt und alle anderen Werte entsprechend diesem Referenzwert angeglichen.

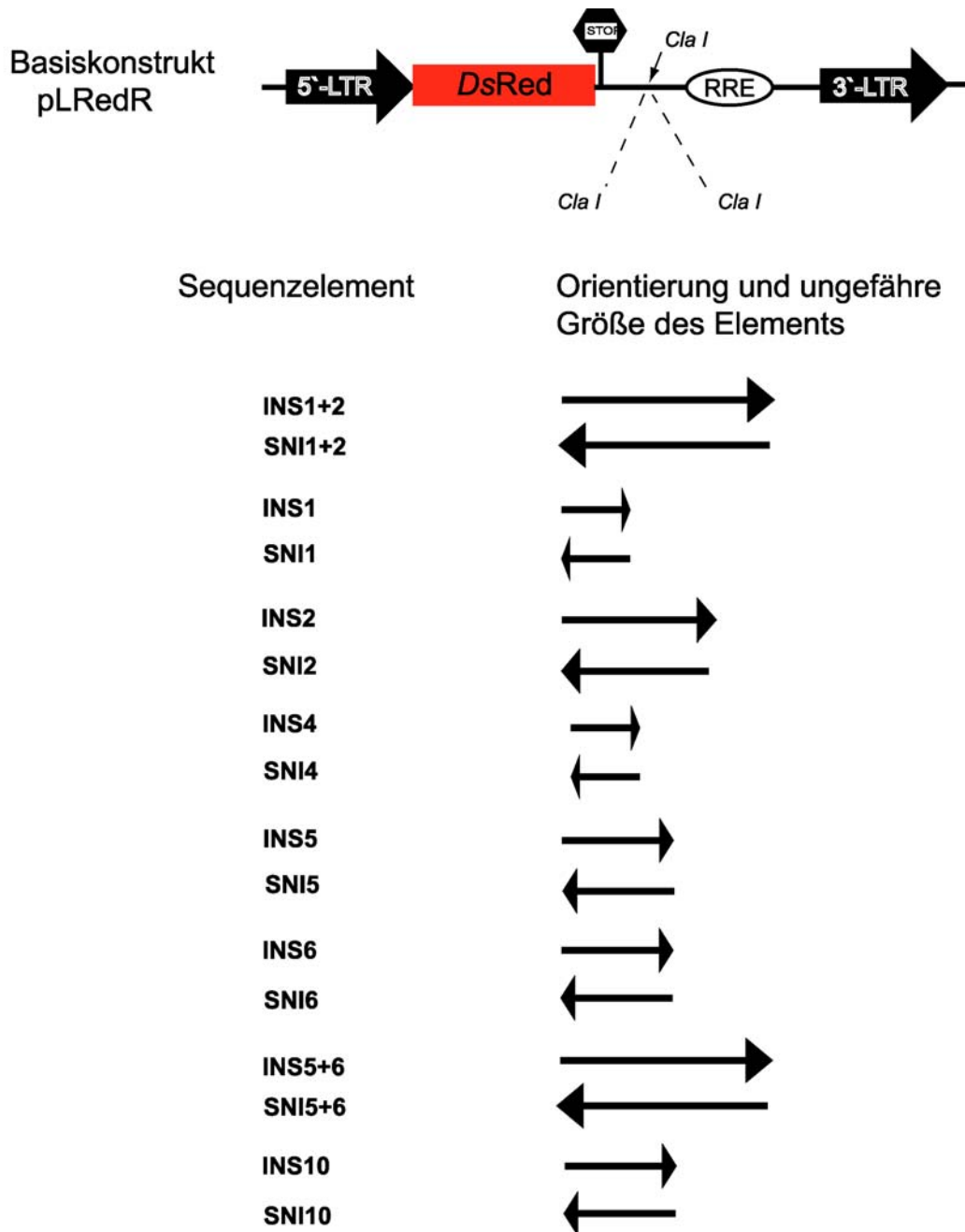


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der verwendeten INS-Konstrukte, die durch die Klonierung in den Basis-Vektor pLRedR erhalten wurden. 5'- und 3'-LTR: DsRed: ORF für das rot fluoreszierende Protein mit Translationsstopp. RRE: Rev Response Element das auf der transkribierten RNA enthalten ist. *Cla I*: Restriktionsstelle in die die einzelnen INS-Regionen eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments sind in Abbildung 3.15 abgebildet. Ein hoher Wert stellt dabei eine, relativ gesehen, geringe RFP-Fluoreszenz dar, d.h. einen hohen inhibitorischen Effekt der RNA-Elemente. Für INS1 und INS2 war bekannt, dass diese Elemente nur in Plusstrang-Orientierung wirksam sind (Schneider, Campbell et al. 1997). Die Konstrukte mit INS5 bzw. INS6 zeigen in Negativstrang-Orientierung ebenfalls keinen inhibitorischen Effekt. Tabelle 3.1 zeigt fünf Experimente zur Ermittlung von INS-Aktivität, von denen das erste das in Abbildung 3.15 gezeigte ist.

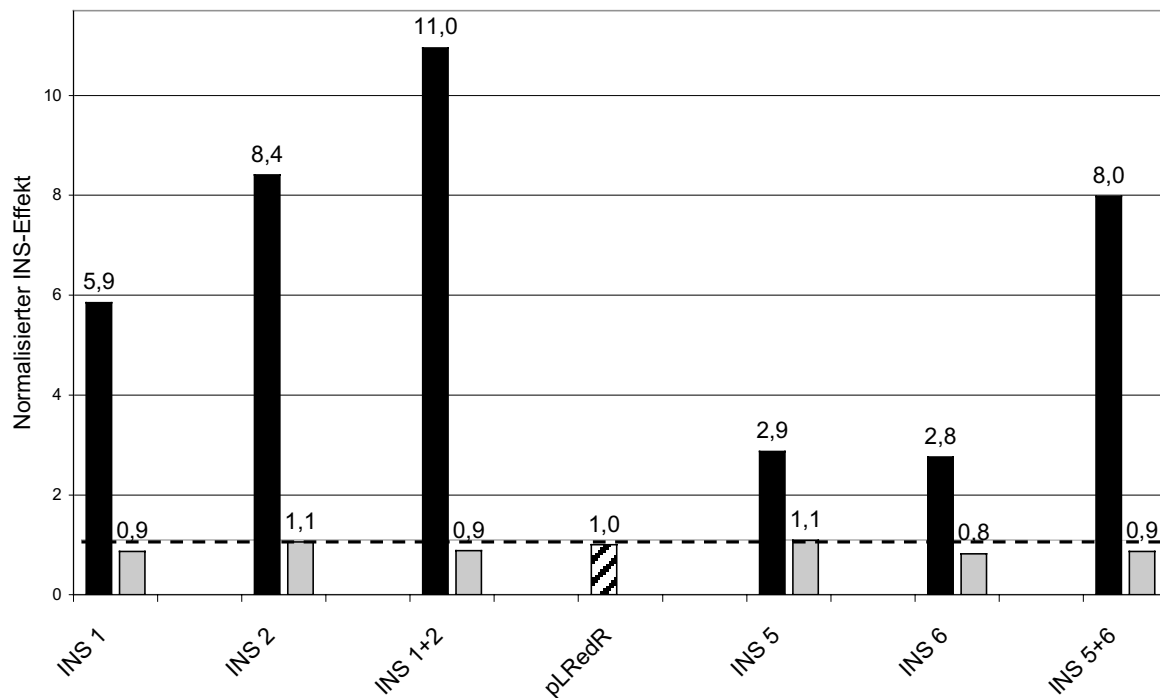


Abbildung 3.15: INS-Effekte der einzelnen Konstrukte, normalisiert auf die RFP-Expression von pLRedR, die auf 1 gesetzt wurde. Schwarze Balken: INS-Element im Konstrukt in Plusstrang-Orientierung; Graue Balken: INS-Element im Konstrukt in Negativstrang-Orientierung; Schraffierter Balken: Basiskonstrukt pLRedR; Gestrichelte Linie: Referenzlinie des 1fachen (=nicht vorhandenen) INS-Effekts. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

Exp.	INS 1		INS 2		INS 1+2		R	INS 5		INS 6		INS 5+6	
	+	-	+	-	+	-		+	-	+	-	+	-
1	5,9	0,9	8,4	1,1	11,0	0,9	1	2,9	1,1	2,8	0,8	8,0	0,9
2	5,6	0,9	9,9	1,2	13,7	0,9	1	3,0	1,2	1,7	0,6	8,3	0,9
3	6,4	1,0	16,3	1,2	18,9	1,0	1	3,3	1,0	1,8	0,6	10,0	0,9
4	9,5	0,9	6,4	0,4	26,2	1,3	1	5,0	1,1	4,3	0,6	7,1	1,1
5	5,1	0,8	6,0	0,8	12,0	0,9	1	2,4	1,4	2,6	0,8	4,6	0,8
M	5,9	0,9	8,4	1,1	13,7	0,9	1	3,0	1,1	2,6	0,6	8,0	0,9
p	<0,01		<0,01		<0,01			<0,01		<0,01		<0,01	

Tabelle 3.1: Experimentelle Daten zu fünf INS-Effekt Experimenten. Experiment 1 ist in Abbildung 3.15 graphisch dargestellt. M: Median der Einzelwerte; p: statistischer p-Wert; +: Plusstrang-Orientierung; -:Negativstrang-Orientierung; R: pLRedR

Wie bereits für das Konstrukt pLRed(2xINS)R gezeigt, läßt sich der inhibierende Effekt der RNA-Elemente durch die Expression von Rev wieder aufheben. Es wurde untersucht, ob dies auch analog für die neu identifizierten Elemente gilt. Abbildung 3.16 stellt diese Analyse zur Rev-vermittelten Steigerung der RFP-Expression dar. Das Experiment wurde analog zu den Experimenten mit pLRed(2xINS)R durchgeführt, mit der Abwandlung, dass 1 µg pLRedR, beziehungsweise äquimolare Mengen der anderen Reporter-Plasmide, zusammen mit 100 ng pCsRevsg143 oder 100 ng pFred143 transfiziert wurden. Die Auswertung erfolgte in diesem Fall durch die Ermittlung der Anteilserhöhung an Reporter-positiven Zellen bei Kotransfektion von pFred143 im Vergleich zur Kotransfektion von pCsRevsg14. Ergab die Koexpression von RevGFP und dem Plasmid pLRedINS1R beispielsweise eine Erhöhung der RFP-positiven Zellen auf die dreifache Zahl im Vergleich zur GFP Koexpression, dann ergab sich daraus der Wert „3“. Die an sich schon sehr hohe Zahl an RFP-positiven Zellen bei den Plasmiden mit Elementen in Negativstrang-Orientierung, ließ sich auch durch Expression von RevGFP kaum mehr steigern. Ein Grossteil der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde in (Wolff, Brack-Werner et al. 2003) zusammengestellt.

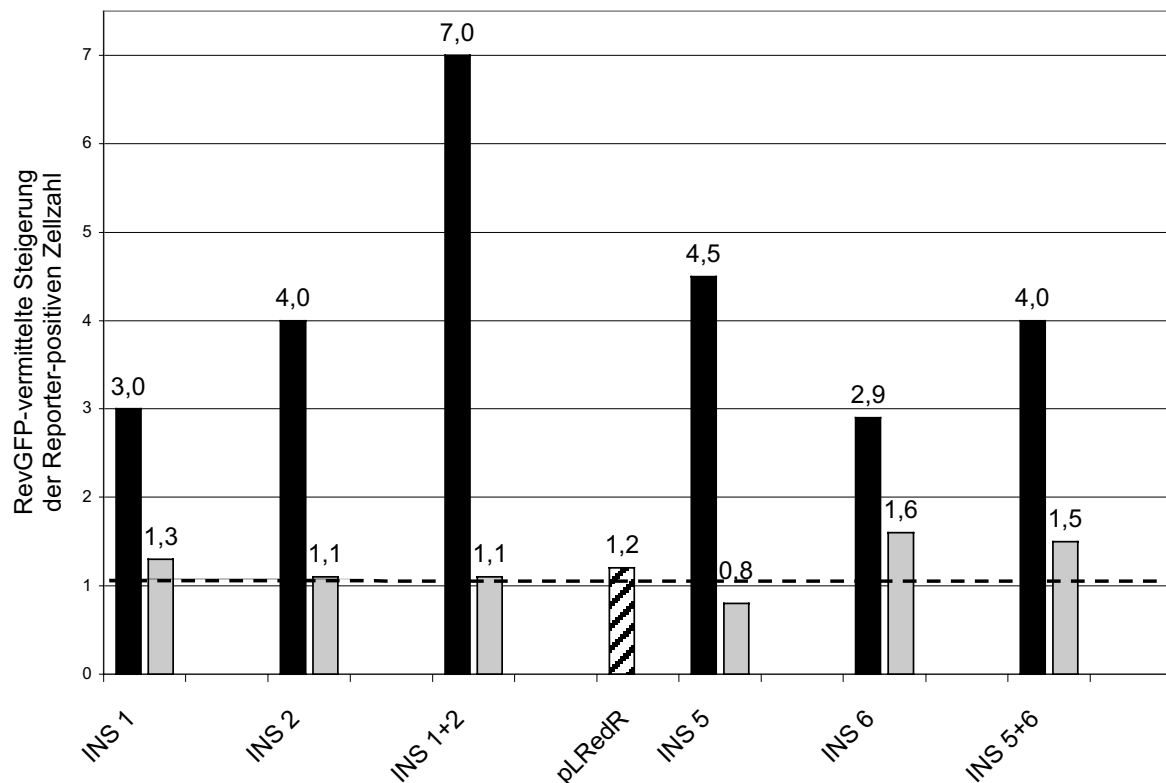


Abbildung 3.16: RevGFP-vermittelte Steigerung des Anteils an Reporter-positiven Zellen. Die Werte der Induktion durch RevGFP über den Experimenten mit GFP sind dargestellt. Schwarze Balken: INS-Element im Konstrukt in Plusstrang-Orientierung; Graue Balken: INS-Element im Konstrukt in Negativstrang-Orientierung; Schraffierter Balken: Basiskonstrukt pLRedR; Gestrichelte Linie: Referenzlinie der 1fachen (=nicht stattfindenden) Induktion. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

Im Laufe der Untersuchungen wurden, abgesehen von den als INS 1, 2, 5 und 6 bezeichneten INS-Elementen, noch weitere potenzielle INS-Kandidaten getestet. Diese waren die bioinformatisch vorhergesagten INS-Regionen 4, 7 und 10. Allerdings stellte sich heraus, dass diese Regionen keine inhibitorische Aktivität im Vergleich zu pLRedR zeigten (INS4, INS7), oder in Negativstrang Orientierung eine sehr viel stärkere inhibitorische Wirkung als die Plusstrang Orientierung zeigte (INS10). Die Untersuchungen dieser Regionen wurden deshalb nach wenigen Versuchen wieder abgebrochen. Ein im Laufe dieser Untersuchungen durchgeführtes Experiment ist in Abbildung 3.17 abgebildet.

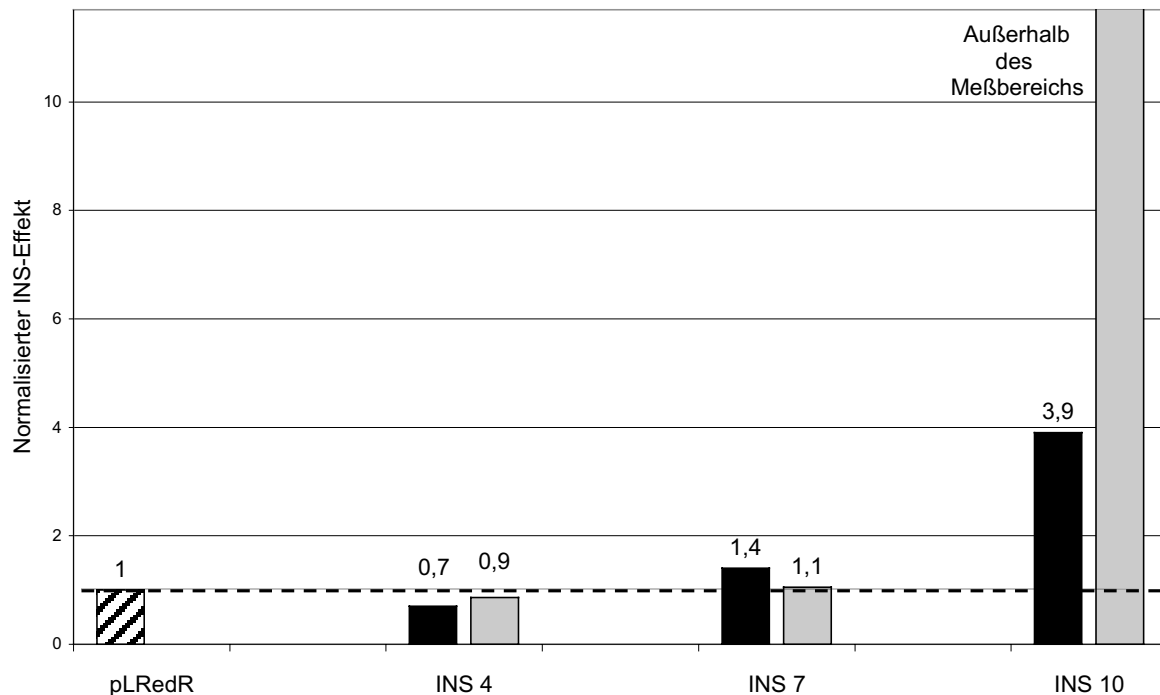


Abbildung 3.17: INS-Effekte zusätzlich getesteter Konstrukte, normalisiert auf die RFP-Expression von pLRedR, die auf 1 gesetzt wurde. Schwarze Balken: INS-Element im Konstrukt in Plusstrang-Orientierung; Graue Balken: INS-Element im Konstrukt in Negativstrang-Orientierung; Schraffierter Balken: Basiskonstrukt pLRedR; Gestrichelte Linie: Referenzlinie des 1fachen (=nicht vorhandenen) INS-Effekts. Ein repräsentatives (?) Experiment ist gezeigt.

Wie aus der Abbildung 3.17 ersichtlich, kann für die mit INS4 und INS7 bezeichneten Sequenzen kein gesicherter INS-Effekt beobachtet werden. Dagegen konnte bei INS10 in der Plusstrang-Orientierung zwar ein Effekt beobachtet werden, aber das Konstrukt mit INS10 in der Negativstrang-Orientierung zeigte eine vollständige Unterdrückung der RFP-Expression, was theoretisch einem unendlichen INS-Effekt entspräche. Eine RFP-Expression bei pLRedSNI10R war selbst nach 72 h nicht messbar und ließ sich ebenfalls nicht durch RevGFP induzieren. Erst nach deutlich mehr als 72 h konnte in Zellen die mit diesem Konstrukt transfiziert wurden eine sehr schwache rote Fluoreszenz festgestellt werden.

Gründe für das unerwartete Verhalten dieser drei INS-Bereiche werden noch diskutiert. Zwei weitere bioinformatisch vorhergesagte INS-Bereiche, INS 8 und 9, wurden im Rahmen dieser Untersuchungen nicht betrachtet.

3.1.4 Generierung der stabilen Reporter-Zelllinie HeLa-Tat ROD

Um ein möglichst schnell und einfach einzusetzendes System, sowie ein Maximum an Reproduzierbarkeit, zur Detektion von Tat- und Rev-Funktion zu erhalten, sollte eine Zelllinie etabliert werden, die das Reporter-Konstrukt pLRed(2xINS)R stabil integriert trug.

Es war zu erwarten, dass ein stabil integriertes Konstrukt immer eine gewisse Basis-Expression an RFP zeigen würde, da bei einer großen Menge an kontinuierlich transkribierten mRNAs aller Wahrscheinlichkeit nach ein gewisser Teil auch ohne Rev ins Zytoplasma zur Translation gelangen würde. Für DsRed1 ist bekannt, dass es aufgrund seiner außerordentlichen Stabilität und seiner obligatorischen Oligomerisierung toxisch auf Zellen wirken kann. Es war deshalb nicht klar, ob die Herstellung einer stabilen Zelllinie aufgrund dieser Tatsachen gelingen würde.

Um grundsätzlich zu klären, ob auch niedrige Mengen an exprimiertem RFP für die Zellen toxisch sind, wurde das Konstrukt pLRed in HeLa-Tat Zellen transfiziert und damit eine stabile Zelllinie generiert. Da auf dem Konstrukt pLRed kein Resistenzgen vorhanden ist, das eine Selektion der stabilen Transfektanten erlaubt, wurde nur durch Selektion mit dem FACS und nachfolgender Vereinzelung der Zellen eine stabile Zelllinie, HeLa-Tat RED, generiert. Diese weist ein moderates Expressions-Niveau an rot fluoreszierendem Protein auf, ohne sonst in irgendeiner erkennbaren Form von der parentalen Zelllinie HeLa-Tat abzuweichen. Die Zellteilungsrate war vergleichbar und auch die Morphologie nicht unterscheidbar. Einziger Unterschied ist die konstitutive rote Fluoreszenz der Zellen, sowie eine gewisse erkennbare Aggregation von RFP in der Zelle. Eine kontinuierliche Passagierung dieser Zelllinie über mehr als 6 Monate wurde ohne jegliche feststellbare Veränderung von den Zellen geduldet. Abbildung 3.18 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Zelllinie HeLa-Tat RED.

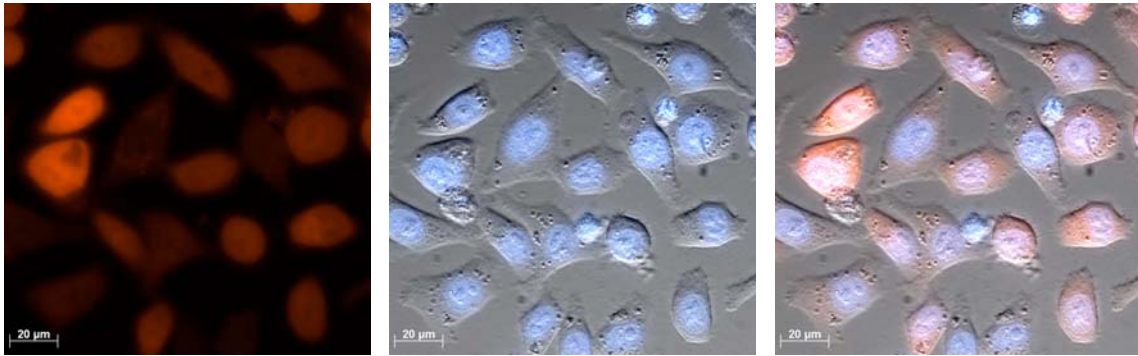


Abbildung 3.18: Die Zelllinie HeLa-Tat RED. Links: Roter Fluoreszenzkanal; Mitte: Interferenz (DIC)-Kontrast überlagert mit Hoechst33342 Kernfärbung; Rechts DIC, RFP und Hoechst33342 überlagert.

Die unproblematische Herstellung der Zelllinie HeLa-Tat RED zeigte, dass die zugrunde liegende Zelllinie HeLa-Tat grundsätzlich eine stabile Expression von DsRed1 übersteht und sich auch für die Generierung von Reporter-Zelllinien eignen müsste.

Daher wurde analog zur Herstellung der Zelllinie HeLa-Tat RED die Reporter-Zelllinie HeLa-Tat ROD (Red On Demand) hergestellt. Hierfür wurden einerseits HeLa-Tat Zellen mit dem Konstrukt pLRed(2xINS)R und andererseits HeLa Zellen mit pLRed(2xINS)R, pL3Tat und pSV40-Neo transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden in beiden Fällen unter G418-Selektion mehrere Passagen kultiviert und dann vereinzelt. Die herangewachsenen Klone wurden auf ihre Basis-RFP-Expression hin untersucht, dann zweigeteilt und ein Teil nach Transfektion mit pCsRevsg143 auf Induzierbarkeit der RFP-Expression durch RevGFP überprüft.

Beide Ansätze mit HeLa und HeLa-Tat Zellen führten zu, durch RevGFP induzierbaren, Reporter-Zelllinien.

Abbildung 3.19 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Reporter-Zellen, die mit pCsRevsg143 transfiziert wurden.

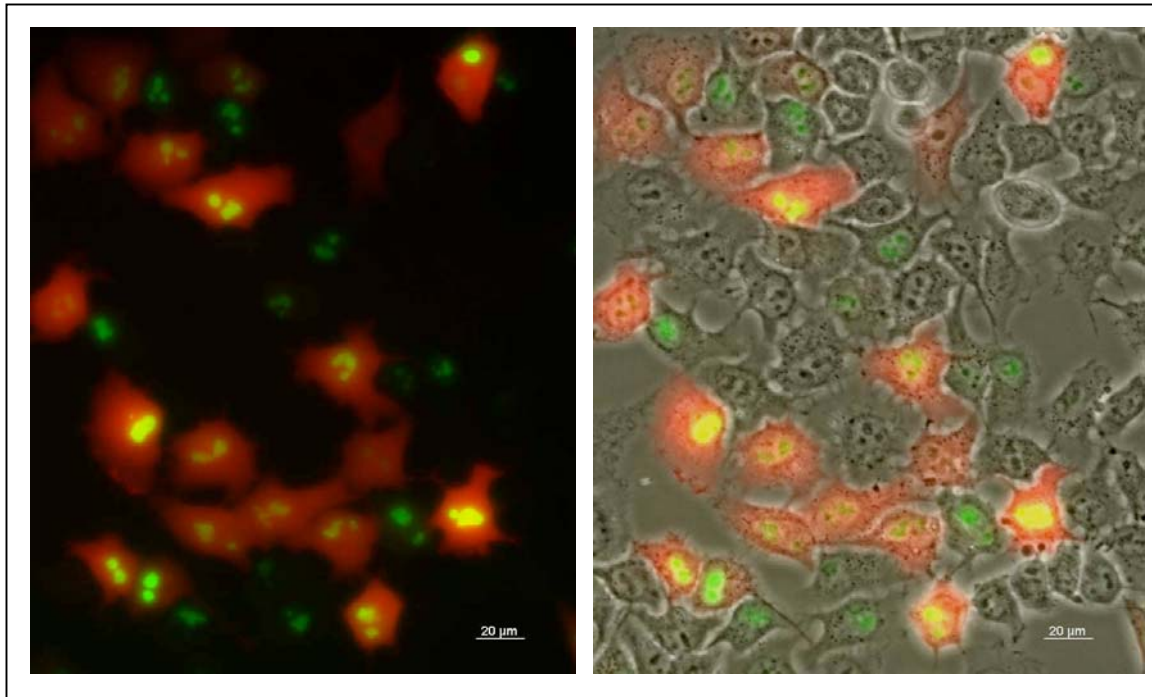


Abbildung 3.19: HeLa-Tat ROD Zellen (generiert aus HeLa-Tat) 24 h nach Transfektion mit pCsRevsg143. Links: Überlagerung von grüner Fluoreszenz (RevGFP) und roter Fluoreszenz (RFP-Reporterprotein). Rechts: Überlagerung von Phasenkontrastkanal, roter und grüner Fluoreszenz.

3.2 Funktionalitätstests von Rev-Konstrukten

Als erste Anwendung, und um die generierte Reporter-Zelllinie zu testen, wurde beschlossen mehrere verschiedene Rev-Mutanten bzw. Rev-Konstrukte auf ihre Funktionalität bezüglich der Aktivierung der RFP-Expression hin zu untersuchen. Dies sollte Aufschlüsse über den Zusammenhang Lokalisations-Phänotyp/Funktionalität geben. Tabelle 3.2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten, und zum großen Teil auch im Verlauf dieser Arbeit hergestellten, Rev-Konstrukte. Die Funktionalitätsstudien wurden mit der Zelllinie HeLa-Tat ROD, wie im Methodenteil unter 2.2.4 beschrieben, durchgeführt und ausgewertet.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 zusammengestellt und in Relation zu (nichtfunktionellem) GFP und voll funktionellem RevGFP gesetzt. Die Bedeutung dieser Ergebnisse soll später noch diskutiert werden.

Es soll aber vorweg genommen werden, dass der Funktionalitätstest auch unerwartete Ergebnisse brachte. Zwei fast ausschließlich zytoplasmatisch lokalisierende Mutanten RevEDR-GFP und SecSigRevGFP erwiesen sich im Assay überraschenderweise als funktionell aktiv. Eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines solchen Experiments mit RevEDR-GFP ist exemplarisch in Abbildung 3.20 gezeigt.

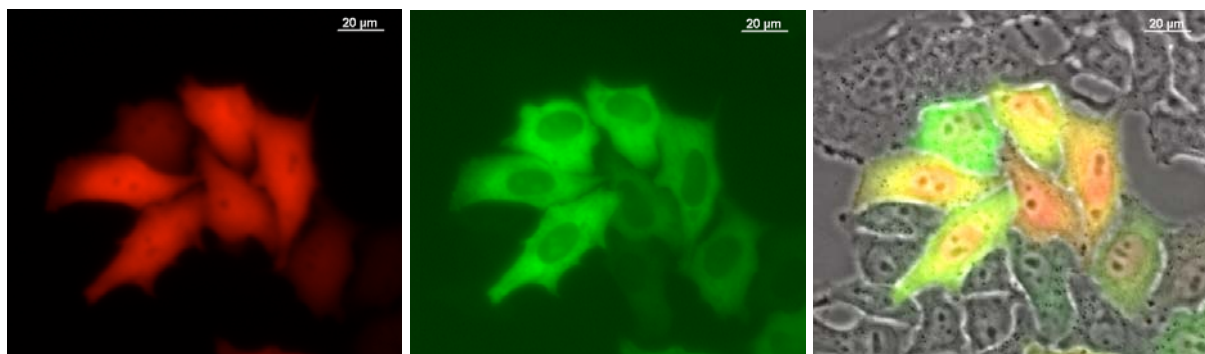


Abbildung 3.20: Funktionalitätstest der Rev-Mutante RevEDR-GFP in der Zelllinie HeLa-Tat ROD. Links: Rote Fluoreszenz (RFP-Reporterprotein), Mitte: grüne Fluoreszenz (RevEDR-GFP). Rechts: Phasenkontrastbild überlagert mit roter und grüner Fluoreszenz. Deutlich zu sehen ist das fast ausschließlich zytoplasmatische Fluoreszenzsignal von RevEDR-GFP und die Expression des Reporter-Proteins.

Ebenso wurde überprüft, ob die hergestellte Mutante RevM5M10bl transdominant negative Eigenschaften, ähnlich denen von RevM10bl, besitzt. Dies wäre durchaus von Bedeutung, da sich ohne weiteres stabile HeLa und Astrozyten Zelllinien etablieren ließen, die konstitutiv RevM5M10bl exprimierten. Dies gelang aufgrund der Toxizität von RevM10bl bisher nicht. Für diese Experimente in HeLa-Tat ROD Zellen wurden als Kontrolle 50 ng pCsRevsg143 und 150 ng pFred143 transfiziert, oder 50 ng pCsRevsg143, 50 ng pFred143 und 100 ng pCsRevM5M10blsg143 bzw. pCsRevM10blsg143. Somit war ein 2 facher Überschuss der Rev-Mutanten im Ansatz vorhanden. Es wurde keine signifikante transdominant negative Eigenschaft von RevM5M10blGFP festgestellt. Der Phänotyp des exprimierten RevM5M10bl-GFP Fusionsproteins entsprach dem erwarteten Muster (s. Abb. 3.26), sodass eine unvollständige, trunkierte Expression des Proteins ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3.22 fasst die Untersuchungen zur Transdominanz zusammen.

Mutante	NIS AS-Position: 12-25	NLS / RNA- Bindung AS-Position: 37-52	NES AS-Position: 77-86
sRev	EELIRTVRLIKFLY	RQARRNRRRRWRER QR	LPPLERLTLTLD
RevM5		RQADLNRRRRWRER QR	
RevM10bl			LPPDLRLEDLPTLD
RevM5M10bl		RQADLNRRRRWRER QR	LPPDLRLEDLPTLD
<u>RevM5xIM10bl</u>		RQADLNRAARWRER QR	LPPDLRLEDLPTLD
<u>RevM5xxIM10bl</u>		RQADLNRAARWLER QR	LPPDLRLEDLPTLD
<u>Rev(M5)xIM10bl</u>		RQARRNRAARWRER QR	LPPDLRLEDLPTLD
<u>Rev(M5)xxIM10bl</u>		RQARRNRAARWLER QR	LPPDLRLEDLPTLD
<u>RevPAAAA</u>			LPAAAAALTLTLD
<u>RevEDR</u>	EELIEDRRLIKFLY		
<u>Rev(ΔARM)</u>		RQA.....WR ERQR	
<u>Rev1-79RexNES</u>			MDALSAQLYSSLSLD SPP
<u>SecSigRev</u>	METDTLLLWLLLWVPGSTGDGSGAASAGRSGDSDEELI.....		

Tabelle 3.2: Verwendete Rev-Mutanten bzw. -Konstrukte. Unterstrichene Mutanten stellen selbst hergestellte Konstrukte dar. Die relevanten Aminosäuren in einzelnen Domänen der Rev-Sequenz sind angegeben. Graue Felder zeigen Domänen von Rev an. Fett gedruckte Aminosäuren kennzeichnen Mutationen. Die angegebenen AS-Positionen beziehen sich auf sRev. Die komplette AS-Sequenz von Rev ist in Abbildung 1.7 gegeben. sRev unterscheidet sich von Rev durch ein zusätzliches Serin und ein Alanin an Position 3 und 4 der AS-Sequenz.

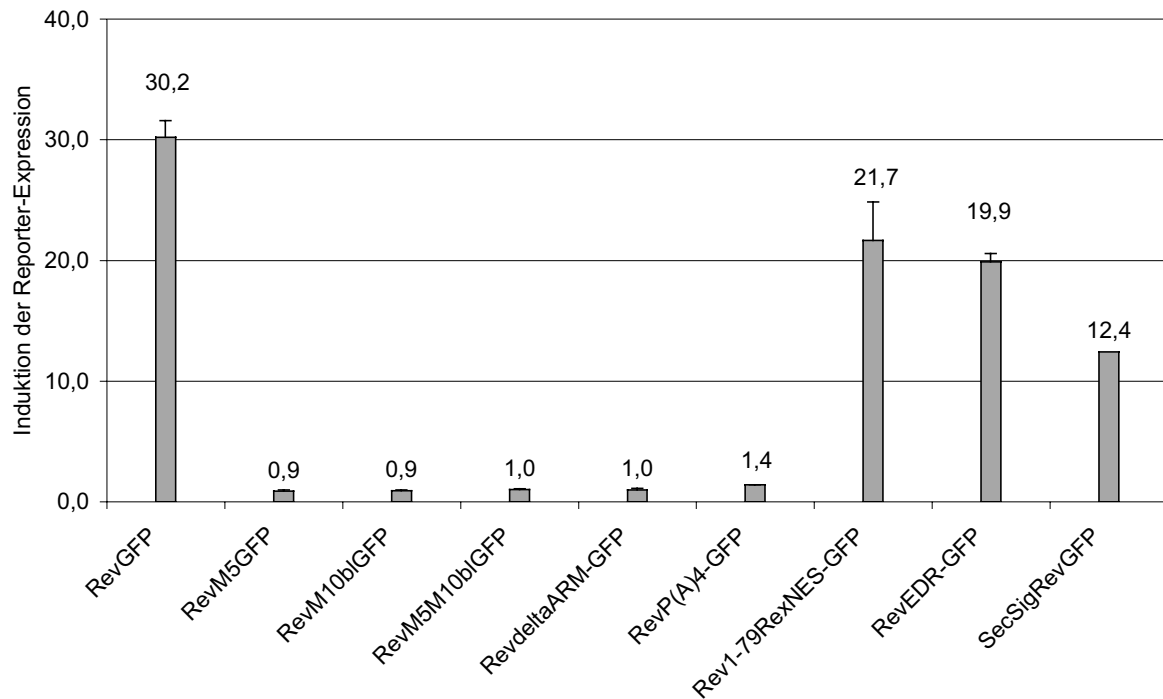


Abbildung 3.21: Untersuchungen zur Funktionalität der Rev-Konstrukte und Mutanten. Angabe der Induktion in Vielfachen der Aktivität eines GFP-Expressionskonstruktes ohne Rev-Anteil. Mit jeweils 100 ng der Expressionskonstrukte wurden HeLa-Tat ROD Zellen transfiziert. Der Anteil Reporter-positiver Zellen wurde ausgewertet und mit Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei Experimenten angegeben.

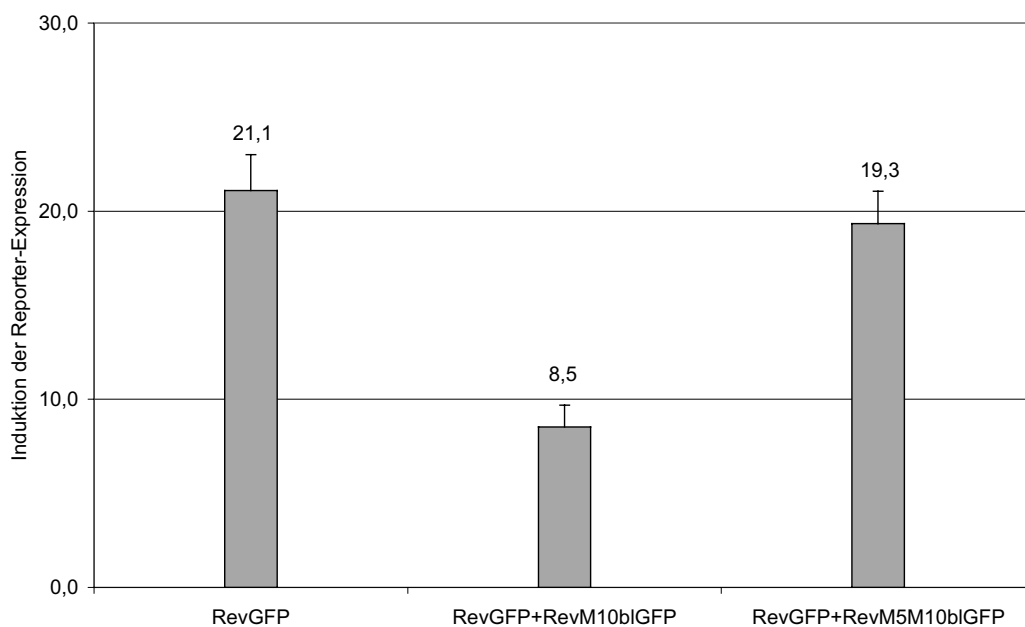


Abbildung 3.22: Transdominanz der Rev-Mutanten RevM10bIGFP und RevM5M10bIGFP (jeweils im 2fachen Überschuss). Darstellungsart analog zu Abb. 3.21.

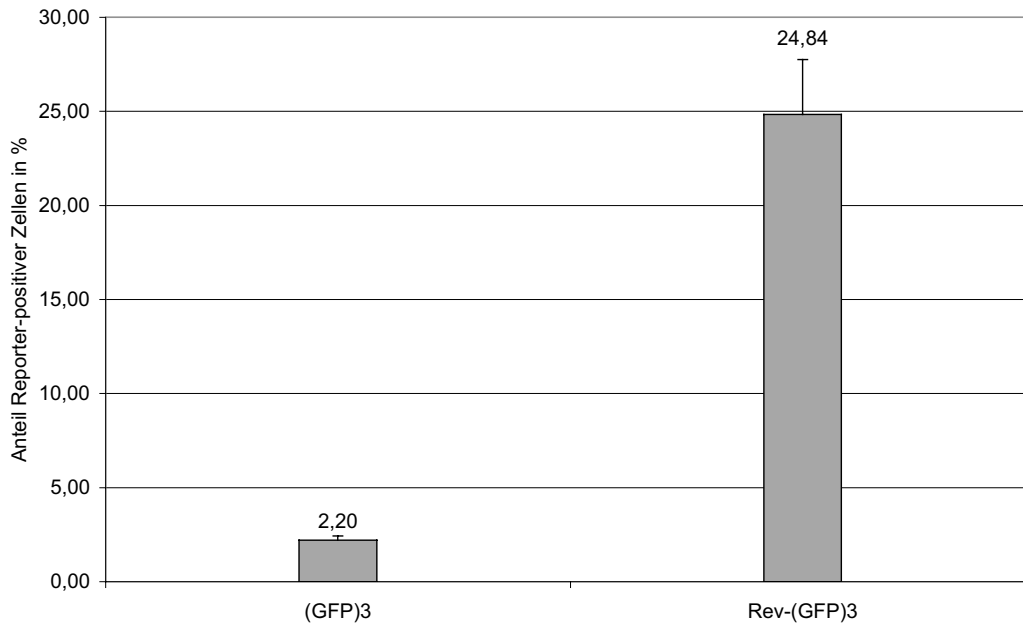


Abbildung 3.23: Funktionstest von (GFP)3 und Rev(GFP)3. Jeweils äquimolare Mengen wurden zusammen mit dem Konstrukt pLRed(2xINS)R in HeLa-Tat Zellen transfiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Experimenten mit jeweils mehreren parallelen Transfektionen sind gezeigt.

Ein weiteres, durch S. Demart, in der Arbeitsgruppe erstelltes Konstrukt ist Rev-(GFP)3, das ein Fusionskonstrukt aus wt-sRev und drei GFP-Molekülen exprimiert. Es zeigte sich, dass dieses Fusionsprotein, im Gegensatz zu RevGFP, nahezu vollständig im Zytoplasma aller untersuchten Zellen lokalisiert. Es sollten Funktionsstudien mit diesem Konstrukt durchgeführt werden um die Auswirkungen dieser Lokalisationsverschiebung auf die Funktion zu analysieren. Wie Abbildung 3.23 zeigt, stellt sich auch das Fusionskonstrukt Rev-(GFP)3 als funktionell aktiv dar. Da in diesem Rev-Konstrukt drei GFP-Moleküle an Rev fusioniert sind, und nicht eines wie in RevGFP, kann der Vergleich einer Aktivitätsbestimmung auch nur gegenüber (GFP)3 erfolgen. Eine direkte Vergleichbarkeit der Aktivität von Rev-(GFP)3 und Rev-GFP besteht nicht, da sich diese beiden Fusionsproteine in der FACS-Analyse in ihren Fluoreszenzeigenschaften unterscheiden und der Unterschied nicht genau definierbar ist.

Folgende Experimente sollten nun die Induzierbarkeit der RFP-Expression durch Rev auch in Astrozyten zeigen. Es wurde erwartet, dass sich eine verringerte Induktion (gegenüber HeLa Zellen) zeigt, da sich die Astrozyten-vermittelte Rev-Inhibition auch

in dem verwendeten Reporter-Assay niederschlagen sollte. Ein direkter Vergleich der transienten Transfektionen in Astrozyten mit den Experimenten in HeLa-Tat oder gar HeLa-Tat ROD schien aber nicht sinnvoll, da diese Zelllinien wesentliche Komponenten des Reporter-Assays stabil trugen. Eine vergleichbare Induktionsleistung in transienten Transfektionen von Astrozyten mit RevGFP (oder GFP)-Expressionsplasmid, Reporter-Konstrukt und Tat-Expressionsplasmid ist dabei nicht zu erwarten. Ein Vergleich der Astrozyten-Experimente konnte also nur mit HeLa Zellen stattfinden, die ebenfalls transient transfiziert wurden. Die Optimierung des Assays in Astrozyten war langwierig, da die Transfizierbarkeit der Zelllinien und/oder der zelluläre Metabolismus grundsätzlich geringer waren als die von HeLa Zellen.

Durch eine Vielzahl von Vorversuchen wurden die Menge von 500ng pCTat, 100 ng pCsRevsg143 (oder pFred143) und 2 µg pLRed(2xINS)R pro Vertiefung einer 6-Loch Platte als optimal für einen Reporter-Assay in Astrozyten ermittelt (s. hierzu auch 2.2.1, 2.2.4 und 2.2.5 im Methodenteil). Zwar konnte die Menge an pCTat oder pLRed(2xINS)R reduziert werden, jedoch sank dann die Zahl der Reporter-positiven Zellen derart, dass eine Auswertung nicht möglich oder die Ergebnisse kaum reproduzierbar waren. Für die folgenden Experimente wurden HeLa Zellen und verschiedene Astrozytom-Zelllinien mit denselben Mengen an Plasmiden transfiziert und nach 24 h analysiert. Dabei ergaben sich, sowohl innerhalb der Astrozyten als auch zu den HeLa Zellen, deutliche Unterschiede. Allerdings muss angefügt werden, dass die RFP-Expression von HeLa Zellen, die mit diesen Mengen an Plasmiden transfiziert wurden, in einigen Fällen bereits die Detektions-Grenzen der RFP-Fluoreszenz im FACS-Gerät überschritt. Es wurde versucht, dies in der Auswertung zu berücksichtigen. Weiter zu erwähnen ist, dass insgesamt in Astrozyten immer eine wesentlich größere Abweichung der einzelnen Experimente voneinander zu beobachten war. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3.24 zusammengefasst.

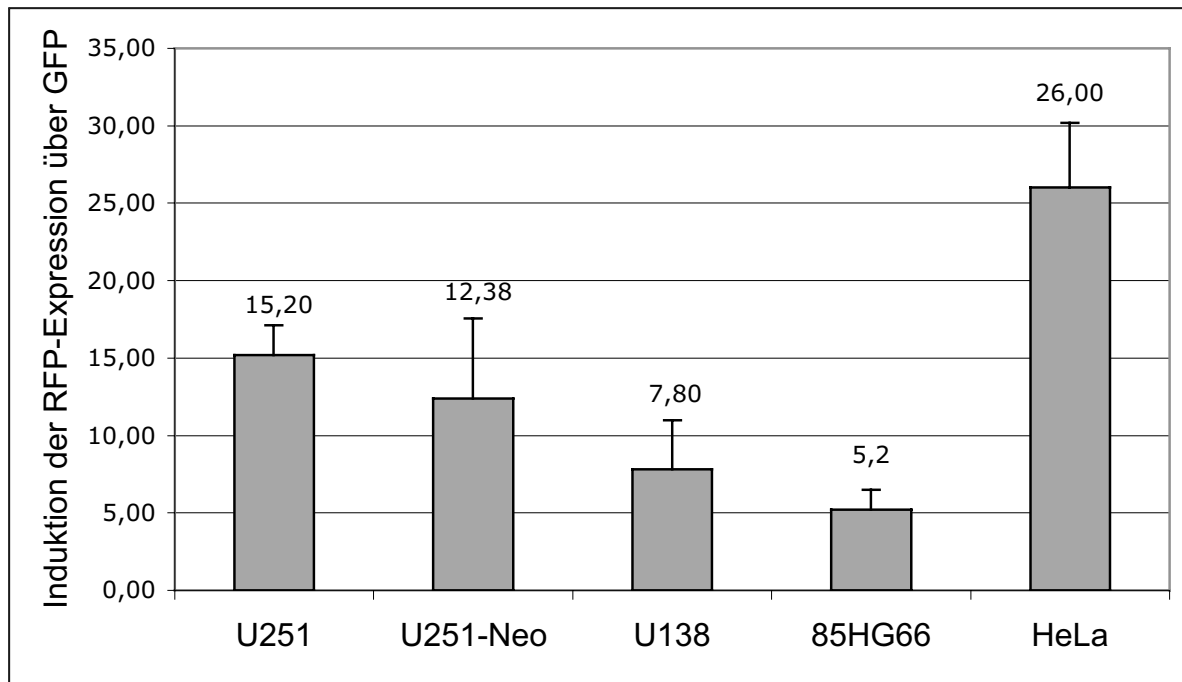


Abbildung 3.24: Transiente Transfektionen verschiedener Zelllinien mit pCTat (500 ng), pLRed(2xINS)R (2 µg) und pCsRevsg143 (100 ng). Die Induktion wurde im Vergleich zu parallelen Transfektionen mit pFred143 ermittelt. Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Die in diesem Experiment beobachteten Unterschiede in der Reporter-Expression von Astrozyten im Vergleich zu HeLa Zellen sind in der Tabelle 3.3 aufeinander bezogen dargestellt.

Zelllinie	Bruchteil an „HeLa-Aktivität“
U251	58%
U251-Neo	48%
U138	30%
85HG66	20%

Tabelle 3.3: Verminderte Rev-vermittelte Reporter-Expression in Astrozytom Zelllinien. Der durchschnittliche Bruchteil der Aktivität in HeLa-Zellen ist angegeben.

Die erstellten Rev-Konstrukte, die sich in HeLa-Tat ROD Zellen als funktionell aktiv erwiesen haben (s. Abb. 3.21), wurden ebenfalls noch in 85HG66 auf ihre Aktivität

überprüft. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.25. Die erhaltenen Mittelwerte waren, aufgrund der großen Abweichungen unter den Experimenten, nicht signifikant verschieden. Jedoch kann man einen Trend beobachten, der den Ergebnissen der Studien in der Reporter-Zelllinie entgegen läuft. Das Konstrukt Rev1-79RexNES-GFP, weist in 85HG66 eine tendenziell höhere Aktivität auf als Rev-GFP, während es sich in HeLa Zellen umgekehrt darstellt. In diesem Konstrukt wurde der gesamte C-terminale Bereich von Rev (ab AS 80) durch eine AS-Sequenz aus dem HTLV-1 Rex Protein ersetzt, die dort die NES darstellt. In der Literatur wurde beschrieben, dass ein ähnliches Konstrukt die reduzierte Transaktivierungsaktivität von Rev in murinen Zellen teilweise auszugleichen vermochte (Marques, Veyrone et al. 2003). Dieses Konstrukt wurde erstellt und ebenfalls getestet. Zwar sind die Ergebnisse, bedingt durch die starken Schwankungen und die Tatsache, dass nur eine Astrozytom Zelllinie getestet wurde, nicht repräsentativ, aber möglicherweise können weitere Experimente mit diesem Konstrukt neue Erkenntnisse liefern.

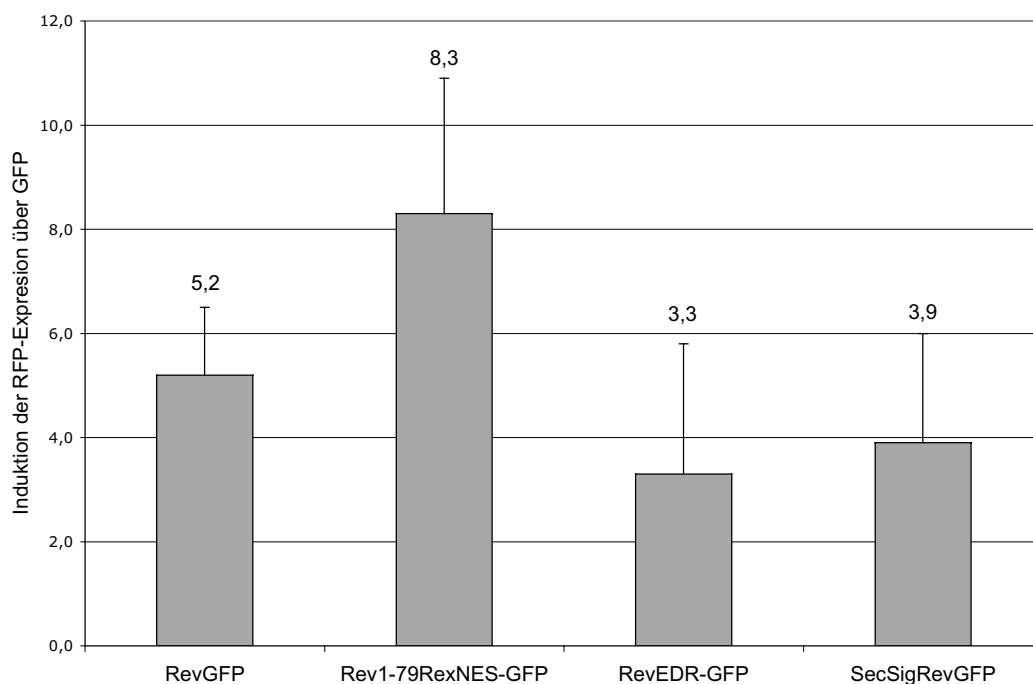


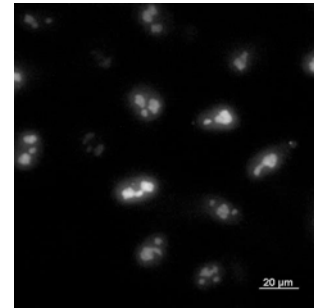
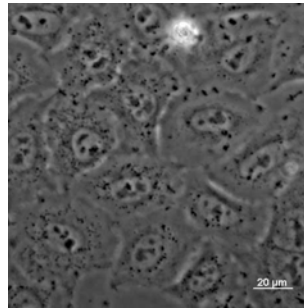
Abbildung 3.25: Verschiedene Rev-Konstrukte in 85HG66, auf ihre aktivierende Eigenschaft der RFP-Expression untersucht. Experimenteller Aufbau und Darstellung wie in Abb. 3.21 (s. Kommentar zur Legende).

Parallel zu den Untersuchungen der Funktionalität wurden auch Lokalisationsstudien mit den erhaltenen Rev-Mutanten in HeLa Zellen und 85HG66 Astrozytom Zellen durchgeführt. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte wie im Methodenteil beschrieben und es wurde aus den erhaltenen Werten für 7-15 Zellen der Median des prozentualen Anteils der Fluoreszenz im Zellkern gebildet. Gelegentlich wurden für die Lokalisationsstudien statt HeLa Zellen HeLa H2BmRFP1 (ZW) Zellen benutzt, die sich im Hinblick auf ihre Lokalisationseigenschaften RevGFP betreffend nicht von HeLa Zellen unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Abbildungen 3.26 und 3.27 stellen die wichtigsten Rev-Konstrukte, ein typisches Lokalisationsbild, sowie den dazugehörigen Anteil der Fluoreszenz im Zellkern zusammen. Außerdem ist angegeben, ob der Funktionstest positiv ausfiel oder nicht.

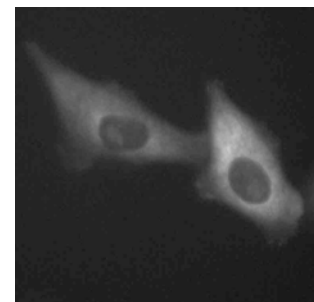
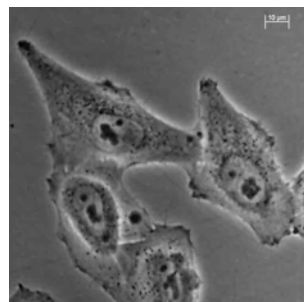
HeLa Zellen**Phasenkontrast****GFP-Fluoreszenz****Rev-GFP**

85% nukleär/nukleolär

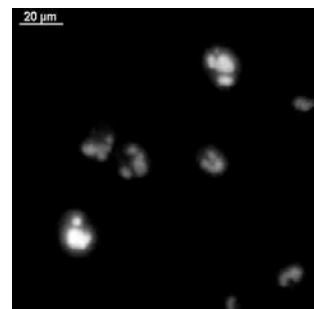
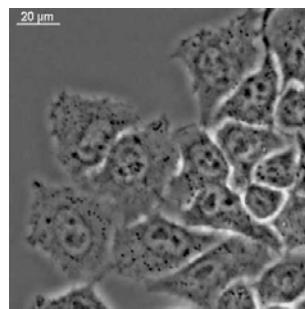
Funktionell

**SecSigRev-GFP**

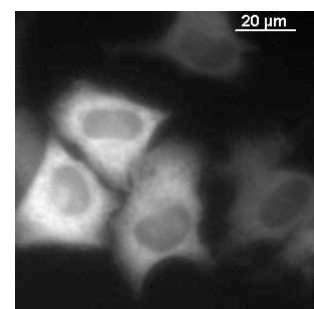
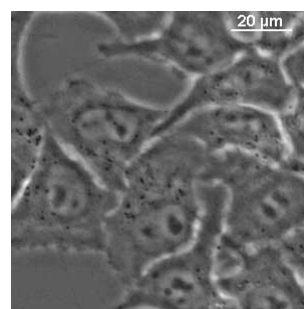
16% nukleär (nukleolär)

Funktionell, 40% Aktivität
verglichen mit RevGFP**Rev1-79RexNES-GFP**

81% nukleär/nukleolär

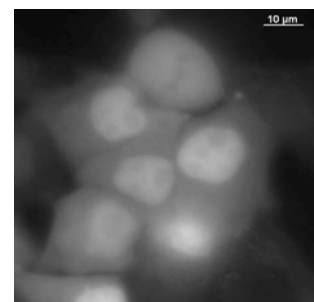
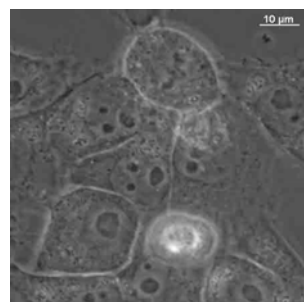
Funktionell, 73% Aktivität
verglichen mit RevGFP**RevEDR-GFP**

17% nukleär (nukleolär)

Funktionell, 66% Aktivität
verglichen mit RevGFP**RevM5M10bl-GFP**

52% nukleär

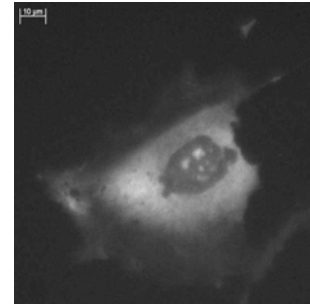
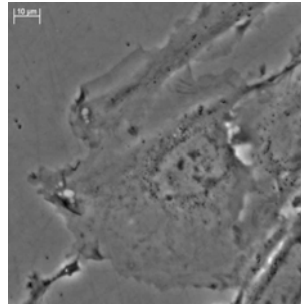
Nicht funktionell

**Abbildung 3.26:** Phänotypen verschiedener Rev-Konstrukte in HeLa Zellen.

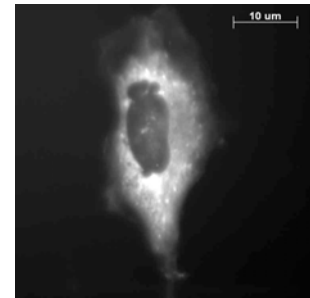
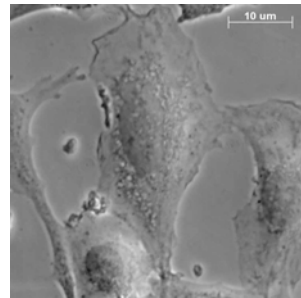
85HG66 Zellen**Phasenkontrast****GFP-Fluoreszenz****Rev-GFP**

25% nukleär/nukleolär

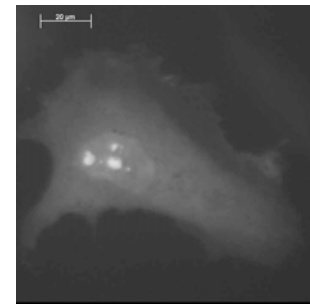
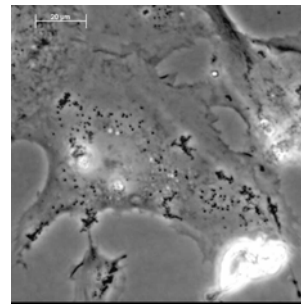
Funktionell

**SecSigRev-GFP**

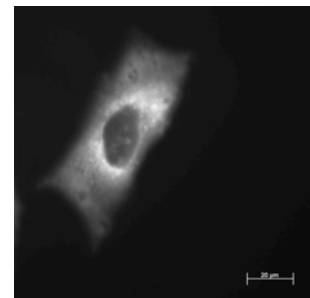
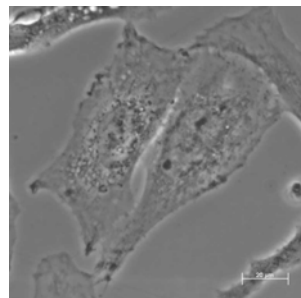
12% nukleär

Funktionell, 73% Aktivität
verglichen mit RevGFP**Rev1-79RexNES-GFP**

42% nukleär/nukleolär

Funktionell, 150% Aktivität
verglichen mit RevGFP**RevEDR-GFP**

15% nukleär

Funktionell, 63% Aktivität
verglichen mit RevGFP**RevM5M10bl-GFP**

40% nukleär

Nicht funktionell

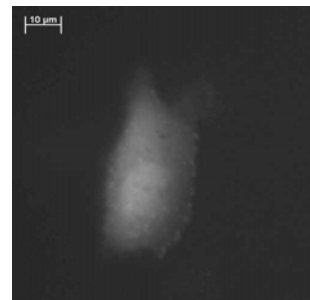
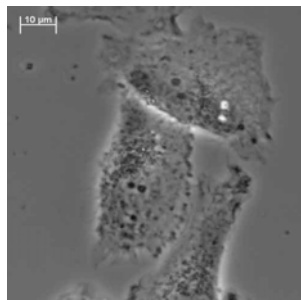


Abbildung 3.27: Phänotypen verschiedener Rev-Konstrukte in 85HG66 Zellen. Funktionalitätsangaben sind relativ zur RevGFP Funktion in 85HG66 angegeben.

3.3 Analyse der intrazellulären Beweglichkeit von Rev-GFP Konstrukten durch FRAP

Nachdem die Lokalisation und Funktionalität der erstellten Rev-Konstrukte bzw. Mutanten untersucht wurde, stellte sich besonders das Konstrukt RevM5M10bl-GFP als sehr interessant dar. Obwohl es Mutationen in NLS und NES aufweist, besitzt es einen genau definierten Lokalisations-Phänotyp (s. Abb. 3.26), der einerseits von unfusioniertem GFP verschieden ist und andererseits auch zwischen HeLa Zellen und 85HG66 Astrozyten variiert. Diese Varianz ist diesem stark mutierten Konstrukt und wtRev gemein. Um die dem Lokalisations-Phänotyp zugrunde liegende Nukleozytoplasmatische Beweglichkeit der Mutante RevM5M10bl zu untersuchen, wurden FRAP-(fluorescence recovery after photobleaching) Experimente durchgeführt. Mit dieser Methode kann die Fluoreszenz-Relokalisierung nach einem laserinduzierten Photobleichen einer bestimmten Region der Zelle beobachtet werden (Reits and Neefjes 2001). Eine genaue Beschreibung dieser Technik findet sich im Methodenteil unter 2.2.6. Ziel dieser Untersuchungen war eine Aussage treffen zu können, ob der beobachtete Unterschied in der Beweglichkeit von RevGFP in Astrozyten und HeLa Zellen sich auch noch in der RevM5M10bl Mutante erhält. Wäre dies der Fall, könnte mit Sicherheit gesagt werden, dass die in RevM5M10bl mutierten Aminosäuren, und möglicherweise auch die Regionen in denen sich diese befinden, nicht alleine verantwortlich für den Unterschied im Lokalisationsverhalten sind. Es wurde zuerst bestimmt, ob sich das kinetische Verhalten von unfusioniertem GFP in Astrozyten und HeLa Zellen signifikant voneinander unterscheidet. In der Literatur wurden teilweise mehr oder weniger große Unterschiede diesbezüglich in verschiedenen Zelllinien festgestellt (Kruhlak, Lever et al. 2000). In mit pFred143 transfizierte Zellen wurden mit dem Konfokalen Laser Mikroskop (LSM) die GFP-Fluoreszenz des Zellkerns vollständig gebleicht und dann alle 12 sec ein Bild der Zelle aufgenommen. Die Bild-Daten wurden mit der Software IPLab analysiert und die Fluoreszenzintensitäten quantifiziert. Nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz wurde der Quotient der nukleären und zytoplasmatischen Fluoreszenz gebildet, in Prozent ausgedrückt und gegen die Zeit aufgetragen. Der Graph in Abbildung 3.33 zeigt diese Auswertung. In dem Graph ist der relative Anteil der Fluoreszenz im Zellkern zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Bleichen gezeigt. Abbildung 3.34 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa Zellen, die während eines solchen

Experiments entstanden. Nach spätestens 300 sec war eine Fluoreszenzverteilung erreicht, die der vor Beginn des Bleichens entsprach, auch wenn die Gesamtintensität der Fluoreszenz natürlich geringer war (nicht gezeigt). Die benötigte Zeit um die Ausgangs-Fluoreszenzverteilung wieder herzustellen, war für Astrozyten und HeLa Zellen identisch. Dies war eine gute Grundlage um den Einfluß von RevM5M10bl auf die Fluoreszenzverteilung nach dem Bleichen zu untersuchen.

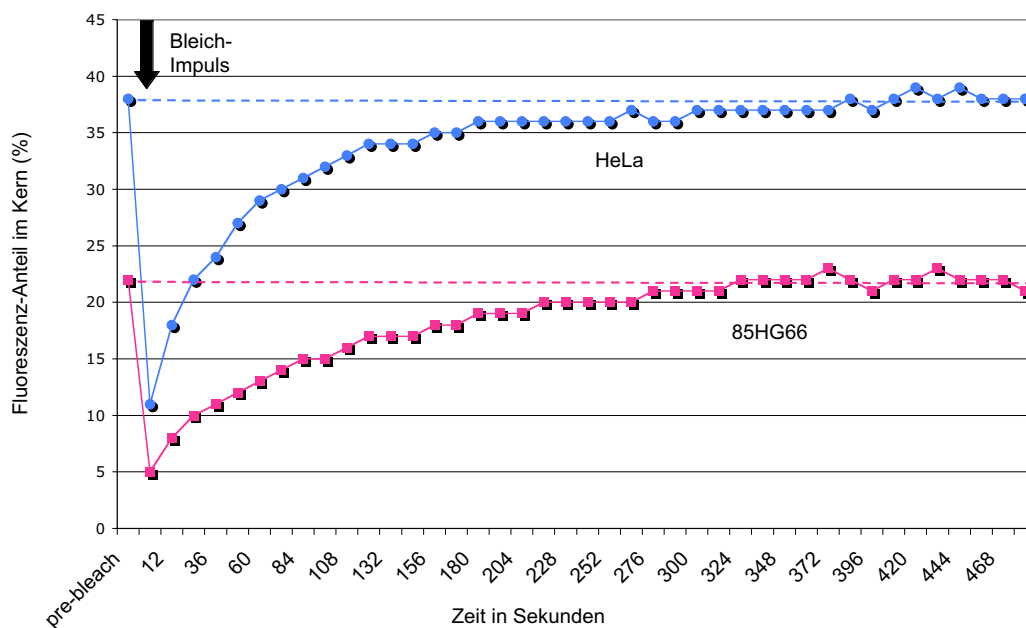


Abbildung 3.33: GFP-FRAP-Experiment mit HeLa und 85HG66 Zellen. Der schwarze Pfeil zeigt den Zeitpunkt des Photobleich-Impulses an, bei dem die gesamte Kernfläche gebleicht wurde. Obere Kurve HeLa, untere Kurve 85HG66 Zellen. Die y-Achse gibt den Prozentsatz des nukleären Signals von GFP an. Die x-Achse symbolisiert den Zeitverlauf der Bildaufnahme in Sekunden. Alle 12 sec wurden ein Bild aufgenommen. Die zwei gestrichelten Linien zeigen jeweils die Ausgangsverteilung der Fluoreszenz in den Zellen an. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

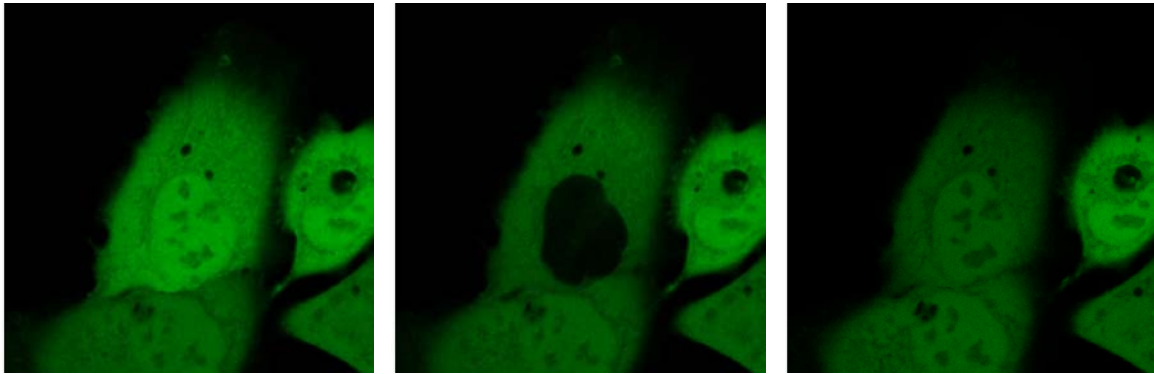


Abbildung 3.34: GFP exprimierende HeLa Zellen. Links kurz vor, in der Mitte direkt nach dem Photobleichen des Zellkerns. Rechts, 480 Sekunden nach dem Bleichen. Die Ausgangsverteilung der Fluoreszenz ist wieder hergestellt, die Gesamtfluoreszenz ist durch den Bleichimpuls und die Bildaquisition erniedrigt.

Mit RevM5M10blsg143 transfizierte HeLa und 85HG66 Zellen wurden derselben Prozedur wie oben beschrieben unterzogen, mit dem Unterschied, dass nur alle 60 sec nach dem Bleichen ein Bild aufgenommen wurde.

Abbildung 3.35 zeigt ein solches Experiment. Reproduzierbar war hier nach 45 min bei 85HG66 Zellen nie eine hundertprozentige Wiederherstellung der Ausgangssituation zu beobachten, während dies bei HeLa Zellen in der Regel nach spätestens 40 min schon der Fall war.

85HG66 Zellen erreichen nach 45-60 min maximal 85-90% der nukleären Fluoreszenz wieder. Dieses Verhältnis wurde (bei jeweils leicht schwankenden Ausgangsverteilungen) in mehreren Experimenten (n=6) bestätigt.

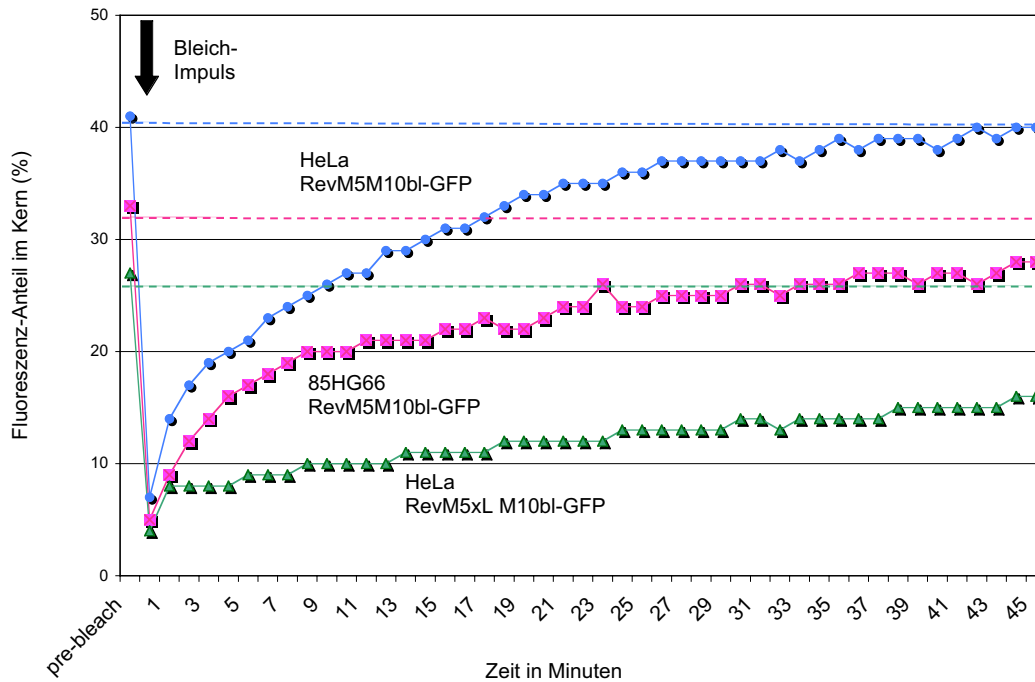


Abbildung 3.35: FRAP-Experiment mit RevM5M10blGFP und RevM5xl M10blGFP. Der schwarze Pfeil zeigt den Zeitpunkt des Photobleich-Impulses an, bei dem die gesamte Kernfläche gebleicht wurde. Oberste Kurve HeLa, mittlere Kurve 85HG66 Zellen, beide transfiziert mit RevM5M10blGFP. Unterste Kurve HeLa, transfiziert mit RevM5xl M10blGFP. Die y-Achse gibt den Prozentsatz des nukleären Signals von GFP an. Die x-Achse symbolisiert den Zeitverlauf der Bildaufnahme in Minuten. Alle 60 sec wurden ein Bild aufgenommen. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt. Die drei gestrichelten Linien zeigen jeweils die Ausgangsverteilung der Fluoreszenz in den Zellen an.

Die durchgeführten Experimente zeigten außerdem eindeutig, dass das RevM5M10blGFP Protein in der Lage ist aus dem Zellkern ins Zytoplasma zu wechseln und umgekehrt. Dies erschien deshalb verwunderlich, weil bisher angenommen wurde, dass die Defekte der NLS- und NES-Regionen diese Fähigkeit ausschließen.

Um auszuschließen, dass die beobachtete Wiederherstellung des Gleichgewichts nach dem Bleichen durch rein passive Diffusionsprozesse getrieben wird, und nicht durch eine Rest-Aktivität der mutierten Domänen, wurden weitere Mutanten mit dieser Methode getestet. Besonders die Mutanten RevM5xIM10bl und RevM5xxIM10bl sind hier zu erwähnen, da sie eine zunehmend mutierte NLS-Domäne aufweisen. RevM5xIM10bl zeigt bereits aufgrund seiner zusätzlichen Mutation eine deutlich verringerte „steady state“ Lokalisation im Zellkern. Mit diesen Mutanten konnte selbst nach mehr als 60 min nach dem Bleichen des Zellkerns in HeLa Zellen noch keine Wiederherstellungen der vor dem Bleichen beobachteten

Kernfluoreszenz beobachtet werden (s. abb. 3.35). Dies deutet auf eine deutlich verringerte Kinetik gegenüber RevM5M10bl hin.

3.4 Identifikation von Inhibitoren der Reporter-Expression

Ein wichtiges in dieser Arbeit angestrebtes Ziel war die Identifizierung Rev-inhibitorischer Faktoren. Die dafür generierte und schon ausführlicher beschriebene Zelllinie HeLa-Tat ROD wurde nun dafür benutzt, aus einer cDNA-Bank solche Faktoren zu isolieren. Dafür wurde eine cDNA-Bank aus fötalem Hirn der Firma Stratagene gewählt, die cDNA Inserts in dem retroviralen Vektor pFB enthält (s. 2.1.4 und 2.1.6). Zwar wurden zu diesem Zweck auch eigene cDNA-Banken aus Astrozytom-Zelllinien hergestellt (s. Methodenteil), aber aus Zeitgründen waren Screening-Durchläufe mit diesen bisher nicht möglich.

3.4.1 Durchführung des Inhibitor-Screenings

Die grundsätzliche Vorgehensweise bei einem Reporter-Assay ist im Methodenteil näher beschrieben (s. besonders 2.2.4, 2.2.2 und 2.2.3), hier nur in Kürze der Ablauf im Speziellen für ein cDNA-Screening dieser Art:

1. Aussäen von 5×10^3 Reporter-Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch Platte, danach 24 h Inkubation.
2. Transfektion isolierter cDNA-Klone (100 ng pro Well) und 24 h Inkubation.
3. Transfektion von RevGFP Expressionsplasmid (10 ng) und 24 h Inkubation.
4. Kernfärbung der Zellen mit Hoechst33342-Farbstoff (optional).
5. Analyse der Daten durch eine von zwei möglichen Screeningmethoden, Fluoreszenzmikroskopie oder FACS-Analyse.

Die cDNAs die für die Screenings benutzt wurden, wurden wie im Methodenteil unter 2.2.7 beschrieben isoliert. In jeden Screening-Durchlauf wurden Kontrollen inkorporiert, zu denen die erhaltenen Werte für die cDNAs in Relation gesetzt wurden. Dies war einerseits eine Transfektion die nur RevGFP und keinen potenziellen Inhibitor enthielt (als Maß für die maximale Reporter-Expression) und andererseits eine Kontrolle, die statt RevGFP nur GFP enthielt (als Maß für die minimale Reporter-Expression). Nach dem Screening wurden Kandidaten, die

interessant erschienen und inhibitorische Eigenschaften vermuten ließen, ausgewählt und durch eine unabhängige FACS-Analyse überprüft.

Im folgenden Abschnitt werden die beiden Vorgehensweisen für Screenings näher erläutert.

Mikroskopisches Screening

Bedingt durch den Ablauf des Screenings in 96-Loch Zellkulturplatten, waren nach den erfolgten Zellkultur-Arbeiten (s. Methodenteil 2.2.4) zur Auswertung eine bis mehrere 96-Loch Platten zu überprüfen. Eine phänotypische Analyse mehrerer hundert Wells in Zellkulturplatten mit dem Auge ist zwar theoretisch machbar, aber nicht sinnvoll. Der Zeitaufwand für die manuelle Analyse ist sehr groß und die Auswertung mit dem Auge ermüdend und nicht objektiv genug. Daher wurde eine automatisierbare fluoreszenzmikroskopische Methodik gewählt. Mittels des Zeiss Cell Observers wurden Bilddaten einer 96-Loch Platte automatisch aufgenommen. Dazu wurden die 96 Positionen der Vertiefungen einer Platte einmal manuell in die Steuerungs-Software (AxioVision) eingegeben und dann bei allen eingesetzten Platten wiederverwendet. Durch die Autofokus-Funktion konnten bei jeder der 96 Positionen einer Platte fokussierte Bilder der Zellen in den Wells aufgenommen werden, wobei die Autofokus-Funktion auf den Phasen-Kanal oder den Hoechst33342-Kanal (wenn durchgeführt) angewendet wurde. Die Software aquirierte dann automatisch 96 „Bildstapel“ mit jeweils einem Bild für den Phasen-Kanal, für die grüne und für die rote Fluoreszenz (und für Hoechst33342, wenn vorhanden), wobei für die Fluoreszenzen immer vorher manuell festgelegte Belichtungszeiten verwendet wurden. Für die Aufnahmen wurde in der Regel ein Objektiv mit 20facher Vergrößerung benutzt, da es einen guten Kompromiss von Auflösung und Anzahl der Zellen pro Bild bot. Die entstandenen 96 (pro Platte) 3- oder 4-Kanal Bilder wurden manuell in ein allgemein verwendbares Dateiformat (.tif) konvertiert, auf CD gespeichert und auf einem Apple Macintosh mit dem Programm IpLab (Scanalytics) analysiert. Die Werte der einzelnen Positionen wurden relativ zu den Kontrollen gesetzt, die in jedem Durchlauf des Screenings einbezogen wurden. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Program Excel oder KyPlot graphisch dargestellt.

Die Vorgänge des Screenings, angefangen bei den Zellkulturarbeiten, über Bild-Aufnahme bis hin zur Auswertung, sind grob schematisch im Flussdiagramm in Abbildung 3.28 gezeigt.

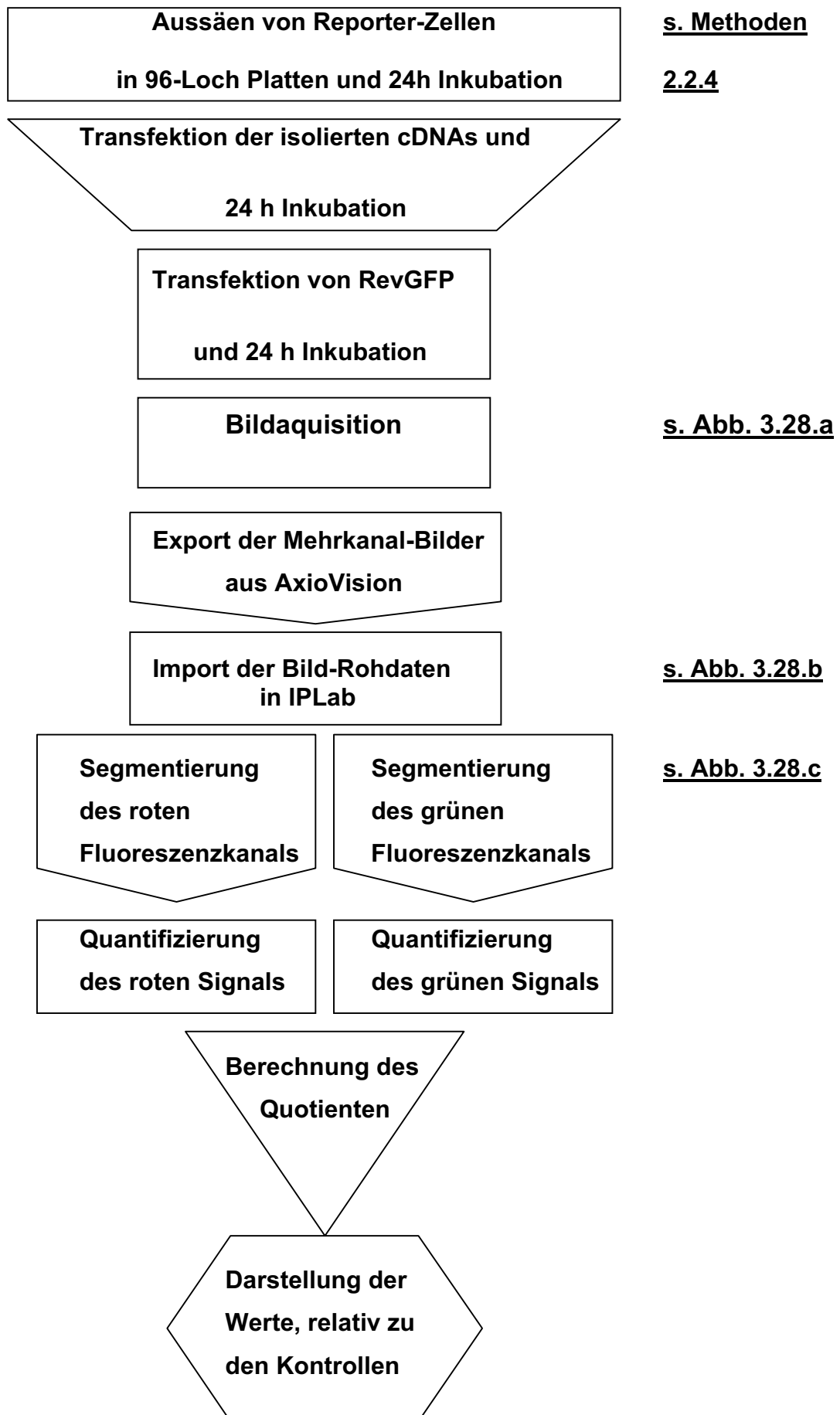


Abbildung 3.28: Flussdiagramm zum Ablauf des Mikroskopischen Screenings.

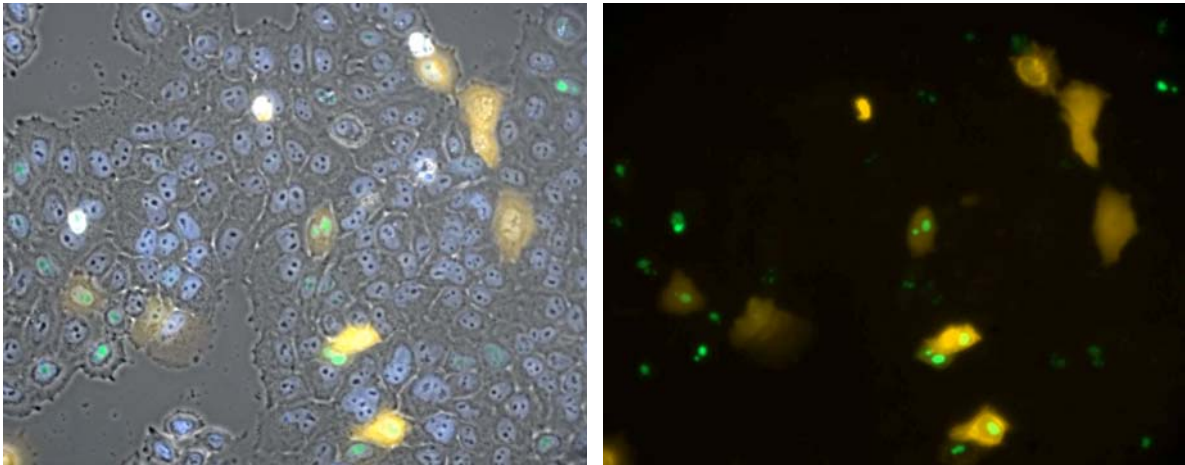


Abbildung 3.28.a: Screening-Aufnahme eines 96-Loch Platten Wells. Links: Überlagerung von Phasenkontrast, roter und grüner Fluoreszenz und Kernfärbung Hoechst33342. Rechts: Selber Bildausschnitt, Überlagerung von roter und grüner Fluoreszenz.

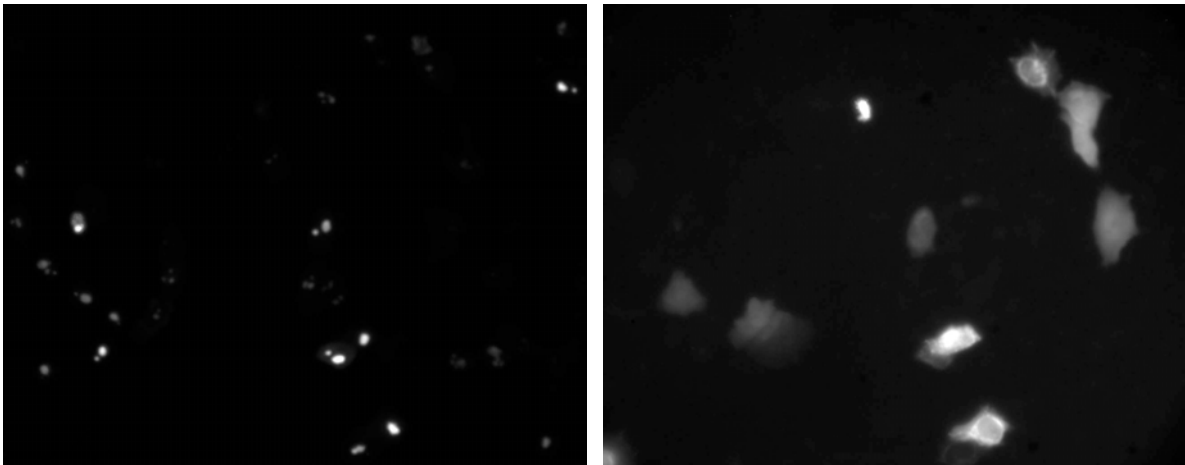


Abbildung 3.28.b: Screening-Aufnahme eines 96-Loch Platten Wells (s. Abb. 3.28.a). Links: Grüner Fluoreszenzkanal in der Graustufendarstellung. Rechts: Roter Fluoreszenzkanal in der Graustufendarstellung.

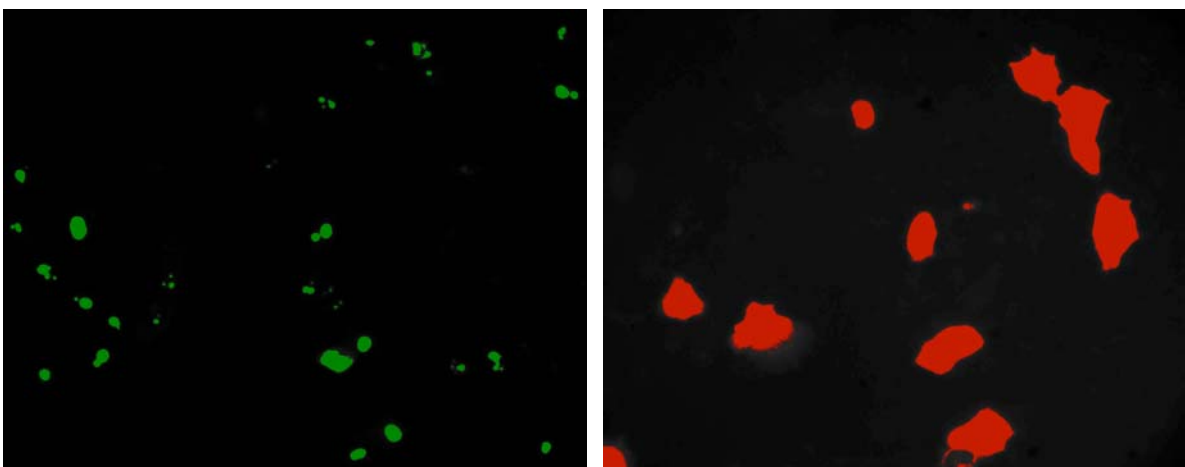


Abbildung 3.28.c: Screening-Aufnahme eines 96-Loch Platten Wells. Selbe Aufnahme wie Abb. 3.28.b. Links: Grüner Fluoreszenzkanal nach der automatischen Segmentierung durch IPLab. Rechts: Roter Fluoreszenzkanal nach der automatischen Segmentierung in IPLab.

Nachdem die Quotienten der grünen und roten Fluoreszenzen aller Vertiefungen einer 96-Loch Platte gewonnen waren, wurden sie relativ zu den Kontrollen (d.h. Zellen ohne Rev bzw. Zellen mit Rev, ohne Inhibitor) gesetzt. Die erhaltenen Werte wurden verglichen und Positionen mit auffällig niedriger Rev-Funktion in wiederholten Transfektionen, nach Retransformation des entsprechenden cDNA-Klons, weiter untersucht. Die Werte konnten für eine bessere Übersichtlichkeit auch graphisch in Form einer schematischen 96-Loch Platte mit dem Program KyPlot (Kyence Inc.) dargestellt werden (nicht gezeigt).

FACS-basiertes Screening

Der Umgang mit großen Mengen an Bilddaten erwies sich als der zeitraubendste Punkt im gesamten Ablauf der Screening-Prozedur. Mehrere hundert Megabyte an Daten fallen pro ausgewertete 96-Loch Platte an und da die Auswertung nicht mit Hilfe desselben Rechners durchgeführt werden kann, an dem auch die Bildaufnahme stattfindet, ergeben sich hier schnell Engpässe. Um den aufwändigen Export von der Mikroskopie-Station und den Re-Import in die Auswertungs-Station der Bilddaten zu umgehen, wurde ein Teil des durchgeführten Screenings mit einem modifizierten Protokoll durchgeführt.

Der erste Teil, d.h. Zellkultur und Transfektionen, wurde durchgeführt, wie bereits beschrieben. Allerdings folgte dann sofort eine Analyse sämtlicher Proben mit dem FACS. Die Zellen aus jedem einzelnen Loch einer 96-Loch Platten wurden geerntet, in PBS aufgenommen und in FACS-Vials bei 4°C zwischengelagert. So konnten sie direkt einer FACS-Analyse zugeführt werden. Aufgrund der niedrigen Zellzahl in einem 96-Loch Platten Well, konnten jeweils nur 5.000 Zellen mit den FACS analysiert werden. Dadurch schwankten die erhaltenen Werte, auch für Positiv- und Negativkontrolle, deutlich stärker, als dies bei einer FACS-Analyse mit 25.000-100.000 Zellen der Fall war. Trotzdem zeigte ein direkter Vergleich, dass diese Art der Analyse der mikroskopischen Auswertung in ihrer Aussagekraft in nichts nachstand. Um eine erste Aussage über die Kapazität einer Probe treffen zu können, ist diese Methode in der Regel absolut ausreichend.

Die erhaltenen Daten konnten nach einer einmaligen manuellen Einstellung der Auswertungscharakteristik mit der Software CellQuest automatisch analysiert und durch ein Sammel-Export-Modul in ein Excel-kompatibles Format exportiert werden.

Der Zeitaufwand war trotz der FACS-Analyse aller Proben einer 96-Loch Platte (ca. 2 h) dabei geringer als mit vorgeschalteter mikroskopischer Analyse.

Abbildung 3.29 zeigt ein Experiment dieser Art. Daten wurden durch die Software CellQuest exportiert, in Excel importiert und als Balkengrafik dargestellt.

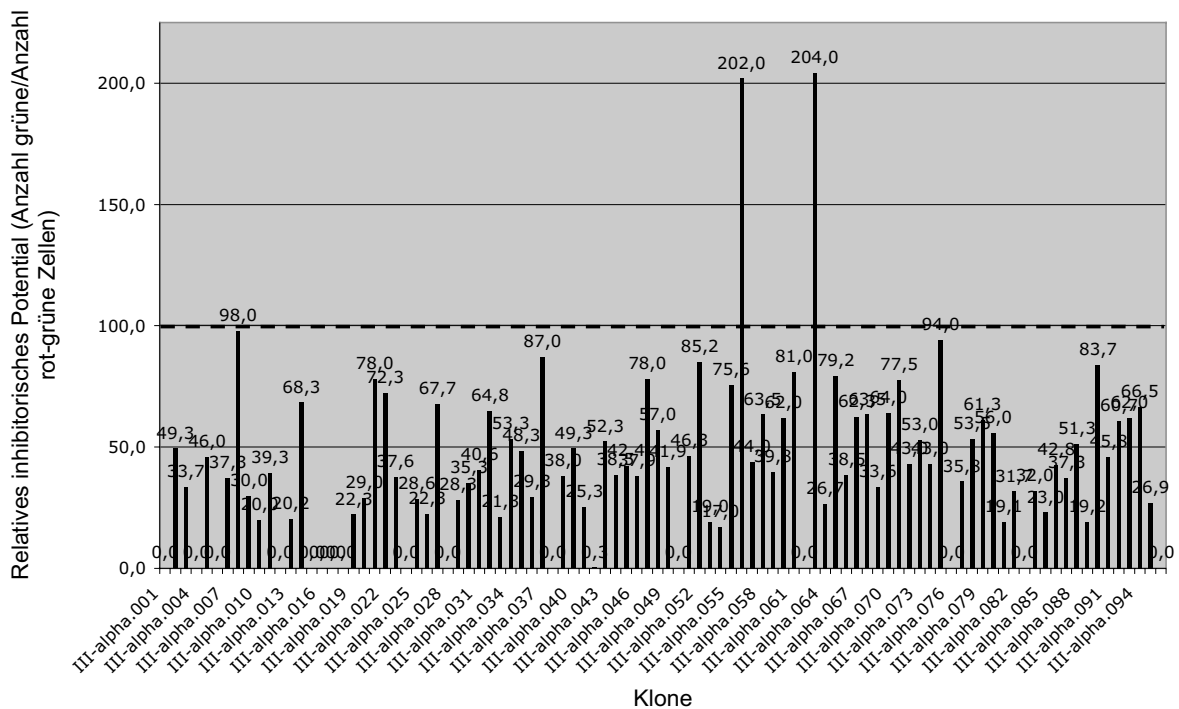


Abbildung 3.29: Serien-FACS-Analyse eines cDNA Screenings. Sammelexportierte Daten einer 96-Loch Platte sind gezeigt. Jeweils 5000 Zellen gingen in die Berechnung jedes Werts ein. Gestrichelte Linie: Keine Inhibition vorhanden. Je höher der Wert, desto geringer die Zahl der Reporter-positiven Zellen. In der Abbildung sind keine Kontrollen gezeigt, da sie sich auf einer parallel transfizierten Platte befanden. Die Kontrolle nur mit RevGFP, ohne cDNA, ergibt dabei einen Wert von 100.

Deutlich zu sehen ist in dieser Abbildung, dass die meisten der Werte unterhalb der gestrichelten Linie liegen, die eine nicht vorhandene Inhibition, d.h. volle Rev-Funktion kennzeichnet. Dies liegt wahrscheinlich einerseits an der bereits erwähnten Aktivierung der Zellen durch die Transfektionen und andererseits daran, dass die Einstellungen so gewählt wurden, um möglichst keine falsch positiven Inhibitoren zu erhalten. Ebenfalls zu sehen ist die klare Abweichung von zwei Proben (Nr. 56 und 65) von dieser Linie nach oben. Diese Proben wurden einer weiteren Überprüfung zugeführt.

Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Zellen durch cDNA-Transfektionen

Es war für die Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse notwendig eine Vorstellung davon zu haben, ob die durchgeführten Transfektionen an der Reporter-Zelllinie zu größeren Veränderungen im Zellmetabolismus führten. Es wurden daher exemplarisch sechs, durch die Standard-Minipräparationsmethode gewonnene, cDNA-Klone zusammen mit einigen anderen Kontrollen transfiziert und mit dem Cell Titer Glo Assay (Promega) die Zellviabilität bestimmt. Diese Lebendzellbestimmung wurde dabei analog zu einem Screening-Experiment durchgeführt, um realistische Bedingungen zu garantieren. Das Ergebnis eines Experiments (mit jeweils vier Parallelen) ist in Abbildung 3.30 dargestellt.

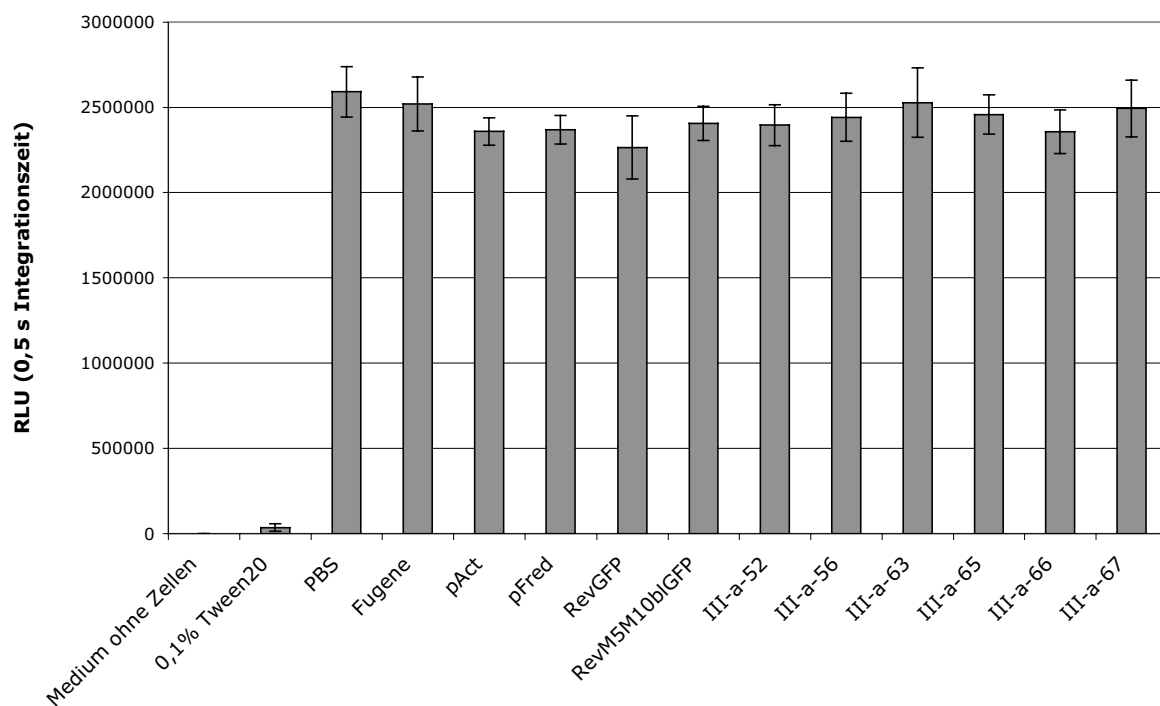


Abbildung 3.30: Lebendzell-Bestimmung mit der Zelllinie HeLa-Tat ROD. Transfektionen wurden im 96-Loch Format durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben. Die y-Achse gibt die gemessenen Lichteinheiten an, deren Menge wiederum durch zelluläres ATP bestimmt wird und damit die Proliferations- und Lebensfähigkeit der Zellen repräsentiert.

Wie die Proliferations- bzw. Lebensfähigkeitsbestimmung zeigte, waren keine nennenswerten negativen Einflüsse durch die Transfektionen auf die Zelllinie zu

verzeichnen. Diese scheint offenbar weitgehend unbeeinflusst durch das Transfektionsreagenz FuGENE6 sowie die eingesetzte DNA zu sein. Es wurde zudem, an Stichproben, die durchschnittliche Konzentration der eingesetzten Miniprep-DNA gemessen und festgestellt, dass die Konzentrations-Schwankungen relativ gering ausfielen (s. Methodenteil). Die photometrisch festgestellte Qualität der DNA war ebenfalls relativ homogen (s. Methodenteil). Diese beiden, nur im geringen Maße abweichenden, Parameter, sicherten einen möglichst konstanten Einfluss der Transfektionen auf die Zellen. Dies stellt eine gute Grundlage für die uneingeschränkte Auswertung der Screening-Daten dar.

3.4.2 Identifizierte Faktoren

Nachfolgend sind die bisher identifizierten Inhibitoren der Reporter-gen-Expression vorgestellt. Alle Faktoren, d.h. cDNAs die ihre inhibitorische Wirkung in mindestens zwei unabhängigen Experimenten nach der Identifikation bestätigen konnten, sind aufgeführt. Die wesentlichen bisherigen Erkenntnisse zu den einzelnen Faktoren sind ebenfalls dargestellt, auch wenn der Erkenntnisgrad, der über einen Faktor bisher gewonnen wurde, von Fall zu Fall stark schwanken kann. Dies liegt hauptsächlich daran, dass die Identifizierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte, aber auch daran, dass sich einige Faktoren als interessanter für weitere Untersuchungen darstellten als andere.

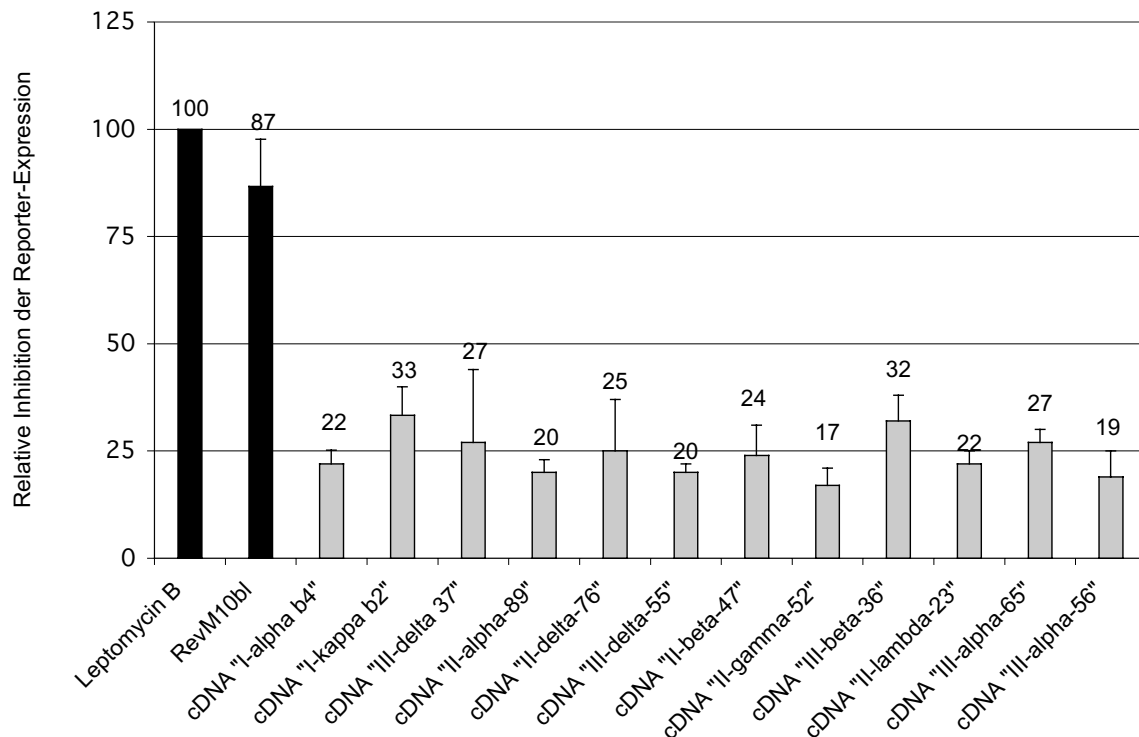


Abbildung 3.31: Bestätigung des inhibitorischen Effekts verschiedener isolierter cDNA Klone durch drei unabhängige FACS-Assays. Der inhibitorische Effekt wurde auf LMB standardisiert (100%). RevM10bl ist als Kontrolle ebenfalls gezeigt. Durchschnittswerte und Standardabweichungen sind angegeben. Werte sind nicht absolut zu sehen, da die Mengen an transfizierten cDNAs nicht 1:1 im molaren Verhältnis zueinander stehen.

Abbildung 3.31 gibt eine Übersicht über die Potenz der bisher identifizierten inhibitorischen Faktoren in Relation zu dem bekannten Rev-Inhibitor Leptomycin B (Nishi, Yoshida et al. 1994);(Wolff, Sanglier et al. 1997) und der transdominant negativen Mutante RevM10bl (Malim, Bohnlein et al. 1989).

Mit der nach der Sequenzierung der cDNAs erhaltenen DNA-Sequenz wurde eine BLAST-Suche im Internet durchgeführt und die daraus resultierenden Accession-Nummern vermerkt. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse von BLAST-Suchen repräsentieren den Stand vom 10. Juni 2003. Die zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit aktuellen BLAST-Einträge für die jeweiligen cDNAs sind zusammen mit den cDNA-Nukleotidsequenzen im Anhang dieser Arbeit zu finden.

Die folgende Tabelle 3.4 fasst die Bezeichnung des cDNA-Klons, das ungefähre inhibitorische Potenzial, die BLAST-Accession-Nr., die Länge des isolierten cDNA-Inserts und, sofern bekannt, den Namen des entsprechenden Genprodukts zusammen.

cDNA-Bezeichnung	Inhibitorische Potenz	BLAST Accession-Nr.	cDNA-Insert Länge in bp	Bezeichnung des Genprodukts	Chromosomale Lokalisation (Mensch)
cDNA "I-alpha b4"	22	NM_033109	692 bp	Fragment von RNA Exonuklease OLD35	2p15
cDNA "I-kappa b2"	33	AB023334	908 bp	14-3-3gamma	7q11.23
cDNA "III-delta-37"	27	AC117506	? >700 bp	-	12
cDNA "II-alpha-89"	20	AB028641	497 bp	Fragment von SOX11	2p25.3
cDNA "II-delta-76"	25	AK026843	1281 bp	-	k.A.
cDNA "III-delta-55"	20	X96752	717 bp	Fragment von L3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	k.A.
cDNA "II-beta-47"	24	NM_003286	749 bp	Fragment von Topoisomerase I	20q12-q13.1
cDNA "II-gamma-52"	17	AC090149	530 bp	-	8
cDNA "III-beta-36"	32	NM_004156	1059 bp	PPP2CB	8p12-p11.2
cDNA "II-lambda-23"	22	AB032954	930 bp	Fragment von KIAA1128	10q23.2
cDNA "III-alpha-65"	27	BC025987	812 bp	Fragment von CDC10 Homolog	k.A.
cDNA "III-alpha-56"	19	AL139100	395 bp	-	6

Tabelle 3.4: Identifizierte cDNAs. Die inhibitorische Potenz wurde, analog zu Abb. 3.31, bezogen auf Leptomycin B als Standard (gesetzt auf 100). k.A.: Keine Angaben.

Zu den Bezeichnungen der cDNAs ist folgendes zu erwähnen: Die erste römische Ziffer (I, II oder III) bezeichnet die verschiedenen Screening-Durchläufe, die griechische Bezeichnung dahinter (z.B. alpha), eine jeweilige 96-Loch Platte mit cDNA-Klon Präparationen.

Der letzte Bestandteil besteht entweder aus einer Koordinate (z.B. b4), die die Position des jeweiligen cDNA Klons auf der Platte angibt oder einer Zahl (z.B. 37), die ebenfalls die Position der cDNA angibt, wenn man bei a1, die 1 setzt und fortlaufend zählt.

Bisher wurden etwa 4×10^3 verschiedene cDNA-Klone auf ihre inhibitorische Aktivität getestet (von etwa $3,1 \times 10^6$ unabhängigen Klonen in der cDNA Bank). Die genaue

Zahl kann nicht sicher angegeben werden, da die Ausfallquote bei den DNA-Präparationen nur geschätzt werden kann und unbekannt ist, wie viele cDNA-Klone mehrfach präpariert wurden. Es kann aufgrund der stichprobenartig durchgeführten DNA-Konzentrationsmessungen davon ausgegangen werden, dass die Zahl der tatsächlich überprüften Klone etwa 5% niedriger liegt.

I-alpha b4

Die isolierte Sequenz stellt den C-terminalen Teil einer cDNA dar, die inzwischen als OLD35 „Polyribonukleotid Nukleotidyltransferase“ oder auch „Polynukleotid Phosphorylase“ (PNPase) in der Datenbank nach einer BLAST-Suche zu finden ist (Leszczyniecka, PNAS 2002); (Raijmakers, Egberts et al. 2002).

Zum Zeitpunkt der Identifizierung war dieser Eintrag nicht vorhanden, es wurde nur eine Homologie der Aminosäuresequenz zu einem RNA-bindenden Motiv (S1 Ribosomale RNA-Bindung) gefunden und einen Treffer für ein „vermeintliches Protein“.

PNPasen werden als evolutionär konservierte Proteine beschrieben, deren Isoform in *E.coli* strukturelle als auch funktionelle Homologien zur humanen Form aufweist (Raijmakers, Egberts et al. 2002). Die PNPase aus *E.coli* ist dort etwa für 10% des gesamten mRNA-Abbaus zuständig (Bermudez-Cruz, Garcia-Mena et al. 2002). Das humane Enzym ist Interferon-induzierbar und weist eine 3'-5'-Exonuklease Aktivität auf. Das *in vivo* zytoplasmatisch lokalisierende Protein weist *in vitro* eine starke RNA-abbauende Aktivität auf und ist bei Überexpression in Melanom Zellen in der Lage die Koloniebildung zu reduzieren (Leszczyniecka 2003).

Die Struktur des ganzen Proteins weist am N-terminus zwei RNase-Domänen auf und am C-Terminus eine KH-Domäne, sowie die bereits postulierte S1 RNA-Bindungsdomäne.

Die isolierte cDNA ist theoretisch in der Lage durch ein vorhandenes ATG und die nachfolgende Sequenz die S1-RNA Bindungsdomäne sowie 24 zusätzliche aminoternale und 30 zusätzliche carboxyterminale Aminosäuren zu exprimieren. Die anderen, im Gesamtprotein der etwa 120 kDA großen PNPase vorhandenen Domänen werden nicht von der isolierten cDNA kodiert.

Abbildung 3.32 zeigt den sehr interessanten Zusammenhang der veröffentlichten Sequenz der PNPase OLD35 und der identifizierten cDNA.

AS-Position:

1

665

783

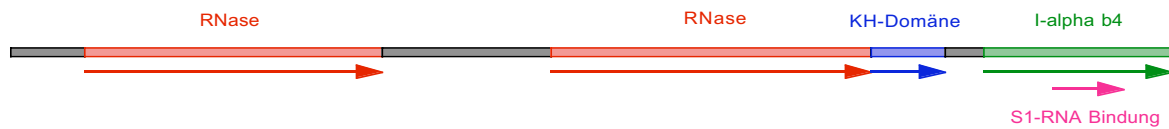


Abbildung 3.32: Schematische Übersicht der Protein-Domänen der humanen PNPase OLD35 (Balken). Die beiden RNase-Domänen sind in rot, die KH-Domäne in blau gezeigt. Der Bereich, der der cDNA I-alpha b4 entspricht ist grün gezeigt, die darin enthaltene S1 RNA-Bindungsdomäne in magenta (nach (Raijmakers, Egberts et al. 2002)).

Da die von der cDNA I-alpha b4 kodierte Proteinsequenz keine RNase-Domäne enthält, ist es sehr unwahrscheinlich, dass ein eventuell durch diese cDNA kodiertes Protein in der Lage ist eine RNase Aktivität zu entwickeln. Es wäre jedoch theoretisch möglich, dass RNA gebunden und auf anderem Wege dem Abbau zugeführt wird. Hierbei scheint eine gewisse Präferenz für bestimmte RNAs zu bestehen, da die Transfektion dieses cDNA-Expressionsplasmids in HeLa Zellen zu keiner sichtbaren Beeinträchtigung des Wachstums führte. Außerdem wurde in Experimenten zur Überprüfung des Einflusses der I-alpha b4 cDNA auf die Tat-vermittelte RFP-Expression mit dem Plasmid pLRed kein Effekt beobachtet (Daten nicht gezeigt). Mit dem Plasmid pLRed(2xINS)R hingegen wurde dieser Effekt beobachtet, was auch zur Identifizierung dieser cDNA führte. Die Konstruktion eines Plasmids zur Expression eines alpha-b 4-GFP Fusionsproteins zeigte keinerlei Abweichung von der, typischerweise nahezu homogen über die ganze Zelle verteilten, GFP-Lokalisation (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisation des alpha-b 4-GFP Fusionsproteins ist daher deutlich von der ausschliesslich zytoplasmatischen Lokalisation eines PNPase-GFP Fusionsproteins zu unterscheiden (Leszczyniecka, Kang et al. 2002).

I-kappa b2

Diese cDNA kodiert für das vollständige humane 14-3-3- γ (YWHAG) Protein, das der Familie der 14-3-3 Proteine angehört. 14-3-3 Proteine wurden zuerst aus Rinderhirn isoliert und bis heute sind von ihnen 9 Isoformen bekannt (Aitken, Collinge et al.

1992), die jeweils saure Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa darstellen.

Die Proteine dieser Familie spielen bei Signaltransduktions-Mechanismen eine Rolle, indem sie mit Phosphoserinen in Proteinen interagieren (Konsens-Motiv: RSXpSXP oder RXY/FXpSXP) und sind in Abläufe der zellulären Differenzierung, Proliferation und Transformation involviert.

Sie werden außer im Gehirn eigentlich nur noch in Skelett- und Herzmuskel stark exprimiert (Horie, Suzuki et al. 1999).

Obwohl Rev *in vivo* phosphoryliert werden kann, weist es, genau wie Tat, keine genaue Übereinstimmung mit dem Konsensus-Motif für eine Interaktion mit 14-3-3- γ auf. Dies schließt eine direkte Interaktion von Rev bzw. Tat mit 14-3-3- γ aber nicht vollständig aus. Aufgrund der vielfältigen Einflüsse dieser Proteine im Lebenszyklus von Zellen ist eine indirektere Einflussnahme auf die Reporter-Expression denkbar. Einflüsse auf die Proliferationseigenschaften oder den Transformationsgrad von Zellen wären wahrscheinlich in der Lage diese Auswirkung zu zeigen.

III-delta- 37

Dieser Klon trat aus mehreren Gründen aus der Masse der isolierten cDNAs heraus. In den ersten Analysen fiel der Klon durch eine sehr starke inhibitorische Aktivität auf, die sich aber in weiteren Versuchen mit neu präparierter Plasmid-DNA leider nicht bestätigen ließ. Es blieb eine leichte, mit der anderer Faktoren vergleichbare, Aktivität dieser cDNA. Eine weitere Besonderheit waren die Probleme bei der Sequenzierung dieses Klons. Durch eine Häufung von repetitiven GA-Sequenzen war eine Bestimmung der DNA-Sequenz des Klons vom 5'-Ende her nicht möglich, da die Sequenzierreaktion abbrach. Vom 3'-Ende her war die Sequenz gut zu lesen und wies auch ein deutliches polyA-Signal am 3'-Ende auf. Eine vollständige Sequenzierung durch „Primer-walking“ wurde aber bis jetzt nicht durchgeführt.

Die BLAST-Suche mit der erhaltenen Sequenz ergab einen 100%ige Homologie zu einem Teil eines BAC-Klons von Chromosom 12.

Bei der Homologie-Suche mehrerer willkürlich gewählter ORFs dieser cDNA, wurden sogenannte ALU-Warn-Einträge gefunden. Diese Einträge sollen verhindern, dass neue Proteinsequenzen dieser Art in die Datenbank gestellt werden, da diese sehr

wahrscheinlich fälschlicherweise in cDNA-Banken gelandet sind und im Genom nicht mit für Protein kodierende Sequenzen in Verbindung gebracht werden können.

Durch Nutzung der Software EIDorado (Genomatix GmbH) konnte der gesamte 3'-gelegene Teil der cDNA-Sequenz eindeutig in einem Intron einer humanen ATPase lokalisiert werden (s. Anhang III, Abb. III-3b).

Abgesehen von diesen Tatsachen bestehen keine Erkenntnisse über die weitere Natur des cDNA-Klons oder den Grund für die beobachtete inhibitorische Aktivität.

II-alpha-89

Die isolierte cDNA kodiert für ein Protein, das etwa 2/3 der AS-Sequenz des veröffentlichten SOX11 umfasst. Es wurde beschrieben, dass das humane SOX11 während der neuronalen Entwicklung hochreguliert ist (Azuma, Ao et al. 1999), was eine Isolierung aus einer cDNA-Bank aus fötalem Hirn wahrscheinlich macht.

SOX11 gehört zur Familie der SOX-Transkriptionsfaktoren, die eine Schlüsselrolle während der neuronalen Entwicklung spielen, indem sie autoregulativ an bestimmte DNA Konsens-Motife binden (Wiebe, Nowling et al. 2003). Die sogenannte HMG-Domäne (High Mobility Group), die für die DNA-Bindung verantwortlich gemacht wird, wird jedoch nicht von der cDNA II-alpha-89 kodiert, da sie im N-terminalen Drittel des Proteins lokalisiert ist (Kuhlbrodt, Herbarth et al. 1998). Für SOX10 wurde vor kurzem beschrieben, dass es eine Leucin-reiche Domäne besitzt, die der NES von Rev ähnelt, die mit Crml interagiert (Rehberg, Lischka et al. 2002) und dem Konsens-Motif für Leucin-reiche Export-Signale nach (Bogerd, Fridell et al. 1996) entspricht. Diese Domäne ist in SOX11 aber nur unvollständig konserviert und im Übrigen auf der isolierten cDNA nicht enthalten.

Das Proteinfragment, das von der isolierten cDNA translatiert werden könnte, besitzt jedoch einen sehr ausgedehnten Bereich an sauren Aminosäuren (14 Aspartate in Folge), der auch zu unspezifischen Interaktionen mit den basischen Aminosäuren in Rev und Tat führen könnte.

III-delta-55

Dieser Klon repräsentiert die C-terminale Hälfte des 314 AS langen humanen „short chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase“ Proteins (SCHAD), das in der b-Oxidation eine Rolle spielt.

Die cDNA dieses Proteins wurde ursprünglich aus einer Leber-Klonbank isoliert und es wurde gezeigt, dass die mRNA in fast allen Geweben außer Gehirn, Plazenta und Lunge zu finden ist (Vredendaal, van den Berg et al. 1996). Entgegen dieser Veröffentlichung wurde in dem durchgeführten Screening diese cDNA aus einer fötalen Hirn Bank isoliert.

Das gesamte Protein weist an seinem N-Terminus eine 12 AS lange mitochondriale Signalsequenz auf, die der isolierten cDNA natürlich fehlt. Möglicherweise interagiert das daher nicht ins richtige Kompartiment gelangte Proteinfragment mit den Abläufen der Reporter-Expression durch Tat und Rev. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass es sich bei dieser identifizierten cDNA um einen der gesuchten Astrozyten-Faktoren handelt, da das Protein ausserhalb von Mitochondrien nicht in Zellen vorliegen würde.

II-beta-47

Die cDNA beinhaltet das C-terminale Viertel der 765 AS langen humanen Topoisomerase I. Die DNA Topoisomerase löst Torsionsspannungen, die durch transkriptionelle Prozesse ausgelöst werden und wird im Nukleoplasma für die mRNA Synthese und in den Nukleoli für die rRNA Synthese benötigt. Dieses Enzym wandert dabei ständig zwischen Nukleoli und Nukleoplasma hin und her, weist jedoch in seinem Wild-Typ eine dominante nukleoläre Lokalisation auf. Es wurde gezeigt, dass auch Fragmente der Topoisomerase I noch die Fähigkeit haben in den Nukleoli zu lokalisieren, jedoch für die Fähigkeit des Proteins sich an Strukturen der Nukleoli zu verankern mit dem N-Terminus verbunden ist (Christensen, Barthelmes et al. 2002).

Eine trunkierte Form des Proteins wäre möglicherweise in der Lage durch Lokalisation im Zellkern oder den Nukleoli, gestörte Transkriptionsprozesse zu schaffen.

III-beta-36

Dieser Klon repräsentiert die β -Isoform der katalytischen Untereinheit der humanen Protein Phosphatase 2 (PPP2CB). Protein Phosphatase 2 existiert in Zellen in zwei Formen. Als Core-Enzym und als Holo-Enzym. Das Core-Enzym besteht aus einer

katalytischen (ca. 35 kDa) und einer regulatorischen Untereinheit B (ca. 65 kDa). Kommt dazu noch eine regulatorische Untereinheit A, entsteht das Holo-Enzym.

Protein Phosphatasen dieser Familie interagieren mit einer Vielzahl von zellulären Faktoren und sind in die unterschiedlichsten Regulationswege eingebunden (Janssens and Goris 2001). Wie später noch in der Diskussion erwähnt, ist für ein Mitglied dieser Familie gezeigt worden, dass es in der Lage ist die Tat-vermittelte Transkriptionsregulation zu unterdrücken.

Das Wechselspiel von katalytischen und regulatorischen Untereinheiten ist überaus komplex und einige Untereinheiten werden nur in bestimmten Geweben exprimiert, während andere ubiquitär vorhanden sind. Zhou und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sogar innerhalb 10 verschiedener Glioblastom-Zelllinien die Anteile der verschiedenen regulatorischen Untereinheiten stark schwanken, bzw. einzelne Untereinheiten teilweise gar nicht exprimiert werden (Zhou, Pham et al. 2003).

Es ist unklar, welche Folgen in diesem speziellen Fall die Überexpression einer katalytischen Untereinheit auf die Aktivität der Enzyme hat. Möglich wäre allerdings eine verstärkte Phosphatase-Aktivität, falls die überexprimierte Untereinheit in den, für den Reporter-Assay verwendeten Zellen, einen limitierenden Faktor darstellt.

II-lambda-23

Dieser Klon kodiert für den C-terminalen Teil einer als KIAA-Klon veröffentlichten cDNA-Sequenz ohne angegebenes Start-Kodon.

Es sind keine weiteren Erkenntnisse über dieses Protein vorhanden und ebenfalls nicht von dieser cDNA.

III-alpha-65

Dieser cDNA-Klon beinhaltet etwa die C-terminalen 50% eines Proteins, das als „human CDC10 cell division cycle homolog (*S.cerevisiea*)“ eingetragen ist.

Ein möglicher Mechanismus zur Interferenz dieser cDNA mit der Reporter-Expression ist nicht bekannt.

II-gamma-52, III-alpha-56, II-delta-76

Über diese cDNA-Klone ist wenig bekannt, sie scheinen nicht für Proteine zu kodieren, die homolog zu bereits bekannten bzw. durch BLAST-Suche zu ermittelnden Proteinen oder vermeintlichen Proteinen sind. Die Treffer die mit der BLAST-Suche erhalten wurden sind im Folgenden aufgeführt.

Die Nukleotidsequenz von **II-gamma-52** wurde auf einem BAC-Klon (Bacterial artificial Chromosome) des humanen Genom-Projektes lokalisiert, der Sequenzen des humanen Chromosoms 8 enthält (Klon RP11-429M12).

Die Nukleotidsequenz von **III-alpha-56** wurde auf einem BAC-Klon des humanen Genom-Projektes lokalisiert, der Sequenzen des humanen Chromosoms 6 enthält (Klon RP3-375P9).

Die Nukleotidsequenz von **II-delta-76** konnte einer, im Rahmen eines japanischen cDNA-Sequenzierungsprojektes, veröffentlichten cDNA aus humanem Lungengewebe zugewiesen werden. Diese wurde ohne weitere Information oder Angabe von ORFs publiziert (Klon FLJ23190).

4 Diskussion

Tat und Rev sind, wie auch im Verlauf dieser Arbeit beschrieben, essentielle regulatorische Proteine von HIV. Eine deutlich eingeschränkte Funktion auch nur eines dieser beiden Proteine führt zu einer verminderten Virusreplikation. Diese nicht-produktive Virusreplikation durch Beeinträchtigung des Rev Proteins ist in humanen Astrozyten zu beobachten (Neumann, Felber et al. 1995; Ludwig, Silberstein et al. 1999). Des Weiteren zeigt sich in diesem Zelltyp eine gestörte intrazelluläre Lokalisation des Rev Proteins, das zu einem Grossteil im Zytoplasma dieser Zellen vorliegt. Als nukleo-zytoplasmatisches Shuttle-Protein ist für Rev die zelluläre Lokalisation ein wichtiges Charakteristikum seiner Funktion, da es seine Ziel-RNA im Zellkern binden muss.

Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe legten die Anwesenheit eines oder mehrerer dominanter, übertragbarer Faktoren im Zytoplasma humaner Astrozyten nahe (Neumann, Afonina et al. 2001).

Mit dieser Arbeit wurden die Voraussetzungen zur Identifizierung dieses, aber grundsätzlich auch anderer inhibitorischer Faktoren gelegt. Es wurde ein Testsystem für die Tat- und Rev-Funktion entwickelt, das sich für Inhibitor-Screenings eignet.

Im Rahmen dieser Diskussion werden einzelne Kernpunkte dieses Systems sowie seiner Anwendungen diskutiert und in einen Zusammenhang zu zellulären Vorgängen gestellt. Zusätzlich wird die Funktion bzw. Lokalisation einiger erstellter molekularer Rev-Konstrukte diskutiert und ihre Auswirkung auf das Verständnis der Rev-Funktion.

Es werden verschiedene Modelle der Astrozyten-vermittelten Rev-Inhibition angeboten und Möglichkeiten im Hinblick auf zukünftige Untersuchungen dargelegt.

4.1 Reporter-Plasmide

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Reporter-Systeme zur Detektion der Tat- und Rev-Funktion entwickelt. Genauer gesagt wurde eine Reihe von Reporter-Plasmiden erstellt, die in ihren Eigenschaften voneinander abweichen und unterschiedliche Eignung für verschiedene Fragestellungen zeigen. Außerdem wurde eine

sogenannte Reporter-Zelllinie generiert, die sich zur Detektion der Tat- und Rev-Funktion eignet. Im Folgenden werden Eigenschaften, sowie Vor- und Nachteile, der einzelnen Komponenten kurz zusammengefasst und abgewägt.

pLRed bzw pLRed_{Quick}

Diese Plasmide können zur effektiven Detektion der Tat-Funktion eingesetzt werden. Wie gezeigt, ergibt sich nach Kotransfektion mit Tat-Expressionsplasmid eine dosisabhängige Expression von RFP, die mit einem FACS-Gerät einfach quantifizierbar ist. Ähnliche Konstrukte mit GFP wurden in der Literatur bereits beschrieben (Dorsky, Wells et al. 1996; Daelemans, De Clercq et al. 2001). Jedoch erlauben diese Konstrukte nicht die gleichzeitige Benutzung ebenfalls GFP-markierter Protein, wie z.B. Tat-GFP selbst.

Eine Transfektion der Konstrukte pLRed und pLRed_{Quick} in HeLa-Tat Zellen, führt zu einer extrem starken Expression von RFP. Inhibitoren, die entweder allein auf die Basis-Aktivität der HIV-LTR wirken oder die die Tat-vermittelte Transaktivierung hemmen, könnten mit dieser Methodik identifiziert werden.

pLRed_{Quick} besitzt gegenüber pLRed den Vorteil auch in Zellen mit geringer Stoffwechselaktivität schnell zu einer auswertbaren RFP-Fluoreszenz zu gelangen, weil nach einer bestimmten Zeit, ein grösserer Anteil an exprimiertem Protein in der Lage ist auch zu fluoreszieren.

pLRedR bzw pLRed_{Quick}R

Diese Konstrukte waren Ausgangspunkt für viele weitere, darauf aufbauende Klonierungen, was ihre Wichtigkeit unterstreicht. Davon abgesehen wurden sie aber nur noch in einigen Experimenten als Referenzplasmid verwendet (s. Bestimmung der INS-Aktivität), da sie als Reporter-Plasmide für Tat- bzw. Rev-Funktion meist nicht brauchbar waren. Die Expression ist zwar Tat-abhängig, jedoch ist die maximal erreichbare Expression von RFP, aufgrund des leichten RNA-destabilisierenden Effekts der RRE, geringer als bei Verwendung von pLRed. Damit wird ein gewisser Teil induzierbaren Potentials im Experiment sozusagen verschenkt. Trotz der RRE allerdings, ist das Konstrukt auch nicht geeignet um Rev-Funktion anzuzeigen, da auch ohne Anwesenheit von Rev noch eine starke Expression von RFP stattfindet. Somit kann nicht empfohlen werden Tat- bzw. Rev-Funktionsassays mit diesen Konstrukten durchzuführen.

Allerdings wurde mit diesem Konstrukt eine stabil RFP exprimierende Zelllinie auf Basis von HeLa-Tat Zellen generiert. Die sogenannte HeLa-Tat RED Zelllinie kann als Referenz für RFP-Expression im FACS und Fluoreszenzmikroskop dienen, sowie für einige andere, speziellere Anwendungen wie Zellfusions-Assays.

pLRedINSR bzw pLRed_{Quick}INSR

Zu Beginn der Arbeit war pLRedINSR das erste Plasmid das eine Anwendbarkeit in Rev-Funktionsassay zeigte. Sein Aufbau orientiert sich in hohem Maße am genomischen Aufbau von HIV. Im Gegensatz zu dem später erwähnten pLRed(2xINS)R besitzt es eine einfache Kopie des *gag* Sequenzbereichs aus dem HIV Genom.

Wie gezeigt werden konnte, entwickelte sich bei Transfektion des Plasmids in Zellen nur in der Anwesenheit von Tat und Rev die maximale Expression von RFP. Die beobachtete Hintergrundaktivität, auch ohne die Anwesenheit von Rev, war kein unbedingtes Hindernis bei der Auswertung von Funktionsstudien. Je nach experimentellen Bedingungen war eine Induktion der RFP-Expression von 10-15 fach bei Rev-Koexpression zu beobachten.

Die Erzeugung einer stabilen Zelllinie mit dem Konstrukt pLRedINSR wurde allerdings durch diese Hintergrundaktivität verhindert. Es gelang nach Transfektion in HeLa-Tat Zellen nicht, eine durch Rev induzierte RFP-Expression zu erreichen. Erhaltene Zellklone waren entweder nicht induzierbar oder wiesen bereits eine relativ starke Basisexpression an RFP auf, vergleichbar mit der der Zelllinie HeLa-Tat RED. Dies lag höchstwahrscheinlich an dem hohen transkriptionellen Niveau das in HeLa-Tat Zellen erreicht wird, sowie an der extrem langen Abbau-Halbwertszeit des verwendeten *DsRed1* Proteins (nach Aussage von Clontech, Palo Alto, USA wahrscheinlich $t_{1/2} > 48$ h). Da ein gewisser Prozentsatz der großen Zahl an transkribierten RNAs offensichtlich doch ins Zytoplasma gelangt, akkumuliert das dort translatierte Protein und verursacht eine konstitutive RFP-Fluoreszenz.

pLRed(2xINS)R

Diese Weiterentwicklung von pLRedINSR zeigte schließlich alle, von einem Tat- und Rev-abhängigen Reporter-Plasmid erwarteten Eigenschaften.

Es konnte gezeigt werden, dass in der Abwesenheit von Tat oder Rev keine detektierbare Expression an RFP stattfindet. Bei transienten Transfektionen in HeLa-

Tat Zellen wurde unter den gewählten Bedingungen in der Regel eine Induzierbarkeit erreicht, die größer als 15-fach für Rev-GFP war.

Die Reporter-Zelllinie HeLa-Tat ROD eignet sich für Rev-Funktionsanalysen

Mit diesem Konstrukt wurde die Zelllinie HeLa-Tat ROD erzeugt, die sich sehr gut als Reporter-Zelllinie zur Rev-Funktionsanalyse eignete. Es konnten mit ihrer Hilfe viele Rev-Konstrukte auf ihre Funktionalität hin überprüft werden, ebenso wie Screenings für Rev-inhibierende Faktoren durchgeführt werden. Die Zelllinie stellte sich als ausgezeichnete Grundlage für eine Vielzahl an Experimenten dar, da mit ihr eine Reproduzierbarkeit der Experimente erreicht werden konnte, die transient nicht möglich war. Unter standardisierten Bedingungen waren die Abweichungen der Experimente geringer als 5%, bei transienten Transfektionen waren zumindest 10% Abweichung die Regel (s. Abb. 3.21 im Vergleich zu Abb 3.24).

Die Vorgänge die in der Zelllinie HeLa-Tat ROD bei Aktivierung der RFP-Expression durch Rev ablaufen sind stark vereinfacht in Abbildung 4.1 wiedergegeben.

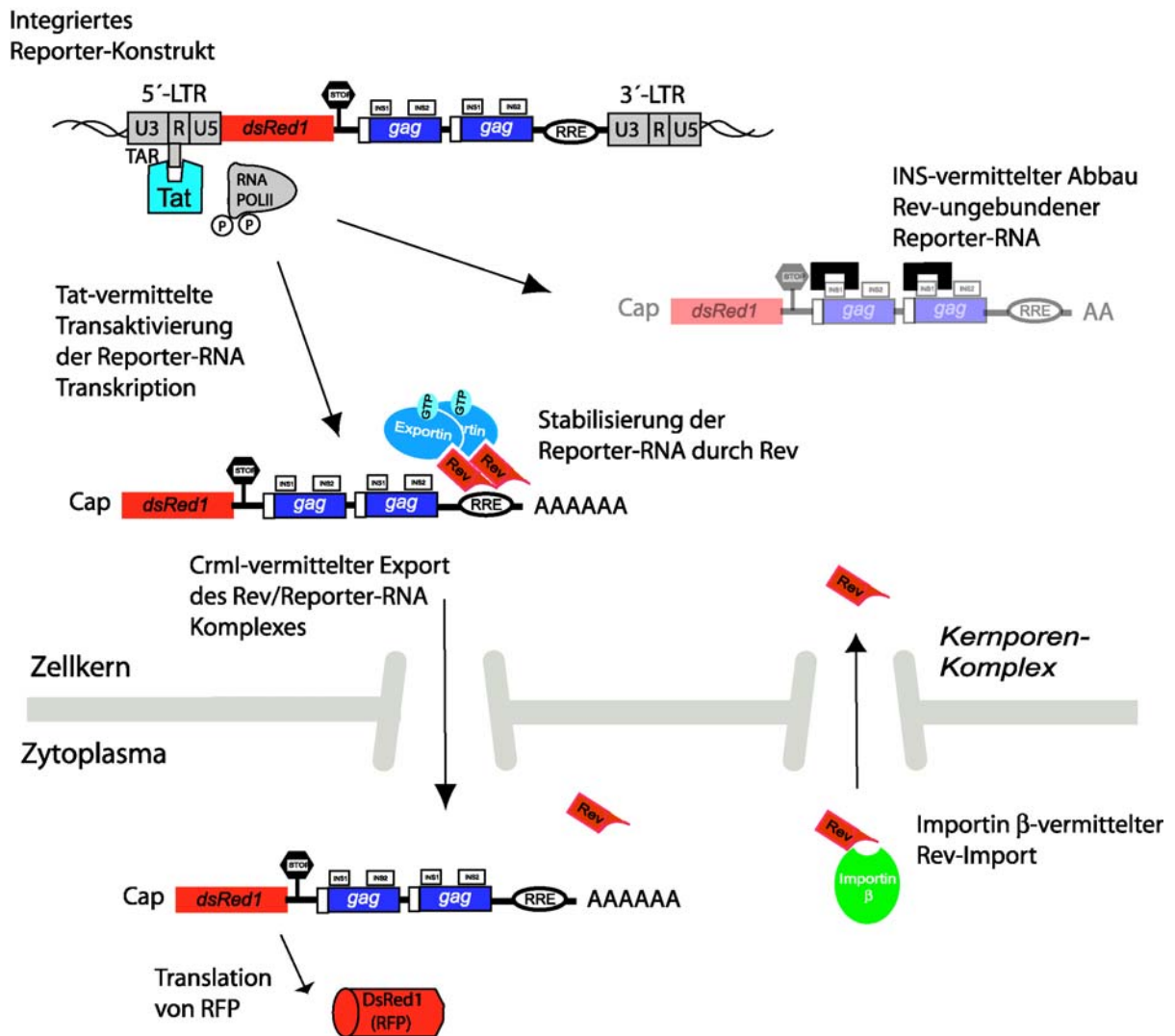


Abbildung 4.1: Stark vereinfachter Ablauf der Aktivierung der RFP-Expression durch Rev in HeLa-Tat ROD. Ganz oben: Konstitutiv exprimiertes Tat vermittelt eine stetige Transkription der Reporter-RNA. Rechts oben: RNA die nicht durch Rev stabilisiert wird, wird durch INS-vermittelte Mechanismen im Zellkern in Abbauewege geschleust. Mitte bis unten: An Rev gebundene RNA wird durch Crm1 (Exportin) ins Zytoplasma transportiert; dort wird RFP translatiert. Rev wird durch Importin β wieder in den Zellkern transportiert. Andere notwendige Kofaktoren sind in der Abbildung nicht gezeigt.

Die beschriebene Methode des Screenings nach Inhibitoren der HIV-1 Genexpression mit Hilfe der Zelllinie HeLa-Tat ROD hatte jedoch den Nachteil, dass jeweils nur zuvor isolierte cDNA-Klone für eine Analyse der inhibitorischen Aktivität verwendet werden konnten. Theoretisch wäre eine Transduktion der Reporter-Zelllinie mit einem Pool an pseudotypisierten Partikeln denkbar, die eine stabile Integration von cDNA-Expressionskassetten in den Zellen vermitteln. Nach Transfektion mit RevGFP-Expressionsplasmid müssten dann nur noch durch eine FACS-basierte Sortierung, die Zellen ausgewählt werden, die grün aber nicht rot

sind, d.h. keine starke Reporter-Aktivität zeigen. Aus den erhaltenen und expandierten Zellklonen könnten die cDNA-Inserts dann wieder isoliert werden. Allerdings wurde dieser experimentelle Aufbau durch die Tatsache verhindert dass die Überexpression von RevGFP in den Zellen in fast 100% der Fälle nach wenigen Zellteilungen zum Absterben der Zellen führt. Somit wäre in der Regel nicht genügend Zeit um die Klone zu expandieren und sicher die cDNAs zu reisolieren. Dieses Charakteristikum von Rev, HeLa Zellen durch seine Überexpression zu töten, machte die aufwändige Methodik der Isolierung einzelner cDNAs notwendig und limitierte die Zahl überprüfter cDNAs damit deutlich. Eine Strategie zur Lösung dieses Problems könnte die Etablierung eines induzierbaren *rev* Gens sein. Damit könnte nur für die Dauer des Screenings die Expression von Rev(GFP) aktiviert und, nach erfolgter Selektion mit dem FACS-Gerät, sobald wie möglich wieder deaktiviert werden um die Zellen zu schonen. Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre die Reduktion der cDNA Kandidaten schon vor dem Screening. Dies könnte durch substraktive Hybridisierungen von gewonnenen cDNAs aus Astrozyten und Kontrollzellen erreicht werden.

Zwei Auswertungsmethoden für den Reporter-Assay wurden etabliert

Für die Analyse der Daten aus den Reporter-Systemen wurden zwei Auswertungsmethoden entwickelt. Eine Methode basiert auf der Ermittlung der Mediane der Intensitäten der roten bzw. grünen Fluoreszenz in der doppelt fluoreszierenden Zellpopulation. Dieses Verfahren eignet sich hauptsächlich für fein abgestimmte Quantifizierungen von Unterschieden in der RFP-Expression von verschiedenen Reporter-Konstrukten (s. Bestimmung der INS-Aktivität).

Die zweite Methode basiert auf der Ermittlung des RFP-positiven Anteils an einer transfizierten Zellpopulation und sollte für Induktionsexperimente im Zusammenhang mit der Zelllinie HeLa-Tat ROD oder dem Konstrukt pLRed(2xINS)R in transienten Transfektionen angewendet werden.

4.2 Bestimmung der RNA-destabilisierenden Aktivität von INS-Regionen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die durch einen bioinformatischen Ansatz vorhergesagten INS-Elemente im HIV-1 Genom im entwickelten Reporter-Assay tatsächlich eine Auswirkung auf die Quantität der RFP-Expression haben (Wolff, Brack-Werner et al. 2003). Dieser Effekt war, wie erwartet (Schneider, Campbell et al. 1997), nur in Plusstrang-Orientierung zu beobachten. Es konnte weiter gezeigt werden, dass eine Aneinanderreihung mehrerer Elemente auch zu einer weiteren Verminderung der RFP-Expression führt.

Wie in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet, sind INS-Effekte nicht auf die HIV-1 Genexpression beschränkt, sondern sind innerhalb eines teilweise heterologen Reporter-Systems (Expression von *DsRed1*) im zellulären Kontext wirksam.

Zelluläre mRNAs unterscheiden sich in ihrer Halbwertszeit stark und liegen zwischen wenigen Minuten bis zu 24 h in der Zelle vor (Tourriere, Chebli et al. 2002). Die Mechanismen des Abbaus von mRNA in eukaryotischen Zellen sind überaus vielfältig und involvieren sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Strukturen (Yang, Steussy et al. 1996; Shim, Lim et al. 2002; Tourriere, Chebli et al. 2002). Eine Regulation der mRNA-Halbwertszeit, bzw. -Stabilität durch einen einzigen Mechanismus ist daher unwahrscheinlich. Dies wirft die grundsätzliche Frage auf, ob mRNAs sozusagen von Natur aus stabil sind und nur durch die Anwesenheit bestimmter destabilisierender Signale einem vorzeitigen Abbau zugeführt werden, oder, ob sie durch definierte RNA-Elemente stabilisiert werden können. Viele Hinweise deuten auf die Existenz solcher stabilitätsvermittelnder Sequenzen in einer Vielzahl von Organismen und zellulären mRNAs hin. Eine ausführliche, wenn auch nicht ganz aktuelle Übersicht, ist in (Ross 1995) zu finden.

Welcher Art die Effekte der inhibitorischen Elemente, die in dieser Arbeit getestet wurden, sind, ist aber bisher ungeklärt. Eine Erklärung für die Aktivität der INS-Elemente auf RNA-Ebene gibt die Theorie, dass diese Sequenz-Bereiche ein bzw. mehrere Struktur motive ausbilden, an die zelluläre Proteine binden können (Olsen, Cochrane et al. 1992). Diese können den Abbau der mRNA im Zellkern vermitteln, beispielsweise in nukleären Exosomen, die eine 3'-5'-Exonuklease Aktivität aufweisen (Tourriere, Chebli et al. 2002). Die mRNA kann solche Bindungen grundsätzlich durch 5'- und 3'- UTRs (untranslated regions), aber auch kodierende Bereiche ihrer Sequenz vermitteln (Shim, Lim et al. 2002). Im Zytoplasma existieren ebenfalls Möglichkeiten mRNAs abzubauen. Ein Mechanismus für den Abbau von

polyA-haltiger RNAs ist die Deadenylierung und anschließende Entfernung der Cap-Struktur von der mRNA, wonach diese einem 5'-3'-Exonuklease-vermitteltem Abbau zugeführt wird. Die Deadenylierung vermögen zelluläre Faktoren, wie z.B. das poly(a)-binding Protein (Afonina, Neumann et al. 1997) aber zu verzögern, indem sie an polyA-mRNA binden und den Zugriff der Deadenylasen darauf blockieren (Tourriere, Chebli et al. 2002). Ein weiterer Faktor dieser Art ist das das Polypyrimidin tract-binding Protein (Black, Luo et al. 1995).

Ob die in dieser Arbeit beobachteten INS-Effekte allerdings tatsächlich, wie postuliert, auf Ebene der mRNA wirken, kann nicht abschließend beantwortet werden, jedoch spricht einiges dafür. Ein Einfluß von translationalen Aktivitäten, wie Kodon-Nutzung, kann durch die Stopp-Kodons am Ende des vollständig aus optimalen humanen Kodons bestehenden Gens für *DsRed1* ausgeschlossen werden. Transkriptionelle Einflüsse sollten ebenfalls weitgehend auszuschließen sein, da die Plasmide immer im Bezug zur exakt gleich großen Kontrolle (Region in der Negativstrang-Orientierung) ausgewertet wurden. Trotz den eindeutig festzustellenden Effekten der bekannten INS1 und INS2 Regionen, sowie der neuen INS5 und INS6, hatten einige weitere getestete Elemente keine Auswirkung auf die RFP-Expression oder zeigten widersprüchliche Ergebnisse in der antisense-Kontrolle. Darunter fielen die Regionen INS4, INS7 und INS10. INS4 und INS7 zeigten eine so schwache Aktivität in dem Assay, dass nicht von einer gesicherten Funktion ausgegangen werden konnte. In einigen Experimenten wurde sogar eher ein expressionssteigernder Effekt beobachtet. Es ist möglich, dass in den, mehr oder weniger willkürlich gruppierten, INS-Regionen, nicht immer gleich wirksame Elemente zusammenkamen. Die Aktivität der enthaltenen Elemente könnte daher für eine Detektion einfach zu gering gewesen sein. Es ist aber ebenfalls denkbar, dass in den Sequenzen die als INS4 und INS7 getestet wurde noch andere Elemente präsent sind, die mit den benutzten bioinformatischen Methoden nicht entdeckt werden konnten und in ihrer Wirkung der Inhibition entgegen wirkten. Suptawiwat und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sich im *env* Gen von HIV-1 bisher unidentifizierte Sequenzbereiche befinden, deren Anwesenheit auf mRNAs, im Zusammenhang mit der RRE und Rev, eine Steigerung der Expression von p24 in einem Reporter-Konstrukt zur Folge hatte (Suptawiwat, Sutthent et al. 2003). Ein weiteres, sehr interessantes, wenngleich auch nicht sicher interpretierbares Ergebnis, lieferte die als INS10 bezeichnete Sequenz. In der Plusstrang-Orientierung

war in mehreren Experimenten ein leichter aber deutlicher INS-Effekt feststellbar, jedoch zeigte die Negativstrang-Orientierung sogar eine vollständige Unterdrückung der RFP-Expression. Es konnte nicht festgestellt werden, auf welcher Ebene sich die Unterdrückung der RFP-Expression abspielte, d.h., ob überhaupt genug RNA transkribiert wurde, oder ob diese lediglich sofort wieder abgebaut wurde. Da die RFP-Expression nicht durch die Expression von RevGFP gesteigert werden konnte, liegt ein grundsätzliches Fehlen von vollständiger RNA nahe. Der Bereich, aus dem diese INS10-Sequenz stammt, befindet sich im Bereich des *nef* Gens bzw. sehr nahe an der 3' gelegenen LTR befindet. Dort könnten RNA-Elemente, die in Negativstrang-Orientierung zu einer Unterdrückung der Transkription führen, dafür sorgen, dass keine „antisense“ RNA des viralen Genoms durch die transkriptionelle Aktivität der 3'-LTR produziert wird. Dies wäre für den viralen Replikationszyklus wahrscheinlich fatal. Es wurde bereits eine Unterdrückung der LTR-Aktivität im Zusammenhang mit *nef*-Teilsequenzen berichtet (Ludvigsen, Werner et al. 1996), auch in antisense Orientierung (Mori, Takada et al. 1990). Ob dies aber der tatsächliche Mechanismus ist, könnten nur weitere Untersuchungen wie, z.B. Northern-Hybridisierungen oder Mutagenese-Experimente, zeigen. Abschließend kann festgestellt werden, dass sich der verwendete experimentelle Ansatz zur Verifizierung der INS-Regionen, zumindest teilweise, als geeignet erwies, und sich in seiner Anwendbarkeit sicher nicht nur auf HIV-Sequenzen beschränkt.

4.3 Inhibitoren der HIV-Genexpression

Wie bereits in der Einleitung angedeutet, richten sich bisher in der Therapie gegen HIV/AIDS eingesetzte Medikamente, neben rein palliativer Behandlung, vornehmlich gegen einige wenige virale Ziele. Durch die eingeschränkte Zahl der Angriffspunkte am Virus lässt sich die hohe Rate an Medikamenten mit Kreuzresistenzen sowie die generell schnelle Resistenzentwicklung erklären. Es ist leicht zu akzeptieren, dass eine hohe Mutationsrate des Virus schnell zur Wirkungsabschwächung führt, wenn nur sehr begrenzte Bereiche auf DNA-, bzw. Proteinebene einen Angriffspunkt für die Therapie darstellen. Es stellt sich daher die Frage, ob grundsätzlich neue Möglichkeiten für eine Behandlung mit geringen Nebenwirkungen und einer geringen

Chance der Bildung von „escape“ –Mutanten, d.h. von Viren die sich dem Zugriff des Immunsystems oder der Therapie entziehen, existieren. Generell besteht die Möglichkeit mit therapeutischen Mitteln einerseits Bestandteile von HIV direkt und andererseits zelluläre Interaktionspartner von HIV anzugreifen. Beide Varianten besitzen Vor- und Nachteile, die kurz erläutert werden sollen.

Zelluläre Interaktionspartner als Angriffsort

Pharmaka mit Wirkung auf notwendige zelluläre Interaktionspartner von HIV könnten gute Dienste leisten, wenn es um die Verhinderung von viralen „escape“-Mutanten geht (Wodrich and Krausslich 2001). Eine Domäne eines zellulären Proteins, das beispielsweise spezifisch für die Bindung eines regulatorischen Proteins wie Rev zuständig ist, könnte aufgrund der geringeren Mutationsrate des Wirtsgenoms diesem therapeutischen Druck nicht leicht ausweichen. Eine Problematik dieses Ansatzes besteht selbstverständlich darin, mit diesen Pharmaka zelluläre Funktionen so weit wie möglich nicht zu beeinträchtigen und Faktoren der Wirtszelle nur so anzugreifen, dass sie den Wirtsstoffwechsel nicht negativ beeinflussen. Dies ist bei domänenspezifischen Interaktionen theoretisch durchaus denkbar. Jedoch sind solche Interaktionen mit existierenden Assays schwierig identifizierbar, was ein deutlicher Nachteil dieses Ansatzpunktes ist. Auch dürfte die Zahl solcher spezifischer Angriffspunkte eng begrenzt sein, da virale Proteine bekanntermaßen zelluläre Stoffwechselwege auch durch Nachahmung zellulärer Faktoren (oder zumindest deren funktionellen Domänen) für sich rekrutieren. Viele Virusfaktor/Zellfaktor-Interaktionen werden daher an Proteindomänen stattfinden, die auch für Zellfaktor/Zellfaktor-Interaktion benötigt werden. Aufgrund der Komplexität des zellulären Stoffwechsels kann nur sehr schwer ausgeschlossen werden, dass eine bestimmte Domäne eines Wirts-Proteins wirklich nicht benötigt wird. Langfristig auftretende, und daher schwierig als solche zu identifizierende, Schäden könnten bei einem erzeugten Stoffwechselungleichgewicht die Folge sein.

Virale Faktoren als Angriffsort

Ein großer Vorteil viraler Faktoren als Angriffsziele ist die Spezifität die erreicht werden kann. So ist es den Charakteristika der viralen RT und der PR zu verdanken, dass Inhibitoren dieser Proteine entwickelt werden konnten (Forth, Henschler et al. 2001);(Modrow 2003). Die virale RT weist eine vielfach höhere Affinität für Azidothymidin auf, als andere Polymerasen (Ma, Bathurst et al. 1992). Aktuelle Proteaseinhibitoren zeigen eine fast 100%ige Spezifität für die virale Protease und binden praktisch nicht an zelluläre Proteasen (allerdings interferieren sie an völlig anderen Orten der Wirtszelle doch wieder unspezifisch mit deren Stoffwechsel (Hui 2003), was wieder die Komplexität der zellulären Stoffwechselwege unterstreicht).

Ein Nachteil dieses Ansatzes ist das bereits beschriebene Auftreten viraler „escape“-Mutanten. Der Anstieg der inhibitorischen AZT-Konzentration (IC_{50}) bezüglich der viralen RT, kann beispielsweise durch vier Mutationen im Enzym (AS-Pos. 41, 67,70 und 215) um das 180fache steigen, was eine medikamentöse Gabe praktisch unmöglich macht (Forth, Henschler et al. 2001).

Derzeitige HIV-Therapeutika werden daher nur in Kombinationstherapien eingesetzt. Ein Vorteil ist, dass die Identifizierung von Interakteuren mit viralen Proteinen auf viele verschiedene Arten durchgeführt werden kann. Da das Ziel bekannt ist, können beispielsweise auch Bindungsassays o.ä. mit rekombinantem viralem Protein durchgeführt werden, was in dieser Art mit zellulären Faktoren nicht einfach umsetzbar ist.

Abschließend abgewägt stellen sich beide Ansatzpunkte als etwa gleichwertig dar. Die Tatsache, dass aber derzeit praktisch nur Therapien mit viralen Zielen entwickelt werden, legt nahe, dass die Identifizierung und Absicherung von Inhibitoren zellulärer Ziele schwieriger oder langwieriger ist und ihnen vielleicht erst ein Platz unter den Therapeutika der nächsten Generation zukommen wird.

4.3.1 Möglichkeiten und Grenzen von zellulären Tat- und Rev-Inhibitoren

Natürlich dürfen nicht nur Tat und Rev als Ziele zellulärer Inhibitoren angesehen werden, jedoch liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf diesen beiden Proteinen. Der folgende Abschnitt lässt sich jedoch allgemein auf zelluläre Inhibitoren pathogener Prozesse anwenden.

Grundsätzlich ist die Identifizierung eines inhibitorischen Faktors der HIV-Genregulation vorrangig immer unter dem Aspekt des Wissenszuwachses zu betrachten, und erst in zweiter Linie unter dem Aspekt therapeutischer Möglichkeiten. Zwar müssen, wie bereits in der Einleitung erwähnt, neue verträgliche Therapien gegen eine HIV-Infektion entwickelt werden, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit der direkten Anwendbarkeit eines identifizierten Proteins, oder einer RNA o.ä., als HIV-Therapeutikum äußerst gering.

Trotzdem können mit den aus einer neuen inhibitorischen Wechselwirkung stammenden Erkenntnissen neue Ansatzpunkte für eine gezielte Entwicklung solcher Medikamente entstehen. Viele heute für eine bestimmte Erkrankung eingesetzten Medikamente wurden ursprünglich für die Therapie einer ganz anderen Erkrankung entwickelt und kamen sozusagen erst später wieder zu „neuen Ehren“, indem wissenschaftliche Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung einer neuen Krankheit gewonnen wurden. Prominentes Beispiel hierfür ist das, bereits erwähnte AZT, dessen Einsatzgebiet von der Krebs- zur HIV-Therapie verlagert wurde.

Daher müssen alle neu entdeckten Inhibitoren, auch wenn sie keine direkte Anwendbarkeit zeigen, auch unter diesem Gesichtspunkt betrachtet werden.

Welche Möglichkeiten für inhibitorische Faktoren bestehen, die Reporter-Expression in dem verwendeten Assay zu reduzieren, umreißt die Abbildung 4.2 kurz. Die Abbildung orientiert sich an Abbildung 4.1 und es konnten wie dort, aus Platzgründen, bei weitem nicht alle bisher bekannten möglichen Angriffspunkte für Interferenzen dargestellt werden. Trotzdem lässt sich erahnen, welche Vielzahl von Interaktions-Möglichkeiten es für zelluläre Faktoren gibt. Im Hinblick auf die virale Genexpression *in vivo* besonders interessante Ansätze, werden im weiteren Verlauf des Kapitels näher betrachtet.

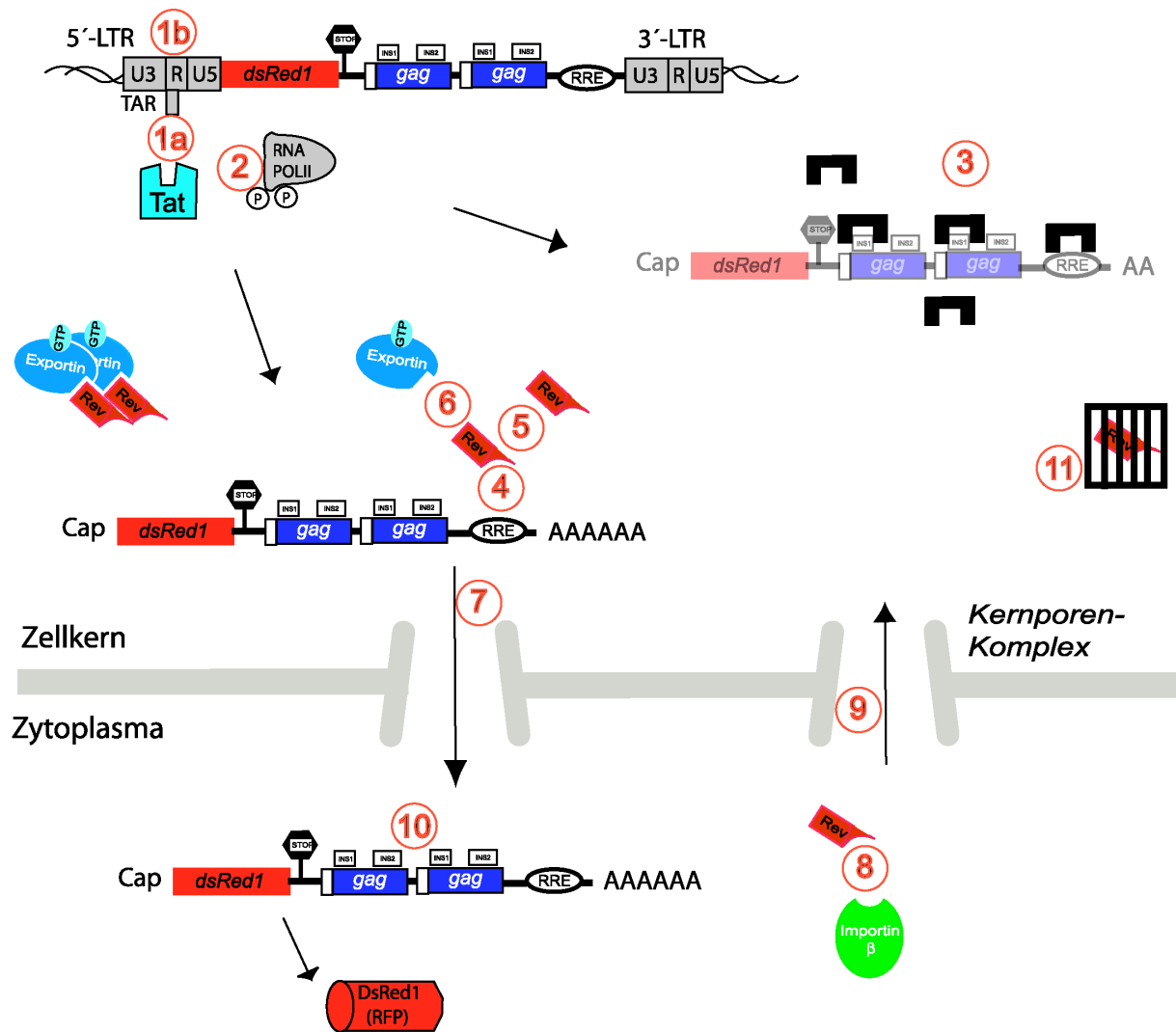


Abbildung 4.2: Mögliche inhibitorische Ansatzpunkte zur Unterdrückung der Reporter-Expression. 1a) Verhinderung von Tat/TAR-Interaktion durch Bindung an Tat oder TAR. 1b) Unterdrückung der Basisaktivität der LTR. 2) Unterdrückung der Tat-vermittelten Aktivierung/Phosphorylierung der RNA Polymerase II. 3) Einschleusung der RNA in Abbauewege durch Blockade der RRE oder verstärkte Bindung von Degradationsfaktoren an INS-Regionen, bzw. Sequestrierung der RNA in Kernkompartimente, wo sie nicht mit Rev interagieren kann. 4) Inhibition von Rev/RRE –Interaktion. 5) Inhibition der Rev-Selbstmultimerisierung. 6) Inhibition der Rev/Crml-Bindung. 7) Unterdrückung des Exports des Komplexes durch Interferenz mit notwendigen Kofaktoren oder dem Kernporen-Komplex. 8) Verhinderung des Kernimports von Rev durch Inhibition der Rev/Importin-Bindung oder wiederum durch 9) Blockade des Imports durch Interferenz mit wichtigen Kofaktoren oder dem Kernporen-Komplex. 10) Schneller Abbau der mRNA im Zytoplasma durch Bindung von Faktoren (eine Inhibition der Translation ist durch die Kodon-Humanisierung des Reportergens praktisch ausgeschlossen). 11) Sequestrierung von Rev in zelluläre Kompartimente, in denen es seine Ziel-RNA nicht finden/binden kann.

Im Folgenden sind nun einige exemplarische Ergebnisse aus der Literatur der letzten Jahre, welche die Identifikation von Inhibitoren von Tat und Rev betreffen, näher vorgestellt.

Zuerst sollen interessante Mechanismen der Inhibition im Stoffwechselweg von Tat betrachtet werden.

Für die Regulation der Tat-induzierten Transkription wird *in vivo* die zelluläre Protein Phosphatase 1 (PP1) benötigt, da sie den Phosphorylierungsstatus der RNA Polymerase II regulieren muss. Wird der nukleäre Inhibitor der PP1 (NIPP1) überexprimiert, kann in Transfektionsexperimenten die Tat-vermittelte Transkription blockiert werden (Ammosova, Jerebtsova et al. 2003).

Chakraborti und Banerjea konnten zeigen, dass eine neue Klasse von DNA Enzymen (Dz's) dazu in der Lage ist, die HIV-1 TAR spezifisch zu schneiden. So konnte in Transfektionsexperimenten mit HeLa Zellen eine Reduktion der p24 Gag Expression auf 20% gezeigt werden und es wurde damit eine deutliche Reduktion der Virusreplikation auch in chronisch infizierten T-Zellen erreicht (Chakraborti and Banerjea 2003).

He und Mitarbeiter zeigten, dass die Überexpression der zellulären Proteine YY1 und LSF die Transkriptionsaktivierung durch Tat zu inhibieren vermögen, da sie die Histon Deacetylase 1 zur LTR rekrutieren (He and Margolis 2002).

Eine andere Möglichkeit der Tat-Inhibition stellt die Umlokalisierung von Tat in Zell(kern)-Kompartimente dar, in denen Tat seine Funktion nicht erfüllen kann. Dieser Mechanismus wurde für das Protein CTIP2 (Rohr, Lecestre et al. 2003) beschrieben, das ebenfalls nach Koexpression die Virusreplikation um den Faktor 5 unterdrückte.

Die genannten Studien nutzten als Nachweis der Tat-Aktivität den CAT-Assay, sowie als Test für die Virusreplikation Transfektionen des Plasmids pNL4-3, auf dem sich ein HIV-Genom in voller Länge befindet und eine anschließende p24 Gag Bestimmung.

Es muss auch erwähnt werden, dass eine Inhibition der Tat-unabhängigen Basis-Aktivität der HIV LTR ein möglicher Ansatzpunkt für eine antivirale Therapie wäre. Wird nach erfolgter Integration des Provirus in das Wirts-Genom gar keine virale mRNA transkribiert, so werden auch die frühen Proteine Rev und Tat nicht produziert und es entwickelt sich ein vollständiger Latenzzustand.

Der Rev-Transaktivationszyklus weist ebenfalls interessante Ansatzpunkte für potentielle Inhibitoren auf:

Einen wirksamen Mechanismus der Interferenz stellt die Reduktion der Expression von Rev dar, wie sie beispielsweise durch die intrazelluläre Expression von siRNAs (small interfering RNAs) erreicht wurde, die gegen Rev- (oder Tat) Transkripte gerichtet wurden. Bei einer gleichzeitigen Expression von siRNAs gegen Tat und Rev konnte eine Verringerung der p24 Gag Expression um 4 Log Stufen erreicht werden (Lee, Dohjima et al. 2002).

Ein wichtiger Interaktionspartner für Rev ist Importin α , ohne das kein ausreichender Transport von Rev in den Zellkern erfolgen würde. Inhibition dieser Interaktion führt damit zur Inaktivität von Rev. Fineberg und Mitarbeiter zeigten, dass sowohl t-RNAs, RRE RNA (stemloop IIB) als auch an BSA-gekoppelte Rev-ARM Peptide (Argininreiches-Motiv) den Import von Rev in den Kern von permeabilisierten Zellen verhindert. Es wurde in *in vitro* Experimenten festgestellt, dass durch diese Agenzien die Interaktion von Rev mit Importin α inhibiert wird (Fineberg, Fineberg et al. 2003).

Befindet sich Rev einmal im Kern, verhindert es durch Bindung an RRE-RNA Spleißereignisse und Abbau der RNA (Fankhauser, Izaurralde et al. 1991). Rev multimerisiert an der RRE und verdrängt dabei andere gebundene Faktoren, wie z.B. B23 (Jain and Belasco 2001). All diese Ereignisse, d.h. sowohl Rev-RRE Bindung, Rev-Selbstmultimerisierung und Interaktionen mit anderen Faktoren stellen Ziele für Rev-inhibitorische Prozesse dar. Es wurde beispielsweise eine ganze Reihe neuer RRE-bindender, Kanamycin-verwandter Moleküle durch Screening identifiziert, die in der Lage waren die Rev-RRE Interaktion zu verhindern (Peled-Zehavi, Horiya et al. 2003).

Die Bindung von Rev an das ASF/SF2-spleißfaktorassoziierte Protein p32 stellt eine Verbindung von Rev zum zellulären Spleißapparat her (Tange, Jensen et al. 1996). Der Spleißfaktor ASF/SF2 kann selbst an die RRE-RNA binden und Spleißen der HIV-RNA induzieren. Eine Überexpression von ASF/SF2 (Powell, Amaral et al. 1997) bzw. Beeinflussung dieser Wechselwirkung sollte die Rev-Funktion inhibieren können.

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt ist die Interaktion von Rev mit dem eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF5A), welcher mit Rev (Ruhl, Himmelpach et al. 1993), als auch mit Crml (Rosorius, Reichart et al. 1999), interagiert. Die Interaktion von eIF5A mit Rev wird als notwendig für die Bindung von Rev an Crml angesehen (Hofmann,

Reichart et al. 2001). Die Verhinderung einer dieser Interaktionen würde den Rev-vermittelten RNA-Export großteils unterdrücken.

Ausserdem übt Rev durch die Bindung an das poly(A)-Bindungsproteins 1 (PAB 1) einen positiven Einfluss auf dessen Bindung an die poly(A)-Enden der HIV-mRNA aus, was die RNA-Stabilität und damit die Zahl der möglichen Translationsereignisse erhöht (Campbell, Borg et al. 1994).

Probleme zellulärer Inhibitoren

Viele Studien, die zelluläre Inhibitoren von Rev und Tat untersuchen, enthalten keine detaillierten Untersuchungen der Toxizität des überexprimierten Proteins. In einzelnen Fällen ist die Hemmung durch Überexpression zwar verhältnismäßig spezifisch, aber die Überexpression solcher Proteine in der Zelle bringt trotzdem immer auch Probleme verschiedener Art mit sich. Therapeutisch ist es schwierig, ohne den Einsatz von gentherapeutischen Methoden, diese Proteine in die richtigen Zielzellen und dort zu ihrem Wirkungsort zu bringen. Auch Proteintransduktionsreagenzien, wie beispielsweise Chariot (Active Motif) oder andere (Choi, Rolle et al. 2003), können nur sehr begrenzte Mengen an Protein an den Zielort schaffen. Zusätzlich zu diesen Problemen, bergen große Mengen therapeutisch eingesetzten Proteins durch Abbaureaktionen im Organismus das Risiko allergischer Reaktionen und anderer metabolisch bedingter Nebenwirkungen. Es ist daher wenig wahrscheinlich, dass solche inhibitorischen Faktoren direkt als Therapeutika eingesetzt werden. Wahrscheinlicher ist, dass die durch sie erlangten Erkenntnisse in der Umsetzung anderer therapeutischer Konzepte genutzt werden. Durch die Aufklärung neuer inhibitorisch relevanter Angriffspunkte können Substanzen durch „Drug design“ an diese Ziele angepasst werden (Takahashi, Kumagai et al. 1999; Jing and Xu 2001; Chen, Neamati et al. 2002; Subba Rao, Bhatnagar et al. 2002; Smith, Cantin et al. 2003).

4.3.2 Identifizierte inhibitorische Faktoren der HIV-1 Gen-Expression

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere zelluläre Inhibitoren der Expression des HIV-basierten Reporter-Assays isoliert werden. Die Betonung liegt hierbei auf „HIV-basiert“, da sich der verwendete Assay zwar viraler Elemente bedient, jedoch nicht mit dem Virus gleichzusetzen ist. Alle erhaltenen Ergebnisse sollten deshalb unter diesem Gesichtspunkt betrachtet werden.

Nachfolgend werden die identifizierten Faktoren kurz in ihren Eigenschaften diskutiert und ihr Potential für weitere Untersuchungen und Anwendungen abgewägt.

Von den im Ergebnisteil beschriebenen Faktoren wären für eine weitere Untersuchung wohl am ehesten die Faktoren I-alpha b4 (PNPase-Fragment), III-beta 36 (PPP2CB) und II-beta 47 (Topoisomerase I-Fragment) geeignet. Über diese cDNAs kann mit einiger Sicherheit gesagt werden, dass sie für Proteine kodieren, auch wenn es im Falle von I-alpha b4 und II-beta 47 nur Fragmente von größeren Proteinen sind. Zwar sind zu diesen Proteinen schon Veröffentlichungen vorhanden, jedoch nicht im Zusammenhang mit einer Inhibition der HIV-Genexpression.

Für **I-alpha b4** könnten Experimente mit erweiterten Konstrukten oder eventuell dem Gesamtprotein (PNPase) sinnvoll sein, um der theoretischen Möglichkeit eines spezifischen Abbaus von HIV-RNAs durch dieses Protein nachzugehen. Die bereits bekannte Domänenstruktur des Proteins und die ihm zugeschriebenen Eigenschaften böten gute Ausgangsmöglichkeiten für eine Optimierung des inhibitorischen Effektes.

Die Expression von **III-beta 36**, oder anderer katalytischer Unter-Einheiten von Phosphatasen generell, könnte interessante Erkenntnisse zu den Einflüssen von Phosphorylierungen während der HIV-Genexpression liefern.

Eine Überexpression von Fragmenten (**II-beta 47**) der Topoisomerase I, die selbst ubiquitär in Nukleoli und Zellkern vorhanden ist, könnte zu einer Verschiebung der enzymatischen Aktivität dieses Proteins führen. Dies wäre therapeutisch wahrscheinlich von sehr geringem Interesse, da die zelluläre Biologie dadurch ebenfalls gestört werden würde, jedoch könnte der Einfluss und die Beteiligung dieses Enzyms auf die HIV-Genexpression untersucht werden.

Unter Umständen könnte es lohnend sein, auch **II-lambda 23** (Fragment von KIAA1128) weiter zu analysieren, da über dieses Protein bisher gar keine

Erkenntnisse vorliegen und deshalb tatsächlich Neuland betreten würde. Die Analyse neuer Proteine, oder Fragmente derer, ist jedoch sehr zeitraubend (Bickel 2003). Ebenso riskant könnte es sein, **II-gamma-52**, **III-alpha-56**, **II-delta-76** und **III-delta-37** weiter zu analysieren. Sie kodieren nicht erwiesenermaßen für bekannte oder neue Proteine. Die Aussage dass schon ihre RNAs inhibitorisch wirksam sind, wäre allerdings auch voreilig, da durchaus mehrere offene Leserahmen auf ihrer Sequenz vorhanden sind und nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass auch Proteine oder Peptide davon translatiert werden. Zur Unterstützung der Theorie dass bei einigen Faktoren bereits die RNA eine inhibitorische Wirkung entfaltet, könnte bei allen isolierten cDNA-Klonen die wahrscheinlich nicht für Proteine kodieren, Homologieuntersuchungen durchgeführt werden. Zwar werden bei diesen Effekten möglicherweise Sekundärstrukturen der RNAs eine Rolle spielen, die nur schwer vorherzusagen sind. Jedoch wäre vielleicht ein Matrix-basierter Ansatz, ähnlich dem wie er für die INS-Elemente beschrieben wurde, erfolgreich bei der Detektion von Gemeinsamkeiten und könnte vielleicht weitere, potentiell inhibitorische, mRNAs vorhersagen. Diese könnten dann wiederum analysiert werden

Für die Proteinfragmente **II-alpha 89** (Fragment von SOX11), **III-delta 55** (Fragment von SCHAD), **I-kappa b2** (Fragment von 14-3-3□) und **III-alpha 65** (Fragment von CDC10 homolog) ist bisher in der Literatur keine Grundlage geliefert, die einen inhibitorischen Effekt stützen würde. Dies bedeutet nicht, dass er nicht vorhanden sein kann, jedoch ist es schwierig ohne weitere Informationen eine Optimierung des inhibitorischen Effekts zu erreichen oder Mechanismen aufzuklären. Dies würde sich höchstens bei stärker wirksamen Faktoren lohnen.

Weitere Vorgehensweise und Abwägung der Ergebnisse

Prinzipiell ist es als positiv zu bewerten, dass mit dem durchgeführten Ansatz Inhibitoren der Reporter-gen-Expression identifiziert werden konnten. Der ein oder andere Faktor, wie z.B. I-alpha b4, bietet dabei sicher ein gutes Potential auf dem aufgebaut werden könnte.

Letztendlich muss aber zu den isolierten zellulären Faktoren gesagt werden, dass sich diese nicht sehr potent in der Unterdrückung der Reporter-Expression zeigen und sehr wahrscheinlich nicht die Grenze des Machbaren darstellen. Sie sollten

daher eher als exemplarisch für weitere Faktoren gesehen werden oder als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen ihrer inhibitorischen Effekte.

Für einen, mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in weiteren Assays oder im Voll-Virus-System wirksamen, Inhibitor wäre eine höhere Effektivität notwendig. Als Mindesteffekt für eine Inhibition kann dabei vielleicht die Effektivität der transdominant negativen Rev-Mutante RevM10bl angesehen werden, von der bekannt ist dass sie auch Auswirkungen auf die Effizienz der Virusreplikation hat (Ragheb, Bressler et al. 1995; Plavec, Agarwal et al. 1997; Hamm, Rekosh et al. 1999). Aus der Literatur ist bekannt, dass sich schwache Effekte in verschiedenen Reporter-Systemen in der Virusreplikation teilweise überhaupt nicht mehr niederschlagen (Chapman, Stanley et al. 2002). Dies soll weiter unten noch diskutiert werden.

Natürlich ist es prinzipiell auch denkbar, dass sich ein zusätzliches, im Reporter-Assay unentdecktes, inhibitorisches Potential eines isolierten Faktors erst in einem „näher am Virus gelegenen“ Assay niederschlagen würde und damit der inhibitorische Effekt dort noch höher ausfiele. Diese Möglichkeit kann aber eher als Wunschdenken eingestuft werden.

Sehr wahrscheinlich aber ist es, wie weiter oben schon angesprochen, dass potente Inhibitoren der Virusreplikation nicht entdeckt wurden, da sie auf Bereiche des viralen Lebenszyklus wirken, die im Reporter-System nicht integriert werden konnten. Dies trifft für eine ganze Reihe von Bereichen des viralen Zyklus zu, wie z.B. Eindringen in die Zelle, Integration ins Genom und Translation der Virusproteine, um nur einige zu nennen.

Die Möglichkeit die inhibitorische Aktivität der identifizierten cDNAs durch synergistische Effekte zu steigern, sollte in weiteren Untersuchungen ebenfalls in Betracht gezogen werden. Möglicherweise liesse sich ein überadditiver Effekt der Inhibition der HIV Genexpression dadurch erreichen, dass eine parallele Transfektion von zwei oder mehr cDNAs vorgenommen wird, die auf verschiedene Weise ihre Wirkung auf die Genexpression entfalten. Dies wurde beispielsweise für transdominant negative Mutanten von Tat und Rev gezeigt. Bei separatem Einsatz dieser Mutanten wurde eine Reduzierung der p24 Gag Produktion um 3-4 fach für die Tat-, bzw 6 fach für die Rev-Mutante beobachtet. Ein gleichzeitiger Einsatz beider Mutanten resultierte in 400 facher Reduzierung der Gag Expression (Ulich, Harrich et al. 1996).

Um solche Synergieeffekte optimal nutzen zu können ist das Wissen um den jeweiligen Mechanismus der Inhibition der Genexpression jedes einzelnen isolierten Faktors von Vorteil. Mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden ist es relativ einfach möglich festzustellen, ob primär die Tat-, die Rev-Funktion oder die Basisaktivität der LTR Ziele einer inhibitorischen Aktivität sind. Eine Kombination dieser drei inhibitorischen Mechanismen verspricht eine starke Inhibition, zumindest auf die Reporter-Expression.

Es ist ausserdem von Bedeutung die Spezifität der Inhibition auf die virale Genexpression zu überprüfen und sicherzustellen dass die zelluläre Genexpression so wenig wie möglich betroffen ist.

Die so identifizierten inhibitorischen Faktoren müssen dann grundsätzlich in Infektionsversuchen auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Einfach zu benutzende Reporterassays können naturgemäß immer nur einen kleinen Teil des viralen Lebenszyklus abdecken und erlauben kaum Aussage über die Auswirkungen auf eine Infektion in einem Organismus.

Ein Beleg für diese Problematik ist das umfassend angelegte Screening nach Rev-inhibierenden Komponenten aus einer Bibliothek an organischen Molekülen. Chapman et al nutzten einen Szintillations-Assay um 500.000 Substanzen auf eine mögliche Rev-RRE interferierende Wirkung zu untersuchen. Sie stellten fest, dass die so entdeckten Kandidaten in einem zellbasierten Assay keinerlei Auswirkungen auf die Virusreplikation zeigten (Chapman, Stanley et al. 2002). Ein weiteres Beispiel stellt die Entdeckung von Sheehy und Mitarbeitern dar, dass das zelluläre Gen CEM15 ein natürliches, spezifisches antivirales Potential besitzt, jedoch im Laufe einer Infektion mit HIV-1 durch das virale Vif Protein in seiner Funktion gestört wird (Sheehy, Gaddis et al. 2002). Viele weitere Versuche wurden unternommen um in Assay-Systemen Substanzen oder Faktoren zu identifizieren die mit der Tat- und Rev-Funktion interferieren (Hamy, Felder et al. 2001), (Peled-Zehavi, Horiya et al. 2003). Die meisten der Entdeckungen konnten ihre antivirale Aktivität in weiteren Tests aber nicht bestätigen.

Zukünftige Untersuchungen sollten einerseits die Weiterentwicklung und Verbesserung eines, für die Suche nach Inhibitoren der viralen Genexpression benutzten, Systems zum Ziel haben, da dies integrale Voraussetzung für gute Ergebnisse ist. Andererseits sollten aber auch, auf mit bisherigen Mitteln gewonnenen, Erkenntnissen aufgebaut werden.

4.4 Nukleo-zytoplasmatische Beweglichkeit von RevM5M10bl

Die durchgeführten FRAP-Experimente sollten zu einer Aufklärung der Lokalisations-Eigenschaften hauptsächlich der Mutante RevM5M10bl beitragen, bzw. zu einem Verständnis, wie die beobachtete "steady state"-Lokalisation der Mutante in HeLa und 85HG66 Zellen zustande kommt. Die vergleichende Ermittlung von intrazellulären Transport-Vorgängen ist mit den anderen Methoden nur schwer oder unzureichend durchführbar (Verkman 2003). Aufwändigere Alternativen zu FRAP wären beispielsweise Zellfusions-Experimente. Durch einen Vergleich der Kinetik von RevM5M10blGFP in Astrozyten und HeLa Zellen wurde geklärt, dass dieses Rev Protein, obwohl es multiple Defekte in seiner Aminosäuresequenz aufweist, trotzdem noch bezüglich seiner Eigenschaften in Astrozyten und Rev-permissiven Zellen abweicht. Des Weiteren wurde grundsätzlich gezeigt, dass diese Mutante mit einem defekten Import- sowie Export-Signal immer noch in der Lage ist zwischen dem Kern und dem Zytoplasma hin- und herzuwandern. Dies geschieht zwar offenbar relativ langsam, jedoch stellt sich nach dem photoinduziertem Bleichvorgang eines Zellkompartiments nach einiger Zeit genau wieder ein für die Zelle typischer Gleichgewichtszustand ein. Sowohl der Gleichgewichtszustand, als auch die Kinetik mit der dieser wieder hergestellt wird, weicht in Astrozyten von dem in HeLa Zellen ab. Dies lässt den Schluss zu, dass die für den Lokalisationsunterschied in Rev verantwortlichen Aminosäuren, nicht bzw. nicht ausschliesslich die Aminosäuren sind, die durch die M5 oder die M10bl Mutationen betroffen sind. Allerdings wäre aufgrund allein dieser Daten die Aussage, dass weder NLS noch NES an dem Astrozyten-spezifischen Unterschied entscheidend beteiligt sind, zu spekulativer Natur. Schliesslich stellen M5 und M10bl nur Mutationen in den Domänen dar und keine Deletion eines ganzen Bereichs. Die Tatsache, dass das Rev-Konstrukt RevM5xIM10bl eine wesentlich langsamere Kinetik der Wiederherstellung des Gleichgewichtszustandes zeigte, schließt die Möglichkeit rein passiver Diffusionsprozesse für RevM5M10bl praktisch aus.

4.5 Eigenschaften verschiedener Rev-Konstrukte

Um weiter aufzuklären wie Astrozyten mit ihrer Biologie auf die Funktion von Rev einzuwirken vermögen, wurden verschiedenen Rev-Konstrukte hergestellt und in dem entwickelten Assay auf ihre Funktionalität in Astrozyten und HeLa Zellen untersucht. Ruft man sich die Domänenstruktur von Rev in Erinnerung, dann fallen zuerst NLS und NES ins Auge, die zweifellos für eine volle Funktionalität notwendig, jedoch nicht ausreichend, sind. Die vorgeschlagene Sekundär- bzw. Tertiärstruktur von Rev (Kjems and Askjaer 2000);(Blanco, Hess et al. 2001) macht eine direkte Notwendigkeit des N-Terminus sehr wahrscheinlich, weil dies die strukturelle Stabilität des Proteins garantiert (Daly, Doten et al. 1995). Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist, dass auch in dem zu HIV Rev homologen CAEV Rev-C der N-Terminus für volle Funktionalität benötigt wird (Abelson and Schoborg 2003). Die Regionen um die NLS, bzw. zwischen NLS und NES dienen u.a. der Homo-Oligomerisierung von Rev. Die Bereiche C-terminal der NES sind möglicherweise für eine effektivere Oligomerisierung ebenfalls nötig. Diese Auflistung macht klar, dass eine Isolierung einzelner funktionaler Bereiche und eine Zuweisung bestimmter singulärer Funktionen für definierte Aminosäuren wahrscheinlich kaum möglich sein wird. Eine Überlappung von funktionellen Domänen oder eine tatsächliche Mehrfachbelegung erschweren Mutagenesestudien und relativieren erhaltene Ergebnisse. Trotzdem wurde im Verlauf dieser Arbeit versucht, zumindest die Unterschiede der Rev-Biologie in Astrozyten und Rev-permissiven Zellen zu erhellen.

RevM5, RevM10bl, RevM5M10bl, Rev Δ ARM, RevP(A)₄

Diese Mutanten weisen, aufgrund der Mutationen in essentiellen Domänen von Rev, im verwendeten Reporter-Assay keinerlei Funktionalität auf. Teilweise wurde die Funktionslosigkeit für diese Mutanten auch schon in der Literatur beschrieben. RevM10bl wurde bereits als funktionslos und darüber hinaus als transdominant negativ wirksam beschrieben. Eine Koexpression von RevM10bl mit wtRev in gleicher Menge bzw. bis zu einem molaren Überschuss von 2:1 von RevM10bl, führte typischerweise zu einer 4-6 fachen Reduktion der Rev-abhängigen p24 Gag Synthese (Ulich, Harrich et al. 1996; Stauber, Afonina et al. 1998). In den Experimenten dieser Arbeit, konnte aber aus bisher ungeklärten Gründen nur eine

etwa 2 fache Reduktion der Reporter-Expression durch den Einsatz von RevM10blGFP erreicht werden. Es müssten weitere Experimente durchgeführt werden um diese Diskrepanz zu erklären. Die Mutante RevM5M10bl kombiniert die bereits beschriebenen Mutationen von RevM5 und RevM10bl. Rev Δ ARM fehlt das Arginin-reiche Motif. In RevP(A)₄ ist die Sequenz der Mutation verglichen mit RevM10bl abgewandelt, aber in beiden Fällen wird die NES durch ausgedehnte Mutationen beeinträchtigt. All diese Mutanten liessen durch Vergleiche mit bereits bekannten Mutationen Vermutungen über deren eingeschränkte Funktionalität zu. Ein anfangs überraschendes Ergebnis hatte die Mutante RevM5M10bl aber doch zu bieten. Sie erwies sich nämlich, im Gegensatz zu RevM10bl, als nicht transdominant negativ wirksam in dem hier verwendeten funktionellen Test. Für die Mutante RevM10bl wurde berichtet, dass sie einen transdominant negativen Phänotyp zeigt, weil sie in der Lage ist wild typ Rev durch Bildung von Hetero-Multimeren am Export zu hindern (Stauber, Gaitanaris et al. 1995). Dies sollte bei RevM5M10bl ebenfalls möglich sein, da die Multimerisierungsregion von der zusätzlichen M5 Mutation nicht betroffen ist. Allerdings ist RevM5M10bl, im Gegensatz zu RevM10bl und wt-Rev, nicht in der Lage in den Nukleoli zu lokalisieren. Die Interaktion von RevM5M10bl mit wild typ Rev ist möglicherweise ausserhalb der Nukleoli nicht ausreichend stark, um einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität von wtRev zu haben. In der Literatur findet sich auch eine Bestätigung dieses Ergebnisses mit einer ähnlichen Mutante (Stauber, Afonina et al. 1998). Allerdings wird für die von RevM10 vermittelte Inhibition der Funktion von wtRev auch ein Mechanismus postuliert, der die Fähigkeit von RevM10 an die RRE zu binden, und damit für wtRev unzugänglich zu machen, als zentral für die inhibitorische Aktivität ansieht (Hamm, Rekosh et al. 1999). Dies könnte ebenfalls die Auswirkung der RevM5 Mutation erklären, die eine Bindung an die RRE verhindert (Truant and Cullen 1999). Die Tatsache dass RevM5M10blGFP nicht transdominant wirksam ist, ist umso tragischer, als die wirksame Mutante M10bl toxisch auf Zellen wirkt während mit der gut verträglichen Mutante M5M10bl ohne weiteres eine stabil transfizierte HeLa Zelllinie generiert werden konnte. Dieser Unterschied in der Toxizität auf HeLa Zelle deutet darauf hin, dass möglicherweise die nukleoläre Lokalisation hierfür von entscheidender Bedeutung ist. Theorien über die Beteiligung des zellulären, und ebenfalls nukleolären, Proteins B23 an der Toxizität von Rev sind bereits geäußert worden (Miyazaki, Takamatsu et al. 1995).

Rev(GFP)3

Dieses von J. Barthelmes und Dr. S. Demart erstellte Fusionskonstrukt besteht aus sRev fusioniert an drei GFP Moleküle, jeweils mit einem kurzen Linker-Peptid verbunden. Durch die besonderen sterischen Eigenschaften dieses Fusionsproteins (Barthelmes 2001), liegt es fast vollständig im Zytoplasma von HeLa Zellen, sowie Astrozyten, vor. Jedoch wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass dieses Fusionsprotein in dem entwickelten Assay die Reporter-Expression in sehr starkem Maße anzuregen vermag, obwohl die Lokalisation dies nicht vermuten läßt. Zwar ist eine genaue Quantifizierung der Induktion im Vergleich zu Rev fusioniert an nur ein GFP-Molekül nicht möglich, jedoch kann von einer nahezu vollständigen Funktionalität ausgegangen werden. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass das Rev(GFP)3 Fusionsprotein durchaus in der Lage ist im Kern und speziell in den Nukleoli zu lokalisieren (Demart 2003), wenn der Exportweg für Rev durch LMB inhibiert wird. Es scheint sich also bei der zytoplasmatischen Lokalisation von Rev um eine starke Gleichgewichtsverschiebung der Lokalisation zu handeln und nicht um einen irreversiblen Effekt.

RevEDR

Diese Rev-Mutante wurde speziell dafür hergestellt, um eine Astrozyten-typische Lokalisation auch in HeLa Zellen zu erreichen und zu untersuchen. In der Literatur wurde die Region, die auch in dieser Mutante verändert wurde, als wichtig für eine Verschiebung der Diffusionskinetik beschrieben. Sie bewirkt eine deutliche Verschiebung der Lokalisation zugunsten des Zytoplasmas. Nur ein geringer Prozentsatz ist im Kern und ein kaum sichtbarer Teil in den Nukleoli zu finden. Diese beobachtete Lokalisation könnte ihre Ursache in einem ähnlichen Mechanismus haben, wie er auch in Astrozyten für die Rev-Lokalisation verantwortlich ist. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass einfach eine Beeinträchtigung der strukturellen Stabilität des Rev-eigenen Helix-Loop-Helix Motivs (Kjems and Askjaer 2000);(Blanco, Hess et al. 2001) zu einer geringeren Affinität der NLS gegenüber Import-Faktoren führt (Daly, Doten et al. 1995). Entscheidend ist die deutliche Funktionalität, die die Mutante im Reporter-Assay aufweist. Zwar ist eine Verringerung der RFP-Expression gegenüber wtRev feststellbar, jedoch ist im

Vergleich zu klar nichtfunktionellen Mutanten wie RevM5 oder RevM10bl die Aktivität von RevEDR eindeutig.

SecSigRev

Das Konstrukt SecSigRev-GFP führt zur Expression eines vollständigen RevGFP Proteins, mit einem zusätzlichen Oligo-Signalpeptid am N-Terminus, das für den Transport des Fusionsprotein ins Endoplasmatische Retikulum (ER) und darüber in den extrazellulären Raum (Medium) sorgen sollte. Die Expression dieses Konstrukt resultierte in einer GFP-Fluoreszenz in den Zellen, die sich zu fast 100% im Zytoplasma befand und verhältnismäßig homogen war. Ein winziger Bruchteil war bei etwas längerer bzw. stärkerer Expression allerdings auch in den Nukleoli festzustellen. Außerdem zeigte sich dieses Konstrukt, wenn auch etwas schwach in der Expression, als funktionell in dem verwendeten Rev-Reporter-Assay. Dies alles traf in gleichem Maß für HeLa Zellen als auch für Astrozyten zu. Leider konnten keine umfassenden Untersuchungen mit diesem Konstrukt durchgeführt werden, da dies den Rahmen der Arbeit gesprengt hätte. Grundsätzlich bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten an. Entweder wird ein Teil des tatsächlich über das ER ins Medium transportierten RevGFPs wieder in die Zellen aufgenommen und übernimmt dort seine normale Funktion (Für die Aufnahme von RevGFP vom Medium in die Zellen gibt es jedoch bisher keine Beweise). Alternativ könnte das Fusionsprotein sich während der Translation wieder vom ER ablösen und als Fusionsprotein mit N-terminalem Signalpeptid im Zytoplasma vorliegen. Dieses Signalpeptid enthält Leucin-reiche Abschnitte und könnte als eine Art NES dienen und für die Verschiebung der Lokalisation verantwortlich sein. Durch das Vorhandensein eines zweiten Signalpeptids dass den Kernexport vermittelt, könnte die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit Exportfaktoren erhöht werden und sich damit das Gleichgewicht der Lokalisation verschieben. Unterstützend für die zweite Theorie steht die Tatsache, dass eine Koexpression von SecSigRev-GFP und RevmRFP1 zu einer fast vollständigen nukleolären Ko-Lokalisation beider Fusionskonstrukte führt.

Rev1-79RexNES

Es wurde beschrieben, dass der zelluläre Block der Rev-Inhibition in murinen Zellen zumindest teilweise durch die C-terminale (ab AS 79) Domäne von Rev vermittelt wird (Marques, Veyrune et al. 2003). Außerdem ist das Muster der zellulären Lokalisation von RevGFP in murinen Zellen ähnlich dem von Astrozyten (Neumann 1993), (eigene Beobachtungen in murinen Makrophagen und Mikroglia). Da ein Zusammenhang dieser Beobachtungen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden Konstrukte analog zu denen von Marques et al. beschriebenen hergestellt. Das Hybrid-Konstrukt Rev1-79-RexNES kodiert für ein Protein das aus einem Rev N-Terminus (bis AS 79) und der HTLV Rex NES besteht, und dem der weitere Rev C-Terminus (AS 80-116) fehlt. Dieses Hybridkonstrukt wurde in Funktionsstudien als auch in Lokalisationsstudien getestet. Sowohl in HeLa Zellen als auch in der Astrozytom Zelllinie 85HG66 zeigte sich eine deutliche Funktionalität des hergestellten Hybrids und dies, obwohl Hakata et al. für den extremen C-Terminus von Rev eine wichtige Rolle bei der Homo-Mulimerisierung und Transaktivierung postulieren (Hakata, Yamada et al. 2002). Die phänotypische Lokalisation des Rev1-79RexNES-GFP Proteins in HeLa Zellen war von einer wtRevGFP Lokalisation nicht zu unterscheiden. In Astrozyten konnte gegenüber wtRev qualitativ eine Steigerung des Signals im Nukleoplasma festgestellt werden, jedoch befand sich immer noch der mit Abstand größte Teil des Signals im Zytoplasma und der Unterschied zu HeLa Zellen war deutlich. Es wurde bereits früher gezeigt, dass Hybrid-Proteine aus HIV Rev und HTLV Rex konstruiert werden können, die viele Charakteristika der wtProteine aufweisen (Daly, Rennert et al. 1993). Der Unterschied in der Lokalisation bei Astrozyten könnte auf eine Abweichung der Aktivitäten der Rev NES und der Rex NES zurückzuführen sein. Bei einer geringfügig schwächeren Export-Aktivität der Rex NES könnte sich durchaus solch ein Lokalisationunterschied ergeben. Unklar ist nach den bisherigen Versuchen noch, inwieweit sich die Rev-Funktion in Astrozyten durch das Hybrid verlässlich steigern lässt. Hier müssen weitere Versuche, besonders mit einem zweiten Unabhängigen Assay wie dem p24 ELISA folgen. Aber selbst wenn dies der Fall wäre, könnte eine eventuelle Funktionssteigerung in Astrozyten auch auf einen rein kompensatorischen Effekt zurückgehen, der einer anders verursachten Kern/Zytoplasma-Gleichgewichtsverschiebung entgegenwirkt.

Möglicher aber nicht zwingender Zusammenhang zwischen intrazellulärer Lokalisation und Funktion von Rev

Die bisher durchgeführten Funktionalitäts-Tests in HeLa-Tat Zellen mit den Rev-Konstrukten RevEDR-GFP, SecSigRev-GFP, Rev(GFP)3 und Rev1-79RexNES-GFP legen keinen so direkten Zusammenhang zwischen Lokalisationsverhalten und Funktion nahe, wie bisher vermutet. Einige der Experimente bedürfen allerdings noch einer weiteren Absicherung. Trotzdem sind Rev-Proteine bekannt, die zytoplasmatisch lokalisieren und keinerlei Funktionalität aufweisen, wie z.B. RevM5 und Rev \square ARM. Dies liegt zumindest zum Teil darin begründet, dass die funktionellen Domänen von Rev mehr als eine Funktion haben können. So ist die in RevM5 und Rev \square ARM mutierte Region gleichzeitig zuständig für den Kernimport und für die Bindung der RRE-RNA (Henderson and Percipalle 1997; Truant and Cullen 1999). Ebenso sind ausgedehnte Deletionsmutanten von Rev mit zytoplasmatischer Lokalisation mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht funktionell, da sie strukturell nicht mehr die Möglichkeit besitzen ihre Ziel-RNA oder zelluläre Kofaktoren zu binden (Brice, Kelley et al. 1999). Die Tatsache dass es für beide Fälle, die Korrelation von Lokalisation im Zytoplasma und Funktionslosigkeit einerseits und eine nicht vorhandene Korrelation andererseits, Beispiele gibt, legt einen möglichen, aber nicht zwingenden Zusammenhang zwischen vorwiegend zytoplasmatischem Phänotyp und Funktionslosigkeit nahe.

4.6 Die Astrozyten-vermittelte Inhibition der Rev-Funktion

Entgegen anderer Meinungen zur Rev-Funktion in Astrozyten (Gorry, Howard et al. 1999);(Canki, Thai et al. 2001), kann es als erwiesen gelten, dass in humanen Astrozyten die Rev-Funktion nicht zu 100% unterstützt wird. Das zeigten sowohl, bereits erwähnte, Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe als auch Ergebnisse dieser Arbeit. Obwohl die in dieser Arbeit beobachteten Effekte geringer ausfielen als in Vorarbeiten mit anderen Assays (Ludwig, Ceccherini-Silberstein et al. 1999);(van Empel 2000), war nach der Anpassung der experimentellen Bedingungen stets ein Effekt zu beobachten. Die hier beobachtete maximale Unterdrückung der Rev-Aktivität betrug für 85HG66 Zellen etwa 1/5 der Aktivität von HeLa Zellen. Dieser,

relativ gesehen schwache Effekt, könnte entweder auswertungsbedingt sein, eine Detektions-Schwäche des Assays darstellen oder aber tatsächlich funktionelle Hintergründe haben. Da in dem verwendeten System keinerlei Translation von HIV-Sequenzen stattfindet (wie dies bei einer p24 Gag Bestimmung der Fall wäre), machen sich Einflüsse auf die Translation von HIV-Sequenzen nicht bemerkbar. Dieser Nachteil des verwendeten Assays könnte durch eine Modifikation des Rev-Reporter-Konstruktes behoben werden. Die Entfernung des translationalen Stopp-Kodons nach dem ORF für RFP, könnte zu einer Expression eines RFP-Gag Fusionsproteins führen, das die Translation von HIV-Sequenzen in den Assay involviert. Der Einsatz dieses modifizierten Reporter-Konstruktes könnte die Bedeutung von Translationsereignissen für die Astrozyten-vermittelte Rev-Inhibition klären. Ob solch ein Konstrukt aber zu einem stabilen und rot fluoreszierenden Fusionsprotein führt, muss erst noch überprüft werden.

Selbst mit den bisher durchgeführten Experimenten lässt sich aber feststellen, dass sich in den Funktions-Experimenten in Astrozyten keine starke RFP-Expression nach RevGFP Zugabe zeigte. Wesentlich unklarer ist allerdings, wie sich dieser Einfluss der Astrozyten auf das HIV-1 Rev Protein vollzieht. Es ist darüber hinaus möglich, dass die Verminderung der Rev-Funktion in Astrozyten nicht der einzige Grund für die geringe Virusproduktion in diesem Zelltyp ist, sondern nur ein wichtiger Teilaspekt. Beispiele hierfür sind die eingeschränkte Infizierbarkeit dieses Zelltyps (Bencheikh, Bentsman et al. 1999) und Hinweise, dass selbst eine Wiederherstellung der Rev-Funktion *in vivo* nicht gleichzeitig zu einer uneingeschränkten Virusreplikation führt (Li, Liu et al. 2002). Ergebnisse aus Infektions-Experimenten von Astrozyten bzw. einzelnen Astrozytom Zelllinien können ausserdem nicht direkt auf alle anderen Astrozytom Zelllinien übertragen werden, da Astrozyten einen sehr inhomogenen Zelltyp darstellen. Dies wurde unter anderem auch in dieser Arbeit festgestellt und erschwert die experimentelle Arbeit mit diesem Zelltyp und die Aufklärung inhibitorischer Mechanismen.

Ein wesentliches Charakteristikum für differenzierte Astrozyten ist die Expression des GFA Proteins („glial fibrillary acidic“) (Besnard, Brenner et al. 1991), jedoch sind Astrozyten keineswegs immer GFAP-positiv. Astrozyten besitzen eine Vielzahl von Aufgaben und Fähigkeiten (Brack-Werner 1999) im Zentralen Nervensystem und interagieren vielfältig mit ihrer Umgebung. Die Fähigkeit von Astrozyten durch äußere

Einflüsse aktiviert zu werden und neue zelluläre Eigenschaften zu zeigen, ist nur eine Auswirkung dieser Vielfältigkeit.

Ausdruck dieser Inhomogenität einer Zellpopulation ist u.a. die große Bandbreite an morphologischen Formen, die Zellen einer Astrozyten-Kultur annehmen können, sowie beispielsweise die immer wieder beobachtete große Streuung der intrazellulären Lokalisationsverteilungen exprimierter Proteine, wie RevGFP.

Ebenso musste im Rahmen vergangener Arbeiten (van Empel 2000), sowie dieser Arbeit, festgestellt werden, dass beispielsweise die Zelllinie U-251MG im Verlauf mehrerer Passagen ihre Eigenschaften deutlich veränderte. Die extremen Schwankungen in der Transfektionseffizienz, die ein und dieselbe Kultur unter identischen Bedingungen aber unterschiedlichen Passagenzahlen zeigte, ist ein Indiz hierfür. Ebenso kann die beobachtete anfängliche Inhomogenität der Lokalisation von RevM5M10bEGFP in der Zelllinie 85HG66 nach Plasmid-Transfektion als ein Hinweis auf eine nicht sehr einheitliche Zellpopulation gesehen werden. Trotz dieser Hindernisse stellt dieser Zelltyp ein ungewöhnlich interessantes Forschungsobjekt dar. Astrozyten repräsentieren den ersten humanen Zelltyp, der die Funktion des HIV Rev Proteins negativ moduliert. Diese Modulation findet in primären Astrozyten, sowie in Zelllinien statt (Neumann, Afonina et al. 2001) und ist bedingt durch die spezielle Biologie dieses Zelltyps. Ließe sich die Ursache dieser veränderten Biologie identifizieren, isolieren und auf andere Zelltypen übertragen, würde dies einen grossen Vorteil dieses Ansatzes gegenüber anderen zellulären Inhibitoren der Rev-Funktion bedeuten. Inhibitoren, die aus Rev-permissiven Zellen isoliert wurden und die ihr inhibitorisches Potenzial aus ihrer unnatürlichen Überexpression erhalten, stellen einen großen Eingriff in den zellulären Stoffwechsel der Zelle dar. Es ist zwar möglich, dass ein Faktor aus Astrozyten, der beispielsweise in T-Zellen normalerweise nicht exprimiert wird, durch die dortige Expression sich auch negativ auf die Zelle auswirken kann. Zur Erreichung eines inhibitorischen Effektes kann aber sehr wahrscheinlich das Niveau der Überexpression relativ niedrig gehalten werden, da für eine Inhibition die physiologischen Konzentrationen in primären Astrozyten ebenfalls schon ausreichend sind.

Modelle der Astrozyten-vermittelten Rev-Inhibition

Wie bereits beschrieben, tritt in Astrozyten eine veränderte Lokalisation und eine verminderte Funktion von Rev gemeinsam auf. Ein oder mehrere Faktoren im Zytoplasma von Astrozyten werden dafür verantwortlich gemacht, dass Rev im Zytoplasma lokalisiert. Dadurch könnte Rev möglicherweise nicht in ausreichendem Maße in den Zellkern gelangen, um dort seine Ziel-RNA zu binden. Abbildung 4.3 zeigt dies vereinfacht in einem Schema.

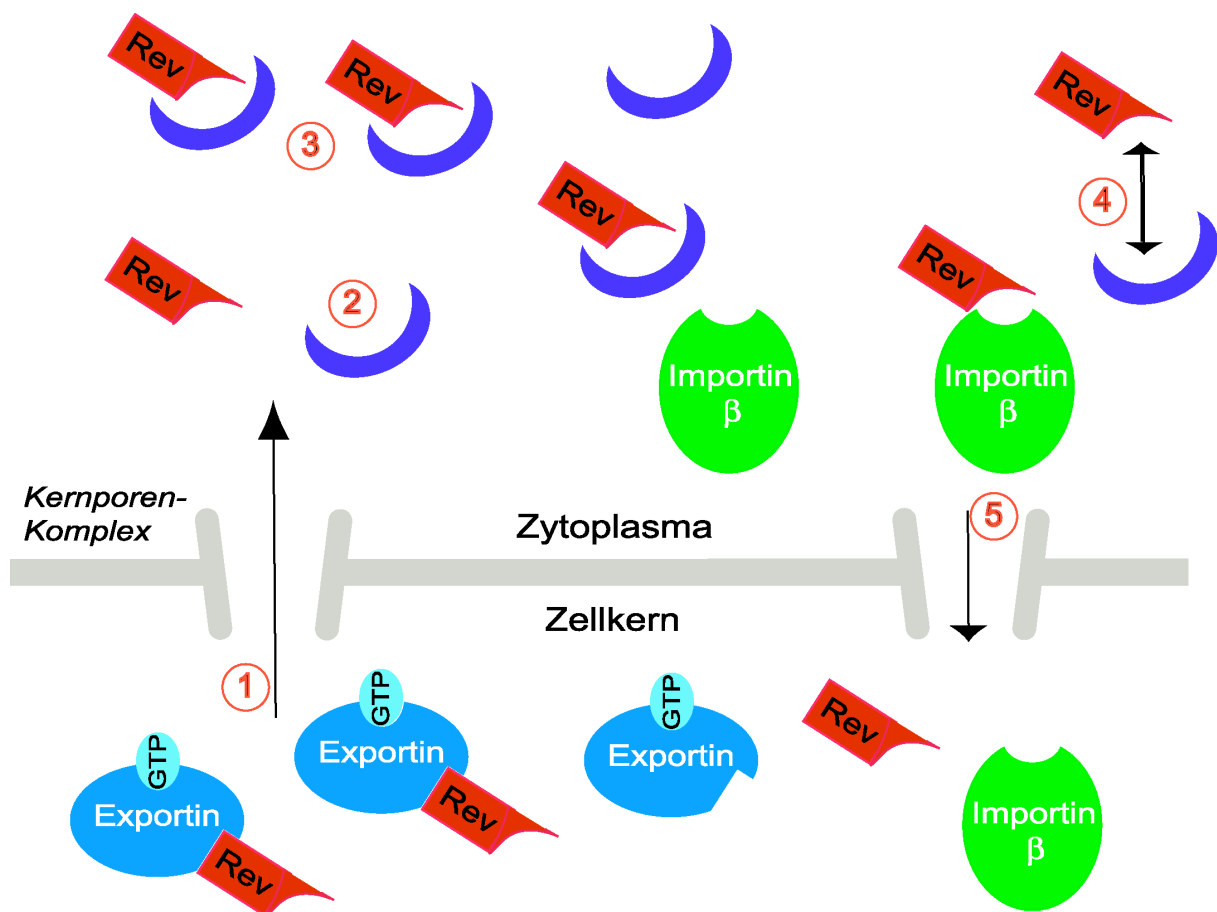


Abbildung 4.3: Astrozyten-Modell zur beeinflussten Rev-Lokalisation – Dominanter zytoplasmatischer Faktor. 1) Rev wird Crml-vermittelt ins Zytoplasma exportiert, dies geschieht effizient. 2) Im Zytoplasma befinden sich Faktoren, die in der Lage sind Rev zu binden, zu modifizieren oder dessen Konformation zu ändern und mit 3) Rev in mehr oder weniger direkten Kontakt treten. 4) Die Interaktion von Rev und dem zellulären Faktor ist jedoch nicht irreversibel, sondern verschiebt lediglich das Gleichgewicht von importfähigem Rev Protein zu für den Import unzugänglichem Rev. 5) Der Import von Rev erfolgt daher netto gesehen weniger effizient.

Der in Abbildung 4.3 vorgestellte Mechanismus stellt eine Theorie dar, wie die Rev-Lokalisation beeinflusst werden könnte, viele weitere Abläufe wären aber denkbar.

Aus diesem Schema lässt sich auch die Idee ableiten, dass die Rev-Inhibition von einem oder mehreren auslösenden zytoplasmatischen Faktoren ausgeht.

Daten aus der vorliegenden Arbeit lassen aber zumindest auch andere Schlussfolgerungen zu. Die deutlich veränderte „steady state“ Lokalisation der beschriebenen Proteine RevEDR-GFP, SecSigRev-GFP, Rev-(GFP)₃, kann als vergleichbar zur typischen Astrozyten-Lokalisation gesehen werden oder weist sogar noch stärkere zytoplasmatische Züge auf. Trotzdem wurde davon deren transaktivierende Funktion nicht oder kaum abgeschwächt. Zwar lassen sich die zugrunde liegenden kinetischen Eigenschaften eines Proteins, die zu der in einem bestimmten Moment sichtbaren Lokalisation führen, nicht ohne zusätzliche Experimente bestimmen. Aber eine derart drastische Gleichgewichtsverschiebung muss auch mit einer Verschiebung der kinetischen Charakteristik einhergehen. Es ist unklar, welche Menge an Rev Protein in den Zellen für eine effiziente Transaktivierungsfunktion *in vivo* vorhanden sein muss. Transfektionsversuche können diese Frage nur unzureichend klären, da in diesem Fall mehrere Faktoren, unabhängig von der eigentlichen Proteinmenge, das Experiment beeinflussen (Schwellenwert für die Transfektionseffizienz, Halbwertszeit des Proteins). In der Literatur wird nicht mehr ausschliesslich eine früher postulierte Schwellenwertkonzentration (Cullen 1991; Pomerantz, Seshamma et al. 1992) von Rev angenommen (Plavec, Agarwal et al. 1997). Eventuell sind relativ geringe Mengen von transportaktivem Rev ausreichend um unter den experimentellen Bedingungen eine vollständige Transaktivierung zu erhalten. Die für Astrozyten beschriebene Inhibition scheint durch Erhöhung der Konzentration von Rev nicht aufzuheben zu sein (Neumann, Felber et al. 1995; van Empel 2000). Daraus lassen sich drei mögliche Erklärungen für die Inhibition von Rev in Astrozyten ableiten: I) Ein zellulärer inhibitorischer Faktor zeigt sich durch die Anwesenheit von Rev selbst induzierbar, d.h. Rev würde in gewissen Grenzen die Expression seines eigenen Inhibitors steigern. II) Ein (oder mehrere) vorhandene Faktoren modifizieren das Rev Protein posttranslational in einer Weise, dass seine Funktionsfähigkeit eingeschränkt wird. Dies geschieht derart effizient, dass die Inhibitoren dabei nie zum limitierenden Faktor werden. III) Die inhibitorische Charakteristik resultiert auch aus der Abwesenheit essentieller zellulärer Faktoren und ist von der Ursache her unabhängig von der Lokalisation. Möglichkeit I und II schliessen das Modell aus Abb. 4.3 nicht

aus, Möglichkeit III steht teilweise im Gegensatz dazu, könnte aber auch zusätzlich zu Möglichkeit I oder II wirken.

Die Abwesenheit zellulärer Faktoren, die für eine volle Rev-Funktion nötig sind, könnte durchaus die Tatsache erklären, dass in Astrozyten ein Mangel an Rev-abhängigen RNAs im Zytoplasma beobachtet wird. Ein denkbarer Kandidat für diesen essentiellen Faktor könnte beispielsweise Sam68 (src-assoziiert in Mitose, 68 kDa) sein, für den gezeigt wurde, dass er in der Astrozytom-Zelllinie U87MG in geringerem Maß als in Rev-permissiven Zellen exprimiert wird (Li, Liu et al. 2002). Jedoch kann die Tatsache, dass sich zytoplasmatische Lokalisation, sowie eingeschränkte Rev-Funktion durch induzierte Zellfusionen von Astrozyten auf Rev-permissive Zellen übertragen läßt damit nicht erklärt werden. Eine Fusion chronisch infizierter TH4-7-5 Astrozyten mit HeLa Zellen, die ein Rev-defektes Provirus trugen (HXB2 f/b) resultierte in einer kaum messbare Steigerung der p24 Gag Produktion (Neumann 1993). Dies ist nur durch einen weiterhin anwesenden Faktor zu erklären (wenn man Verdünnungseffekte nicht berücksichtigt), da ein fehlender Kofaktor durch die Fusion mit HeLa Zellen nun zur Verfügung stehen sollte. Möglich wäre, dass beide Mechanismen, anwesender Faktor im Zytoplasma und fehlender Rev-Kofaktor, in Astrozyten unabhängig voneinander wirken. Andererseits könnten beide Mechanismen durchaus auch zusammenwirken und sich wechselseitig beeinflussen. Ist erst einmal durch das Fehlen eines Rev-Kofaktors in der Zelle eine Verschiebung im Rev-Funktionszyklus gegeben, könnten weitere zellspezifische Interaktionen begünstigt werden, oder umgekehrt. Ein anderer Zusammenhang von Lokalisation und Funktion könnte darin bestehen dass eine auffällig veränderte Lokalisation von Rev in der Zelle die Folge eines inhibitorischen Einflusses ist, was beispielsweise durch einen Mechanismus wie in Möglichkeit II (s. oben) beschrieben, geschehen könnte. Ob eine der genannten Möglichkeiten der Realität entspricht, und wenn ja, welche, bleibt zum derzeitigen Zeitpunkt Spekulation. Allerdings kann angenommen werden, dass das Bild von einer Astrozyten-vermittelten Rev-Inhibition in der Weise wie es Abbildung 4.3 darstellt, noch unvollständig ist. Die Fülle der möglichen inhibitorischen Mechanismen in Astrozyten und die Tatsache das selbst in Rev-permissiven Zellen noch immer nicht alle Fragen der Biologie von Rev geklärt sind, läßt es als eine grosse Herausforderung erscheinen diese inhibitorischen Mechanismen aufzuklären.

4.7 Ausblick

Mit Hilfe des Reporter-Systems wurden bis zum Abschluss dieser Arbeit erst relativ wenige Klone der cDNA-Bank auf ihre inhibitorische Aktivität hin untersucht (ca. 4×10^3 von $3,1 \times 10^6$). Daher liegt es nahe, einerseits das Screening so wie es ist fortzusetzen und eine größere Zahl an Klonen zu überprüfen. Andererseits wäre es durchaus sinnvoll, eine schnellere Screening-Möglichkeit zu besitzen, um in einem Durchgang mehrere tausend oder hunderttausend Klone auf einmal zu untersuchen. Dies wäre vielleicht mit der Entwicklung eines regulierbaren Systems zur Rev-Expression möglich, da dann möglicherweise im Verlauf des Assays die Zellklone vereinzelt werden könnten um die cDNA zu reisolieren. Andererseits wäre auch die Nutzung einer Zelllinie, die stabil funktionales Rev exprimiert, eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen. Jedoch scheint dies für die meisten Zelllinien nicht ohne weiteres möglich zu sein.

Ein zweiter Schwerpunkt sollte mit Sicherheit die weitere Charakterisierung einiger der bisher identifizierten cDNAs sein und damit verbunden der direkte Vergleich des neu entwickelten Assay-Systems mit bisher in der Arbeitsgruppe benutzten Tests, wie dem p24 ELISA. Verschiedene zur Verfügung stehende Tests könnten aufklären, ob die inhibitorische Aktivität eines Faktors spezifisch Tat oder Rev oder andere Prozesse der Reporter-Expression betrifft.

Gerade die Art der Inhibition bzw. Interaktion eines identifizierten Faktors könnte neue Erkenntnisse über HIV-inhibitorische Möglichkeiten und die Tat- und Rev-Funktion liefern.

Drittens sollten weitere Untersuchungen angestellt werden, um den Ursachen für die gestörte Funktionalität von Rev in Astrozyten nachzugehen.

5 Zusammenfassung

Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass in humanen Astrozyten die HIV-1 Rev-Funktion und intrazelluläre Lokalisation durch dominante zelluläre Faktoren im Zytoplasma gestört ist.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Assay-System auf Basis von Reporter-Konstrukten entwickelt, das eine Detektion der HIV-1 Tat und Rev-Funktion auf Einzelzell-Ebene ermöglichte. Dieses fluoreszenzbasierte System wurde hinsichtlich seiner Eigenschaften untersucht und charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass es sich dazu eignet sowohl die Tat- als auch die Rev-Funktion konzentrationsabhängig darzustellen. Des Weiteren konnten bereits beschriebene Inhibitoren der Rev-Funktion durch den Assay bestätigt werden, was die Zuverlässigkeit des Testsystems belegt. Außerdem ermöglichte dieses System in durchgeführten Versuchen eine Quantifizierung der RNA-destabilisierenden Aktivität von INS-Elementen des HIV-Genoms.

Durch die Herstellung einer stabilen Zelllinie mit einem entwickelten Reporter-Konstrukt und die Etablierung einer Fluoreszenzmikroskopie- und FACS-basierten Auswertung der Daten wurde die Grundlage für eine umfangreiche Suche nach Inhibitoren der HIV-1 Genexpression gelegt.

Im Laufe erster „Screenings“ nach zellulären Inhibitoren der HIV-Genregulation wurden in einer cDNA-Bank aus fötalem Hirn mehrere inhibitorisch wirksame Kandidaten-cDNAs identifiziert. Damit konnte gezeigt werden, dass zelluläre Faktoren potentiell dazu in der Lage sind regulierend bzw. inhibierend in die HIV-1 Genexpression einzugreifen.

Parallel zu diesen Arbeiten wurden Mutagenisierungs- bzw. Modifikationsexperimente mit dem Rev Protein durchgeführt um zelltypspezifische Einflussmöglichkeiten auf dieses Protein weiter einzugrenzen. Dies geschah durch die Anwendung von GFP-Fusionstechnologie in Verbindung mit fluoreszenzmikroskopischen Techniken wie FRAP. Durch die Versuche konnten mehrere Bereiche von Rev als astrozytenspezifische Angriffspunkte ausgeschlossen, sowie Lokalisations/ Funktions-Zusammenhänge von Rev analysiert werden. Dies führte zu einem erweiterten Bild der Astrozyten-vermittelten Inhibition der Rev-Funktion.

Verwendete Abkürzungen

A	Adenosin
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
A.d.	Aqua destillata (entionisiertes Wasser)
ad	Auffüllen auf ein bestimmtes Volumen
AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom („aquired immuno- deficiency syndrome“)
AM	Antimykotikum
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, USA
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum Albumin („Bovine Serum Albumine“)
C	Cytidin
CAT	Chloramphenicol Acetyl Transferase
CIP	alkalische Phosphatase („calf intestine phosphatase“)
cDNA	komplementäre DNA
cfu	Koloniebildende Einheiten („colony forming units“)
CTP	Cytidintriphosphat
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein („cyane fluorescent protein“)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (N steht für eine der vier Basen)
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter („Fluorescence Activated Cell Sorter“)

FKS	Fötale Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (“forward scatter”)
G	Guanosin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“)
GTP	Guanosintriphosphat
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-Galactopyranoside
kb, kbp	Kilobasen, Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Bakterienmedium nach Luria-Bertani
LMB	Leptomycin B
LTR	Long Terminal Repeat
Lsg.	Lösung
MCS	Multiple Klonierungssequenz (“multiple cloning site”)
min	Minute
mRFP1	monomeres Rot-fluoreszierendes Protein 1
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger Ribonucleic acid“)
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
NES	Kernexportsignal (“nuclear export signal”)
NIS	Diffusionsverminderndes Signal (“nuclear diff. inhibitory signal”)
NLS	Kernlokalisierungssignal (“nuclear localization signal”)
NOS	Nukleoläres Lokalisationssignal
ORF	Offener Leserahmen (“open reading frame”)
OD	optische Dichte einer Flüssigkeit
NC	Nitrozellulose
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
pDNA	Plasmid DNA
PCR	Polymerase Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
P./S.	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
Pr	Protein

PR	(HIV)- Protease
RFP	Rot fluoreszierendes Protein („red fluorescent protein“)
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	Rev Response Element
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
SAP	alkalische Phosphatase aus Krabben („shrimp alkaline phosphatase“)
SDS	Natriumlaurylsulfat („Sodium Dodecyl Sulfate“)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“)
SOC	Bakterienvollmedium
SSC	Seitwärtsstreulicht („sideward scatter“)
T	Thymidin
TTP	Thymidintriphosphat
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
Tris	Trishydroxyaminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U	Units (Enzymeinheiten)
UTP	Uridintriphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
vol	Volumenanteil
wt	Wild-Typ
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein („yellow fluorescent protein“)

Gene sind kursiv in Kleinbuchstaben geschrieben (z.B. *rev*), Genprodukte werden mit einem Großbuchstaben begonnen (z.B. Rev). SI-Einheiten wurden nicht gesondert aufgeführt.

Literaturverzeichnis

- Abelson, M. and R. Schoborg (2003). "Characterization of the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) rev N-terminal elements required for efficient interaction with the RRE." *Virus Res* **92**: 23-35.
- Afonina, E., M. Neumann, et al. (1997). "Preferential binding of poly(A)-binding protein 1 to an inhibitory RNA element in the human immunodeficiency virus type 1 gag mRNA." *J Biol Chem* **272**(4): 2307-11.
- Aiken, C., J. Konner, et al. (1994). "Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain." *Cell* **76**: 853-864.
- Aitken, A., D. B. Collinge, et al. (1992). "14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins." *Trends Biochem Sci* **17**(12): 498-501.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, et al. (1996). "CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." *Science* **272**(5270): 1955-8.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-402.
- Ammosova, T., M. Jerebtsova, et al. (2003). "Nuclear protein phosphatase-1 regulates HIV-1 transcription." *J Biol Chem*.
- An, W. and A. Telesnitsky (2001). "Frequency of direct repeat deletion in a human immunodeficiency virus type 1 vector during reverse transcription in human cells." *Virology* **286**(2): 475-82.
- Arimondo, P. B., N. Gelus, et al. (2000). "The chromosomal protein HMG-D binds to the TAR and RBE RNA of HIV-1." *FEBS Lett* **485**(1): 47-52.
- Arrigo, S. and I. S. Y. Chen (1992 a). "Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr and envy vol. pu 2 RNAs." *Genes and Dev* **5**: 808-819.
- Arteaga, H. J., J. Hinkula, et al. (2003). "Choosing CCR5 or Rev siRNA in HIV-1." *Nat Biotechnol* **21**(3): 230-1.
- Azuma, T., S. Ao, et al. (1999). "Human SOX11, an upregulated gene during the neural differentiation, has a long 3' untranslated region." *DNA Res* **6**(5): 357-60.
- Bagasra, O., K. Khalili, et al. (1992). "TAR-independent replication of human immunodeficiency virus type 1 in glial cells." *J Virol* **66**(12): 7522-8.
- Bagasra, O., E. Lavi, et al. (1996). "Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals: identification by the combination of in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry." *Aids* **10**(6): 573-85.
- Barlow, K. L., A. O. Ajao, et al. (2003). "Characterization of a Novel Simian Immunodeficiency Virus (SIVmonNG1) Genome Sequence from a Mona Monkey (*Cercopithecus mona*)." *J Virol* **77**(12): 6879-88.
- Barre-Sinoussi, F., J.-C. Cherman, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**: 868-871.
- Barthelmes, J. (2001). Deletionskartierung des HIV-1 Rev Proteins

- zur Analyse zelltypspezifischer Lokalisationsunterschiede. GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Molekulare Virologie. München, Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan.
- Bencheikh, M., G. Bentsman, et al. (1999). "Replication of different clones of human immunodeficiency virus type 1 in primary fetal human astrocytes: enhancement of viral gene expression by Nef." J Neurovirol **5**(2): 115-24.
- Benkirane, M., R. F. Chun, et al. (1998). "Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat." J Biol Chem **273**(38): 24898-905.
- Berkhout, B., R. H. Silverman, et al. (1989). "Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target." Cell **59**(2): 273-82.
- Bermudez-Cruz, R. M., J. Garcia-Mena, et al. (2002). "Polynucleotide phosphorylase binds to ssRNA with same affinity as to ssDNA." Biochimie **84**(4): 321-8.
- Besnard, F., M. Brenner, et al. (1991). "Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein." J Biol Chem **266**(28): 18877-83.
- Bevis, B. J. and B. S. Glick (2002). "Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed)." Nat Biotechnol **20**(1): 83-7.
- Bickel, C. (2003). Genetische, biochemische und bioinformatische Charakterisierung von KIAA0592/RISP. GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit - Institut für Molekulare Virologie, Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Bigner, D. D., S. H. Bigner, et al. (1981). "Heterogeneity of Genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas." J Neuropathol Exp Neurol **40**(3): 201-29.
- Biti, R., R. Ffrench, et al. (1997). "HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele." Nat Med **3**(3): 252-3.
- Black, A. C., J. Luo, et al. (1995). "Polypyrimidine tract-binding protein and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 bind to human T-cell leukemia virus type 2 RNA regulatory elements." J Virol **69**(11): 6852-8.
- Blanco, F. J., S. Hess, et al. (2001). "Solid-state NMR data support a helix-loop-helix structural model for the N-terminal half of HIV-1 Rev in fibrillar form." J Mol Biol **313**(4): 845-59.
- Bobbitt, K. R., M. M. Addo, et al. (2003). "Rev activity determines sensitivity of HIV-1-infected primary T cells to CTL killing." Immunity **18**(2): 289-99.
- Bogerd, H. P., R. A. Fridell, et al. (1996). "Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay." Mol Cell Biol **16**(8): 4207-14.
- Bourgeois, C. F., Y. K. Kim, et al. (2002). "Spt5 cooperates with human immunodeficiency virus type 1 Tat by preventing premature RNA release at terminator sequences." Mol Cell Biol **22**(4): 1079-93.
- Brack-Werner, R. (1999). "Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis [editorial]." Aids **13**(1): 1-22.
- Brack-Werner, R., A. Kleinschmidt, et al. (1992). "Infection of human brain cells by HIV-1: restricted virus production in chronically infected human glial cell lines." Aids **6**(3): 273-85.
- Brice, P. C., A. C. Kelley, et al. (1999). "Sensitive in vitro analysis of HIV-1 Rev multimerization." Nucleic Acids Res **27**(10): 2080-5.

- Bruce-Keller, A. J., S. W. Barger, et al. (2001). "Pro-inflammatory and pro-oxidant properties of the HIV protein Tat in a microglial cell line: attenuation by 17 beta-estradiol." *J Neurochem* **78**(6): 1315-24.
- Campbell, L. H., K. T. Borg, et al. (1994). "Human immunodeficiency virus type 1 Rev is required in vivo for binding of poly(A)-binding protein to Rev-dependent RNAs." *J Virol* **68**(9): 5433-8.
- Canki, M., J. N. Thai, et al. (2001). "Highly productive infection with pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) indicates no intracellular restrictions to HIV-1 replication in primary human astrocytes." *J Virol* **75**(17): 7925-33.
- Cardellina, J. n., M. Munro, et al. (1993). "A chemical screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural products extracts." *J Nat Prod* **56**(7): 1123-9.
- Carotenuto, P., D. Looij, et al. (1998). "Neutralizing antibodies are positively associated with CD4+ T-cell counts and T-cell function in long-term AIDS-free infection." *Aids* **12**(13): 1591-600.
- CDC (1982 a). "Update on acquired immune deficiency syndrom (AIDS)- United States." *MMWR* **31**: 504-514.
- CDC (1982 c). "Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *MMWR* **31**: 652-654.
- Cecilia, D., C. Kleeberger, et al. (1999). "A longitudinal study of neutralizing antibodies and disease progression in HIV-1-infected subjects." *J Infect Dis* **179**(6): 1365-74.
- Chakraborti, S. and A. C. Banerjea (2003). "Inhibition of HIV-1 gene expression by novel DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAR RNA: potential effectiveness against all HIV-1 isolates." *Mol Ther* **7**(6): 817-26.
- Chapman, R., T. Stanley, et al. (2002). "Small molecule modulators of HIV Rev/Rev response element interaction identified by random screening." *Antiviral Res* **54**: 149-162.
- Chapman, R. L., T. B. Stanley, et al. (2002). "Small molecule modulators of HIV Rev/Rev response element interaction identified by random screening." *Antiviral Res* **54**(3): 149-62.
- Chen, I. J., N. Neamati, et al. (2002). "Structure-based inhibitor design targeting HIV-1 integrase." *Curr Drug Targets Infect Disord* **2**(3): 217-34.
- Chiodi, F., S. Fuerstenberg, et al. (1987). "Infection of brain-derived cells with the human immunodeficiency virus." *J Virol* **61**(4): 1244-7.
- Choi, M., S. Rolle, et al. (2003). "Inhibition of NF- κ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis." *Blood*.
- Christensen, M. O., H. U. Barthelmes, et al. (2002). "The N-terminal domain anchors human topoisomerase I at fibrillar centers of nucleoli and nucleolar organizer regions of mitotic chromosomes." *J Biol Chem* **277**(39): 35932-8.
- Chun, T. W., R. T. Davey, Jr., et al. (2000). "Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy." *Nat Med* **6**(7): 757-61.
- Clavel, F., D. Guetard, et al. (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." *Science* **233**(4761): 343-6.
- Cmarko, D., S. O. Boe, et al. (2002). "Rev inhibition strongly affects intracellular distribution of human immunodeficiency virus type 1 RNAs." *J Virol* **76**(20): 10473-84.

- Cochrane, A. W., K. S. Jones, et al. (1991). "Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression." J Virol **65**(10): 5305-13.
- Collins, K. L., B. K. Chen, et al. (1998). "HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes." Nature **391**: 397-401.
- Cordelier, P., E. Van Bockstaele, et al. (2003). "Inhibiting AIDS in the central nervous system: gene delivery to protect neurons from HIV." Mol Ther **7**(6): 801-10.
- Cordelier, P., M. Zern, et al. (2003). "HIV-1 proprotein processing as a target for gene therapy." Gene Therapy **10**: 467-477.
- Cowan, M. (1999). "Plant Products as Antimicrobial Agents." Clinical Microbiology Reviews **12**(4): 564-582.
- Cragg, G., M. Boyd, et al. (1994). "Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute." Ciba Found Symp **185**: 178-90.
- Critchfield, J. W., S. T. Butera, et al. (1996). "Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds." AIDS Res Hum Retroviruses **12**(1): 39-46.
- Cullen, B. R. (1991). "Regulation of gene expression in the human immunodeficiency virus type 1." Adv Virus Res **40**: 1-17.
- D'Agostino, D., B. K. Felber, et al. (1992). "The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs." Molecular and Cellular Biol **12**(3): 1375-1386.
- Daelemans, D., E. Afonina, et al. (2002). "A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14440-5.
- Daelemans, D., E. De Clercq, et al. (2001). "A quantitative GFP-based bioassay for the detection of HIV-1 Tat transactivation inhibitors." J Virol Methods **96**(2): 183-8.
- Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-7.
- Daly, T. J., R. C. Doten, et al. (1995). "The amino terminal domain of HIV-1 Rev is required for discrimination of the RRE from nonspecific RNA." J Mol Biol **253**(2): 243-58.
- Daly, T. J., P. Rennert, et al. (1993). "Perturbation of the carboxy terminus of HIV-1 Rev affects multimerization on the Rev responsive element." Biochemistry **32**(34): 8945-54.
- Darlix, J. L., A. Vincent, et al. (1993). "Trans-activation of the 5' to 3' viral DNA strand transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of HIV1 RNA." C R Acad Sci III **316**(8): 763-71.
- De La Tribonniere, X., Y. Mouton, et al. (2003). "A phase I study of a six-week cycle of immunotherapy with Murabutide in HIV-1 patients naive to antiretrovirals." Med Sci Monit **9**(6): PI43-50.
- de Soultrait, V. R., A. Caumont, et al. (2002). "A novel short peptide is a specific inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 integrase." J Mol Biol **318**(1): 45-58.
- Demart, S., Ceccherine-Silberstein, F., Schlicht, S., Walcher, S., Wolff, H., Neumann, M., Erfle, V. Brack-Werner, R. (2003). "The human immunodeficiency virus Rev protein has multiple nuclear targeting functions." submitted.
- Demirhan, I., M. Kanyalkar, et al. (2002). "Docking studies reveal a selective binding of D-penicillamine to the transactivator protein of human immunodeficiency virus type 1." FEBS Lett **516**(1-3): 43-6.

- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 [see comments]." Nature **381**(6584): 661-6.
- Dezube, B. J., J. Proper, et al. (2003). "A passive immunotherapy, (PE)HRG214, in patients infected with human immunodeficiency virus: a phase I study." J Infect Dis **187**(3): 500-3.
- Dingwall, C., I. Ernberg, et al. (1989). "Human immunodeficiency virus 1 Tat protein binds trans-activation- responsive region (TAR) RNA in vitro." Proc Natl Acad Sci **86**(18): 6925-9.
- Dittmann, S. and S. Norley (2000). "Wurde die AIDS-Epidemie in Afrika durch kontaminierte Polio-Impfstoffe ausgelöst?" Bundesgesundheitsblatt **43**: 224-228.
- Dobbelstein, M. (2003). "Viruses in therapy- royal road or dead end?" Virus Res **92**: 219-221.
- Dorsky, D. I., M. Wells, et al. (1996). "Detection of HIV-1 infection with a green fluorescent protein reporter system." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **13**(4): 308-13.
- Duzgunes, N., S. Simoes, et al. (2001). "Enhanced inhibition of HIV-1 replication in macrophages by antisense oligonucleotides, ribozymes and acyclic nucleoside phosphonate analogs delivered in pH-sensitive liposomes." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **20**(4-7): 515-23.
- Eis, P. S., M. C. Olson, et al. (2001). "An invasive cleavage assay for direct quantitation of specific RNAs." Nat Biotechnol **19**(7): 673-6.
- Fankhauser, C., E. Izaurralde, et al. (1991). "Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 Rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element." Mol Cell Biol **11**(5): 2567-75.
- Farjot, G., A. Sergeant, et al. (1999). "A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1." J Biol Chem **274**(24): 17309-17.
- Fesen, M. R., K. W. Kohn, et al. (1993). "Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2399-403.
- Fields, B. N. and D. M. Knipe, Eds. (1996). Virology. Retroviridae and their replication. New York, Raven Press.
- Fineberg, K., T. Fineberg, et al. (2003). "Inhibition of nuclear import mediated by the Rev-arginine rich motif by RNA molecules." Biochemistry **42**(9): 2625-33.
- Fornerod, M., M. Ohno, et al. (1997). "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." Cell **90**(6): 1051-60.
- Forth, W., D. Henschler, et al. (2001). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München, Urban & Fischer Verlag.
- Fouts, D. E., H. L. True, et al. (1997). "Site-specific phosphorylation of the human immunodeficiency virus type-1 Rev protein accelerates formation of an efficient RNA-binding conformation." Biochemistry **36**(43): 13256-62.
- Frankel, A. D. and J. A. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." Ann Rev Biochem **67**: 1-25.
- Freed, E. O. (2001). "HIV-1 replication." Somat Cell Mol Genet **26**(1-6): 13-33.
- Gallo, R. (2003). 'AIDS in the 21st century - A challenge for biosciences'. iLab-lecture 2003, München.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, et al. (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Cell **220**: 865.
- Gao, F., E. Bailes, et al. (1999). "Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes." Nature **397**(6718): 436-41.

- Gorry, P., D. Purcell, et al. (1998). "Restricted HIV-1 infection of human astrocytes: potential role of nef in the regulation of virus replication." J Neurovirol **4**(4): 377-86.
- Gorry, P. R., J. L. Howard, et al. (1999). "Diminished production of human immunodeficiency virus type 1 in astrocytes results from inefficient translation of gag, env, and nef mRNAs despite efficient expression of Tat and Rev." J Virol **73**(1): 352-61.
- Goulder, P., R. Phillips, et al. (1997). "Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS." Nat Med **3**: 212-214.
- Greene, W. C. and B. M. Peterlin (2002). "Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy." Nat Med **8**(7): 673-80.
- Gross, L. A., G. S. Baird, et al. (2000). "The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 11990-5.
- Hakata, Y., M. Yamada, et al. (2002). "The carboxy-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 protein Rev has multiple roles in mediating CRM1-related Rev functions." J Virol **76**(16): 8079-89.
- Hamm, T. E., D. Rekosh, et al. (1999). "Selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 mutants that are resistant to inhibition by the transdominant negative RevM10 protein." J Virol **73**(7): 5741-7.
- Hamy, F., E. Felder, et al. (2001). "Merged Screening for Human Immunodeficiency Virus Tat and Rev Inhibitors." Journal of Biomolecular Screening **6**(3): 179-187.
- Hardy, G. A., N. Imami, et al. (2002). "Improving HIV-specific immune responses in HIV-infected patients." J HIV Ther **7**(2): 40-5.
- Harouse, J. M., C. Kunsch, et al. (1989). "CD4-independent infection of human neural cells by human immunodeficiency virus type 1." J Virol **63**(6): 2527-33.
- Hartley, O., K. Dorgham, et al. (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors selected on living cells from a library of phage chemokines." J Virol **77**(12): 6637-44.
- He, G. and D. M. Margolis (2002). "Counterregulation of chromatin deacetylation and histone deacetylase occupancy at the integrated promoter of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the HIV-1 repressor YY1 and HIV-1 activator Tat." Mol Cell Biol **22**(9): 2965-73.
- Henderson, B. R. and P. Percipalle (1997). "Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta." J Mol Biol **274**(5): 693-707.
- Ho, D. D., A. U. Neumann, et al. (1995). "Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection [see comments]." Nature **373**(6510): 123-6.
- Hofmann, W., B. Reichart, et al. (2001). "Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin." J Cell Biol **152**(5): 895-910.
- Hope, T. J., D. McDonald, et al. (1990). "Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: essential residues near the amino terminus." J Virol **64**(11): 5360-6.
- Horie, M., M. Suzuki, et al. (1999). "Cloning, expression, and chromosomal mapping of the human 14-3-3gamma gene (YWHAG) to 7q11.23." Genomics **60**(2): 241-3.

- Houghton, P. J. (1996). "Compounds with anti-HIV activity from plants." Trans R Soc Trop Med Hyg **90**(6): 601-4.
- Hu, C. Q., K. Chen, et al. (1994). "Anti-AIDS agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids." J Nat Prod **57**(1): 42-51.
- Huang, L., L. Zhang, et al. (2003). "Potential Drug Targets on the HIV-1 Envelope Glycoproteins gp120 and gp41." Curr Pharm Des. **9**(18): 1453-62.
- Huang, Y., W. Paxton, et al. (1996). "The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression." Nat Med **2**(11): 1240-3.
- Hudson, J., E. Graham, et al. (1993). "The unusual UVA-dependent antiviral properties of the furoisocoumarin, coriandrin." Photochem Photobiol **57**: 491-496.
- Hudson, J. B., F. Balza, et al. (1993). "Light-mediated activities of thiarubrines against human immunodeficiency virus." Photochem Photobiol **57**(4): 675-80.
- Hudson, J. B., L. Harris, et al. (1993). "The importance of light in the anti-HIV effect of hypericin." Antiviral Res **20**(2): 173-8.
- Hui, D. Y. (2003). "Effects of HIV protease inhibitor therapy on lipid metabolism." Prog Lipid Res **42**(2): 81-92.
- Ivanov, D., Y. T. Kwak, et al. (1999). "Cyclin T1 domains involved in complex formation with Tat and TAR RNA are critical for tat-activation." J Mol Biol **288**(1): 41-56.
- Izaurralde, E., U. Kutay, et al. (1997). "The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus." Embo J **16**(21): 6535-47.
- Jain, C. and J. G. Belasco (2001). "Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants." Mol Cell **7**(3): 603-14.
- Janssens, V. and J. Goris (2001). "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling." Biochem J **353**(Pt 3): 417-39.
- Jing, N. and X. Xu (2001). "Rational drug design of DNA oligonucleotides as HIV inhibitors." Curr Drug Targets Infect Disord **1**(2): 79-90.
- Jordan, A., P. Defechereux, et al. (2001). "The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation." Embo J **20**(7): 1726-38.
- Kasper, M. and K. Collins (2002). "Nef-Mediated Disruption of HLA-A2 Transport to the Cell Surface in T Cells." J Virol **77**(5): 3041-3049.
- Katahira, J., T. Ishizaki, et al. (1995). "Effects of translation initiation factor eIF-5A on the functioning of human T-cell leukemia virus type I Rex and human immunodeficiency virus Rev inhibited trans dominantly by a Rex mutant deficient in RNA binding." J Virol **69**(5): 3125-33.
- Kehlenbach, R. H., A. Dickmanns, et al. (1998). "Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT In vitro." J Cell Biol **141**(4): 863-74.
- Kitaura, H., N. Ohara, et al. (2002). "Changed activation of HIV-1 LTR in monocytoid cells by mycobacteria with temporal progression of infection." New Microbiol **25**(3): 357-61.
- Kjems, J. and P. Askjaer (2000). HIV-1 Rev and its cellular partners.
- Kozlowski, M. R., P. Sandler, et al. (1991). "Brain-derived cells contain a specific binding site for Gp120 which is not the CD4 antigen." Brain Res **553**(2): 300-4.

- Kruhlik, M. J., M. A. Lever, et al. (2000). "Reduced mobility of the alternate splicing factor (ASF) through the nucleoplasm and steady state speckle compartments." *J Cell Biol* **150**(1): 41-51.
- Kubota, S. and R. J. Pomerantz (2000). "The nuclear function of the nuclear diffusion inhibitory signal of human immunodeficiency virus type 1: critical roles in dominant nuclear localization and intracellular stability." *J Hum Virol* **3**(4): 173-81.
- Kuhlbrodt, K., B. Herbarth, et al. (1998). "Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells." *J Biol Chem* **273**(26): 16050-7.
- Kumagai, I., T. Takahashi, et al. (2001). "HIV Rev peptides conjugated with peptide nucleic acids and their efficient binding to RRE RNA." *Bioorg Med Chem Lett* **11**(9): 1169-72.
- Kunsch, C., H. T. Hartle, et al. (1989 a). "Infection of human fetal dorsal root ganglion glial cells with human immunodeficiency virus type 1 involves an entry mechanism independent of the CD4 T4A epitope." *J. Virol.* **63**: 5054-5061.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Lake, J. A., J. Carr, et al. (2003). "The role of Vif during HIV-1 infection: interaction with novel host cellular factors." *J Clin Virol* **26**(2): 143-52.
- Lecossier, D., F. Bouchonnet, et al. (2003). "Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein." *Science* **300**(5622): 1112.
- Lee, N. S., T. Dohjima, et al. (2002). "Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells." *Nat Biotechnol* **20**(5): 500-5.
- Lehner, T. (2003). "Innate and adaptive mucosal immunity in protection against HIV infection." *Vaccine* **21**: 68-76.
- Leitner, M. (2000). *Mythos HIV - Eine kritische Analyse der AIDS-Hysterie*. Niebüll, Verlag videel OHG.
- Lemey, P., O. G. Pybus, et al. (2003). "Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6588-92.
- Leszczyniecka, M., D. C. Kang, et al. (2002). "Identification and cloning of human polynucleotide phosphorylase, hPNPase old-35, in the context of terminal differentiation and cellular senescence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16636-41.
- Levesque, K., Y. S. Zhao, et al. (2003). "Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1 producing cells." *J Biol Chem*.
- Li, J., Y. Liu, et al. (2002). "Direct participation of Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway." *J Virol* **76**(16): 8374-82.
- Li, J., Y. Liu, et al. (2002). "Expression of exogenous Sam68, the 68-kilodalton SRC-associated protein in mitosis, is able to alleviate impaired Rev function in astrocytes." *J Virol* **76**(9): 4526-35.
- Li, J., H. Tang, et al. (1999). "A role for RNA helicase A in post-transcriptional regulation of HIV type 1." *Proc Natl Acad Sci* **96**(2): 709-14.
- Litovchick, A., A. Lapidot, et al. (2001). "Neomycin B-Arginine Conjugate, a Novel HIV-1 Tat Antagonist: Synthesis and Anti-HIV Activities." *Biochemistry* **40**: 15612-15623.
- Liu, Y., J. Li, et al. (2002). "HIV-1 Tat protein-mediated transactivation of the HIV-1 long terminal repeat promoter is potentiated by a novel nuclear Tat-interacting protein of 110 kDa, Tip110." *J Biol Chem* **277**(26): 23854-63.

- Loregian, A., K. Bortolozzo, et al. (2003). "The Sp1 transcription factor does not directly interact with the HIV-1 Tat protein." J Cell Physiol **196**(2): 251-7.
- Ludvigsen, A., T. Werner, et al. (1996). "Down-modulation of HIV-1 LTR activity by an extra-LTR nef gene fragment." Virology **216**(1): 245-51.
- Ludwig, E., F. Ceccherini-Silberstein, et al. (1999). "Diminished Rev-mediated stimulation of human immunodeficiency virus type 1 protein synthesis is a hallmark of human astrocytes." J Virol **73**(10): 8279-89.
- Ludwig, E., F. C.-. Silberstein, et al. (1999). "Diminished Rev-Mediated Stimulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protein Synthesis Is a Hallmark of Human Astrocytes." J. Virol. **73**(10): 8279-8289.
- Ma, Q. F., I. C. Bathurst, et al. (1992). "New thymidine triphosphate analogue inhibitors of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase." J Med Chem **35**(11): 1938-41.
- MacPherson, J., J. Ely, et al. (1999). "Ribozymes in gene therapy of HIV-1." Frontiers in Bioscience **4**: 497-505.
- Maldarelli, F., M. A. Martin, et al. (1991). "Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation." J Virol **65**(11): 5732-43.
- Malim, M. H., S. Bohnlein, et al. (1989). "Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function." Cell **58**(1): 205-14.
- Malim, M. H., J. Hauber, et al. (1988). "Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes." Nature **335**(6186): 181-3.
- Malim, M. H., L. S. Tiley, et al. (1990). "HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans- activator to its RNA target sequence." Cell **60**(4): 675-83.
- Mansky, L. M. and H. M. Temin (1995). "Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase." J Virol **69**(8): 5087-94.
- Marques, S. M., J. L. Veyrone, et al. (2003). "Restriction of human immunodeficiency virus type 1 Rev function in murine A9 cells involves the Rev C-terminal domain." J Virol **77**(5): 3084-90.
- Matz, M. V., A. F. Fradkov, et al. (1999). "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species." Nat Biotechnol **17**(10): 969-73.
- Mazumder, A., N. Neamati, et al. (1997). "Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action." J Med Chem **40**(19): 3057-63.
- McDonald, D., M. A. Vodicka, et al. (2002). "Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells." J Cell Biol **159**(3): 441-52.
- Mermer, B., B. K. Felber, et al. (1990). "Identification of trans-dominant HIV-1 Rev protein mutants by direct transfer of bacterially produced proteins into human cells." Nucleic Acids Res **18**(8): 2037-44.
- Michienzi, A., S. Li, et al. (2002). "A nucleolar TAR decoy inhibitor of HIV-1 replication." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14047-52.
- Miyazaki, Y., T. Takamatsu, et al. (1995). "The cytotoxicity of human immunodeficiency virus type 1 Rev: implications for its interaction with the nucleolar protein B23." Exp Cell Res **219**(1): 93-101.
- Modrow, S., Falke, D. (1997). Molekulare Virologie. Heidelberg; Berlin; Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.

- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. (2003). Molekulare Virologie. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Mori, S., R. Takada, et al. (1990). "Repressive effect of the nef cDNA of human immunodeficiency virus type 1 on the promoter activity of the viral long terminal repeat." Jpn J Cancer Res **81**(11): 1124-31.
- Murakami, N., Y. Ye, et al. (2002). "New Rev-transport inhibitor with anti-HIV activity from Valerianae Radix." Bioorg Med Chem Lett **12**(20): 2807-10.
- Murata, T., Y. Yoshino, et al. (2002). "Identification of nuclear import and export signals within the structure of the zinc finger protein TIS11." Biochem Biophys Res Commun **293**(4): 1242-7.
- Neumann, M. (1993). Molekulare Analyse von HIV-1 in einer chronisch infizierten Gliazelllinie: Ein Beitrag zum Verständnis von Viruslatenz, Ludwig-Maximilians-Universität München: 149.
- Neumann, M., E. Afonina, et al. (2001). "Nucleocytoplasmic transport in human astrocytes: decreased nuclear uptake of the HIV Rev shuttle protein." J Cell Sci **114**(Pt 9): 1717-29.
- Neumann, M., B. K. Felber, et al. (1995). "Restriction of human immunodeficiency virus type 1 production in a human astrocytoma cell line is associated with a cellular block in Rev function." J Virol **69**(4): 2159-67.
- New, D. R., M. Ma, et al. (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces death by apoptosis in primary human neuron cultures." J Neurovirol **3**(2): 168-73.
- Nicolini, A., M. A. Ajmone-Cat, et al. (2001). "Human immunodeficiency virus type-1 Tat protein induces nuclear factor (NF)-kappaB activation and oxidative stress in microglial cultures by independent mechanisms." J Neurochem **79**(3): 713-6.
- Nierengarten, M. B. (2003). "Malariotherapy to treat HIV patients?" Lancet Infect Dis **3**(6): 321.
- Niikura, M., G. Dornadula, et al. (1996). "Mechanisms of transcriptional transactivation and restriction of human immunodeficiency virus type I replication in an astrocytic glial cell." Oncogene **13**(2): 313-22.
- Nishi, K., M. Yoshida, et al. (1994). "Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression." J Biol Chem **269**(9): 6320-4.
- Novina, C. D., M. F. Murray, et al. (2002). "siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection." Nat Med **8**(7): 681-6.
- Ogg, G. S., X. Jin, et al. (1998). "Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA." Science **279**(5359): 2103-6.
- Olsen, H. S., S. Beidas, et al. (1991). "Mutational analysis of the HIV-1 Rev protein and its target sequence, the Rev responsive element." J Acquir Immune Defic Syndr **4**(6): 558-67.
- Olsen, H. S., A. W. Cochrane, et al. (1990). "Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids." Genes Dev **4**(8): 1357-64.
- Olsen, H. S., A. W. Cochrane, et al. (1992). "Interaction of cellular factors with intragenic cis-acting repressive sequences within the HIV genome." Virology **191**(2): 709-15.
- Otten, G., M. Schaefer, et al. (2003). "Induction of broad and potent anti-human immunodeficiency virus immune responses in rhesus macaques by priming

- with a DNA vaccine and boosting with protein-adsorbed polylactide coglycolide microparticles." *J Virol* **77**(10): 6087-92.
- O'Brien, W. (2003). "New classes of HIV drugs on the horizon. A review of the presentation at the satellite symposium "New hope: advancing care in HIV infection" at the 15th annual Association of Nurses in AIDS care conference, November 2002." *AIDS Read* **13**: 4-8.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, et al. (1993). "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinical latent stage of disease." *Nature* **362**: 355-358.
- Paris, A., B. Strukelj, et al. (1993). "Inhibitory effect of carnosolic acid on HIV-1 protease in cell-free assays." *J Nat Prod* **56**: 1426-1430.
- Pati, S., J. S. Foulke, Jr., et al. (2003). "Human herpesvirus 8-encoded vGPCR activates nuclear factor of activated T cells and collaborates with human immunodeficiency virus type 1 Tat." *J Virol* **77**(10): 5759-73.
- Peled-Zehavi, H., S. Horiya, et al. (2003). "Selection of RRE RNA binding peptides using a kanamycin antitermination assay." *RNA* **9**: 252-261.
- Pengsuparp, T., L. Cai, et al. (1995). "Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibit HIV-1 reverse transcriptase." *J Nat Prod* **58**(7): 1024-31.
- Perkins, A., A. W. Cochrane, et al. (1989). "Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus Rev protein." *J Acquir Immune Defic Syndr* **2**(3): 256-63.
- Piguet, V. and D. Trono (1999). "The Nef protein of primate lentiviruses." *Rev Med Virol* **9**(2): 111-20.
- Pinto, L. A., J. Sullivan, et al. (1995). "ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids." *J Clin Invest* **96**(2): 867-76.
- Plavec, I., M. Agarwal, et al. (1997). "High transdominant RevM10 protein levels are required to inhibit HIV-1 replication in cell lines and primary T cells: implication for gene therapy of AIDS." *Gene Ther* **4**(2): 128-39.
- Pollard, V. W. and M. H. Malim (1998). "The HIV-1 Rev protein." *Ann Rev Microbiol* **52**: 491-532.
- Pomerantz, R. (2002). "RNA interference meets HIV-1: Will silence be golden?" *Nat Med* **8**(7): 659-660.
- Pomerantz, R. J., T. Seshamma, et al. (1992). "Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency." *J Virol* **66**: 1809-1813.
- Ponten, J. and M. EH. (1968). "Longterm culture of normal and neoplastic human glia." *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **74**: 465-486.
- Powell, D. M., M. C. Amaral, et al. (1997). "HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(3): 973-8.
- Priya, R. (2003). "Learning to live with AIDS." *Nature* **423**(12 Juni): 685-686.
- Ptak, R. G. (2002). "HIV-1 regulatory proteins: targets for novel drug development." *Expert Opin Investig Drugs* **11**(8): 1099-115.
- Ragheb, J. A., P. Bressler, et al. (1995). "Analysis of trans-dominant mutants of the HIV type 1 Rev protein for their ability to inhibit Rev function, HIV type 1 replication, and their use as anti-HIV gene therapeutics." *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(11): 1343-53.

- Raijmakers, R., W. V. Egberts, et al. (2002). "Protein-protein interactions between human exosome components support the assembly of RNase PH-type subunits into a six-membered PNPase-like ring." J Mol Biol **323**(4): 653-63.
- Rampalli, S., A. Kulkarni, et al. (2003). "Stimulation of Tat-independent transcriptional processivity from the HIV-1 LTR promoter by matrix attachment regions." Nucleic Acids Res **31**(12): 3248-56.
- Ranki, A., A. Lagerstedt, et al. (1994). "Expression kinetics and subcellular localization of HIV-1 regulatory proteins Nef, Tat and Rev in acutely and chronically infected lymphoid cell lines." Arch. Virol. **139**: 365-378.
- Reddy, T. R., M. Suhasini, et al. (2002). "A role for KH domain proteins (Sam68-like mammalian proteins and quaking proteins) in the post-transcriptional regulation of HIV replication." J Biol Chem **277**(8): 5778-84.
- Reddy, T. R., W. Xu, et al. (1999). "Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev [published erratum appears in Nat Med 1999 Jul;5(7):849]." Nat Med **5**(6): 635-42.
- Rehberg, S., P. Lischka, et al. (2002). "Sox10 is an active nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for Sox10-mediated transactivation." Mol Cell Biol **22**(16): 5826-34.
- Reits, E. A. and J. J. Neefjes (2001). "From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells." Nat Cell Biol **3**(6): E145-7.
- Richman, L., P. R. Meylan, et al. (2002). "An adenovirus-based fluorescent reporter vector to identify and isolate HIV-infected cells." J Virol Methods **99**(1-2): 9-21.
- Rohr, O., D. Lecestre, et al. (2003). "Recruitment of Tat to heterochromatin protein HP1 via interaction with CTIP2 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in microglial cells." J Virol **77**(9): 5415-27.
- Rosorius, O., B. Reichart, et al. (1999). "Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1." J Cell Sci **112** (Pt 14): 2369-80.
- Ross, J. (1995). "mRNA Stability in Mammalian Cells." Microbiological Reviews **59**(3): 423-450.
- Ruhl, M., M. Himmelspach, et al. (1993). "Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans- activation." J Cell Biol **123**(6 Pt 1): 1309-20.
- Sabri, F., K. Titanji, et al. (2003). "Astrocyte activation and apoptosis: their roles in the neuropathology of HIV infection." Brain Pathol **13**(1): 84-94.
- Sambrook, J., Fritsch, EF, Maniatis, T: (1989). "Molecular cloning-A Laboratory manual." Cold Spring Harbour-Press.
- Schneider, R., M. Campbell, et al. (1997). "Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation." J Virol **71**(7): 4892-903.
- Schwartz, S., B. K. Felber, et al. (1992). "Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein." J Virol **66**(1): 150-9.
- Shahabuddin, M., G. Bentsman, et al. (1996). "A mechanism of restricted human immunodeficiency virus type 1 expression in human glial cells." J Virol **70**(11): 7992-8002.
- Shahabuddin, M., B. Volsky, et al. (1992). "Regulated expression of human immunodeficiency virus type 1 in human glial cells: induction of dormant virus." Pathobiology **60**: 195-205.

- Sharp, P. M., E. Bailes, et al. (1999). "Origins and evolution of AIDS viruses." Biol Bull **196**(3): 338-42.
- Sheehy, A., N. Gaddis, et al. (2002). "Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein." Nature **418**(8 August): 646-650.
- Sherman, M. P., C. M. De Noronha, et al. (2003). "Nuclear export of vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in tissue macrophages." J Virol **77**(13): 7582-9.
- Shim, J., H. Lim, et al. (2002). "Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization." Mol Cell **10**(6): 1331-44.
- Smith, A. B., 3rd, L. D. Cantin, et al. (2003). "Design, synthesis, and biological evaluation of monopyrrolinone-based HIV-1 protease inhibitors." J Med Chem **46**(10): 1831-44.
- Soros, V. B., H. V. Carvajal, et al. (2001). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by a dominant-negative mutant of Sam68 through sequestration of unspliced RNA at perinuclear bundles." J Virol **75**(17): 8203-15.
- Sreedhara, A. and J. A. Cowan (2001). "Targeted site-specific cleavage of HIV-1 viral Rev responsive element by copper aminoglycosides." J Biol Inorg Chem **6**(2): 166-72.
- Stauber, R., G. A. Gaitanaris, et al. (1995). "Analysis of Trafficking of Rev and Transdominant Rev Proteins in Living Cells Using Green Fluorescent Protein Fusions: Transdominant Rev Blocks the Export of Rev from the Nucleus to the Cytoplasm." Virology **213**: 439-449.
- Stauber, R., G. A. Gaitanaris, et al. (1995). "Analysis of trafficking of Rev and transdominant Rev proteins in living cells using green fluorescent protein fusions: transdominant Rev blocks the export of Rev from the nucleus to the cytoplasm." Virology **213**(2): 439-49.
- Stauber, R. and K. Horie (1998). "Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants." Biotechniques **24**(3): 462-6, 468-71.
- Stauber, R. H., E. Afonina, et al. (1998). "Analysis of intracellular trafficking and interactions of cytoplasmic HIV-1 Rev mutants in living cells." Virology **251**(1): 38-48.
- Stavrou, D., K. Bise, et al. (1989). "Antigenic heterogeneity of human brain tumors defined by monoclonal antibodies." Anticancer Res **9**(6): 1489-96.
- Stavrou, D., E. Keiditsch, et al. (1987). "Monoclonal antibodies against human astrocytomas and their reactivity pattern." J Neurol Sci **80**(2-3): 205-20.
- Subba Rao, G., S. Bhatnagar, et al. (2002). "Structure-based Design of a Novel Peptide Inhibitor of HIV-1 Integrase: A Computer Modeling Approach." Journal of Biomolecular Structure and Dynamics **20**(1).
- Suptawiwat, O., R. Sutthent, et al. (2003). "Intragenic HIV-1 env sequences that enhance Gag expression." Virology **309**: 1-9.
- Szebeni, A., B. Mehrotra, et al. (1997). "Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin." Biochemistry **36**(13): 3941-9.
- Taher, M., G. Lammering, et al. (2002). "Mood-enhancing antidepressant St. John's wort inhibits the activation of human immunodeficiency virus gene expression by ultraviolet light." IUBMB Life **54**(6): 357-64.
- Takahashi, T., I. Kumagai, et al. (1999). "Design of artificial peptides that recognize the HIV RRE IIB RNA." Nucleic Acids Symp Ser(42): 271-2.

- Tan, G., J. Pezzuto, et al. (1991). "Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase." J Nat Prod **54**: 143-154.
- Tange, T. O., T. H. Jensen, et al. (1996). "In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32." J Biol Chem **271**(17): 10066-72.
- Temin, H. M. (1986). "Retroviruses and evolution." Cell Biophys **9**(1-2): 9-16.
- Temin, H. M. and S. Mizutani (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus." Nature **226**: 1211-1213.
- Tenner-Racz, K., H. Stellbrink, et al. (1998). "The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy." J Exp med **187**: 949-.
- Tewari, D., A. Notkins, et al. (2003). "Inhibition of HIV-1 replication in primary human T cells transduced with an intracellular anti-HIV-1 p17 antibody gene." J Gene Med **5**(3): 182-9.
- Thomas, S. L., M. Oft, et al. (1998). "Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface." J Virol **72**(4): 2935-44.
- Tok, J. B., L. J. Dunn, et al. (2001). "Binding of dimeric aminoglycosides to the HIV-1 rev responsive element (RRE) RNA construct." Bioorg Med Chem Lett **11**(9): 1127-31.
- Tourriere, H., K. Chebli, et al. (2002). "mRNA degradation machines in eukaryotic cells." Biochimie **84**(8): 821-37.
- Truant, R. and B. R. Cullen (1999). "The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals." Mol Cell Biol **19**(2): 1210-7.
- Tsamis, F., S. Gavrillov, et al. (2003). "Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry." J Virol **77**(9): 5201-8.
- Ulich, C., D. Harrich, et al. (1996). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication is enhanced by a combination of transdominant Tat and Rev proteins." J Virol **70**(7): 4871-6.
- van Empel, J. (2000). Untersuchungen der regulatorischen Eigenschaften der HIV-1 Proteine Rev und Tat in humanen Astrozyten. München Ludwig Maximilians Universität, Dissertation rer. nat.
- van Lint, C. (2000). "Role of Chromatin in HIV-1 Transcriptional Regulation." Advances in Pharmacology **48**: 121-160.
- van Marle, G., J. Ethier, et al. (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 envelope-mediated neuropathogenesis: targeted gene delivery by a Sindbis virus expression vector." Virology **309**: 61-74.
- Van Ryk, D. I. and S. Venkatesan (1999). "Real-time kinetics of HIV-1 Rev-Rev response element interactions. Definition of minimal binding sites on RNA and protein and stoichiometric analysis." J Biol Chem **274**(25): 17452-63.
- Venkatesh, L. K., T. Gettemeier, et al. (2003). "A nuclear Kinesin-like protein interacts with and stimulates the activity of the leucine-rich nuclear export signal of the human immunodeficiency virus type 1 rev protein." J Virol **77**(13): 7236-43.
- Verkman, A. S. (2003). "Diffusion in cells measured by fluorescence recovery after photobleaching." Methods Enzymol **360**: 635-48.

- von Schwedler, U., R. S. Kornbluth, et al. (1994). "The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci **91**(15): 6992-6.
- Vredendaal, P. J., I. E. van den Berg, et al. (1996). "Human short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: cloning and characterization of the coding sequence." Biochem Biophys Res Commun **223**(3): 718-23.
- Watanabe, M., S. Hayakawa, et al. (2002). "Identification of licocoumarone as an apoptosis-inducing component in licorice." Biol Pharm Bull **25**(10): 1388-90.
- Wei, P., M. E. Garber, et al. (1998). "A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA." Cell **92**(4): 451-62.
- Weissman, J. D., J. R. Hwang, et al. (2001). "Extensive interactions between HIV TAT and TAF(II)250." Biochim Biophys Acta **1546**(1): 156-63.
- Wiebe, M. S., T. K. Nowling, et al. (2003). "Identification of novel domains within Sox-2 and Sox-11 involved in autoinhibition of DNA binding and partnership specificity." J Biol Chem **278**(20): 17901-11.
- Wodrich, H. and H. G. Krausslich (2001). "Nucleocytoplasmic RNA transport in retroviral replication." Results Probl Cell Differ **34**: 197-217.
- Wolff, B., J. J. Sanglier, et al. (1997). "Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleocytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA." Chem Biol **4**(2): 139-47.
- Wolff, H., R. Brack-Werner, et al. (2003). "Integrated functional and bioinformatics approach for the identification and experimental verification of RNA signals: application to HIV-1 INS." Nucleic Acids Research **31**(11): 2839-2851.
- Xu, H. X., M. Wan, et al. (2000). "Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease." Biol Pharm Bull **23**(9): 1072-6.
- Yang, L., G. F. Morris, et al. (1997 b). "Distinct transcriptional pathways of TAR-dependent and TAR-independent human immunodeficiency virus type-1 transactivation by Tat." Virology **235**(1): 48-64.
- Yang, L., C. N. Steussy, et al. (1996). "Interleukin-11 mRNA stabilization in phorbol ester-stimulated primate bone marrow stromal cells." Mol Cell Biol **16**(7): 3300-7.
- Yao, X. J., M. A. Wainberg, et al. (1992). "Mechanism of inhibition of HIV-1 infection in vitro by purified extract of *Prunella vulgaris*." Virology **187**(1): 56-62.
- Yi, R., H. P. Bogerd, et al. (2002). "Recruitment of the Crm1 nuclear export factor is sufficient to induce cytoplasmic expression of incompletely spliced human immunodeficiency virus mRNAs." J Virol **76**(5): 2036-42.
- Young, K. and T. Ross (2003). "Particle-based Vaccines for HIV-1 Infection." Curr Drug Targets Infect Disord **3**(2): 151-69.
- Zack, J. A. (1995). "The role of the cell cycle in HIV-1 infection." Adv Exp Med Biol **374**: 27-31.
- Zargarian, L., M. S. Benleumi, et al. (2003). "Strategy to Discriminate between High and Low Affinity Bindings of Human Immunodeficiency Virus, Type 1 Integrase to Viral DNA." J Biol Chem **278**(22): 19966-73.
- Zhou, J., H. T. Pham, et al. (2003). "The formation and activity of PP2A holoenzymes do not depend on the isoform of the catalytic subunit." J Biol Chem **278**(10): 8617-22.

Zolotukhin, A. S. and B. K. Felber (1999). "Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev." J Virol **73**(1): 120-7.

*Die Länge eines Tätigkeitsberichts ist umgekehrt proportional zum
Ausmaß der geleisteten Arbeit.*

Sweeney's Gesetz
(Arthur Bloch, „Murphy's Neue
Gesetze III“, Goldman Verlag)

Danksagung

Frau PD Dr. Ruth Brack-Werner danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, sowie für die kompetente und geduldige Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. V. Erfle danke ich sehr für die freundliche Aufnahme in das Institut für Molekulare Virologie und jegliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. T. Cremer danke ich herzlich für die Bereiterklärung zur Begutachtung meiner Arbeit sowie für alle lebhaften und geradezu plastischen Diskussionen im Laufe der letzten Jahre.

In der Arbeitsgruppe „Retrovirale Regulation“ danke ich besonders Frau Manja Ziegler für die gute Zusammenarbeit und die nette Atmosphäre die sie als Kollegin im Labor verbreitete, sowie für das Korrekturlesen der Arbeit.

Sehr zu Dank verpflichtet bin ich ebenfalls Herrn Dr. Markus Neumann, der mich in die Laborarbeit am IMV einführte und von dem ich fachlich so viel gelernt habe wie von niemandem zuvor.

Desweiteren danke ich Herrn Christian Bickel der einen großen Teil der vergangenen drei Jahre Freud und Leid des Doktorandenalltags mit mir teilte, ebenso wie Herrn Kamyar Hadian für die gute Zusammenarbeit in den letzten Monaten und das Korrekturlesen der Arbeit.

Für die produktive und überaus angenehme Zusammenarbeit, sowie für Hilfestellungen bei computertechnischen Problemen danke ich besonders Herrn Dr. T. Werner und Herrn Dr. R. Schneider.

Weiter danke ich Frau Dr. Susanne Kramer-Hämmerle sehr für ihre herzliche Offenheit und die stetige Diskussions- und Tatbereitschaft im Labor.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre bin ich weiter allen Kolleginnen und Kollegen im Institut zu Dank verpflichtet. Besonders darunter zu nennen sind Frau Voll und Frau Witte und das Team der Spülküche um Frau Schalk, das seinesgleichen sucht.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Birgit Kraus, nicht nur für das Korrekturlesen der Arbeit und die Unterstützung im Labor, sondern auch für ihre Liebe und die wunderschöne Zeit, die wesentlich zu meinem Durchhaltevermögen während dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein allergrößter Dank aber gilt meiner Mutter Maria, meiner Schwester Hannelore sowie meiner Tante Ilse. Durch die außerordentliche Unterstützung, Liebe und Kraft die ich von Ihnen erhielt, wurden die Grundlagen für meine Ausbildung geschaffen und die Möglichkeit gegeben sie mit dieser Arbeit zu beenden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Horst Karl-Heinz Wolff

Geboren am 05.04.1973 in München

Eltern (geschieden): Werner Wolff und Maria Wolff, geb. Freisler

Schwester: Hannelore Wolff

Schulische Ausbildung

1979-1983	Besuch der Grundschule am Strehleranger in München
1983-1989	Besuch des Werner-von-Siemens Gymnasiums in München
1989	Umzug nach Hammer bei Traunstein in Oberbayern
1989-1992	Besuch des Chiemgau-Gymnasiums in Traunstein
Juni 1992	Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife
1992-1993	Wehrdienst bei der Bundeswehr in Bad Reichenhall

Studium

1993-1999	Studium der Biologie an der Technischen Universität München Abschluss mit der Diplomarbeit „Untersuchungen zur DNA-Photolyase von <i>Escherichia coli</i> “ am Lehrstuhl III für Organische Chemie und Biochemie der TU München (Prof. Dr. Dr. Bacher)
April 1999	Erlangung des Grades eines Diplom-Biologen
1999	3-monatiger Aufenthalt auf der biologischen Station „Madre Selva II“ von Project Amazonas Inc., Peru
2000-2003	Promotionsstudium Biologie an der LMU-München und Dissertation am Institut für molekulare Virologie der GSF, geleitet von Prof. Dr. Erfle. Betreuung durch PD Dr. Ruth Brack-Werner.

Eigene Veröffentlichungen

Wolff, H., Brack-Werner, R., Neumann, M., Werner, T., Schneider, R.

Integrated functional and bioinformatics approach for the identification and experimental verification of RNA signals: application to HIV-1 INS

Nucleic Acids Research, 2003, Vol.31, No.11 2839-2851

Demart, S., Checcerini-Silberstein, F., Schlicht, S., Walcher, S., Wolff, H., Neumann, M., Erfle, V., Brack-Werner, R.

Analysis of nuclear targeting activities of transport signals in the human immunodeficiency virus Rev protein

Experimental Cell Research, 2003, Vol. 291, 484-501

Patentanmeldungen

Brack-Werner, R., Neumann, M., Erfle, V., Wolff, H.

Reportergen-Konstrukt zum Nachweis von HIV-Rev und HIV-Tat

DE-Patent erteilt am 4.3.2004 unter Nr. 101 30 155

Wolff, H., Busch, DH., Neumann, M., Erfle, V

MHC-Tetramere

Patent angemeldet am 10.4.2001 unter 101 17 858

Wolff, H., Busch, DH., Erfle, V.

MHC-Multimere

Patentierung beantragt unter P16387

Eigene Vorträge

Wolff, H., Neumann, M., Werner, T., Brack-Werner, T., Schneider, R.

Identification and prediction of HIV-1 inhibitory sequence elements (INS)

6th European Conference on Experimental AIDS Research ECEAR,

Edinburgh 2001

Wolff, H., Brack-Werner, R.

Function and intracellular localization of HIV-1 regulatory proteins, revealed by fluorescence microscopy

1st annual Workshop on „Dynamic imaging microscopy & Analysis for Biologists“,

Institut Pasteur, Paris 2003

Wolff, H., Brack-Werner, R.

Mobility and function of HIV regulatory proteins observed using phase contrast and multiple fluorescence microscopy

50 years phase contrast and Live cell Imaging, Institute of Physics, London 2004

Anhang I - Verwendete Primer

Alle verwendeten Primer wurden von U. Linzner in der AG BIODV, im Institut für Experimentelle Genetik der GSF, synthetisiert. Die angegebene Primer-Nummer bezieht sich auf die fortlaufende Synthesenummer.

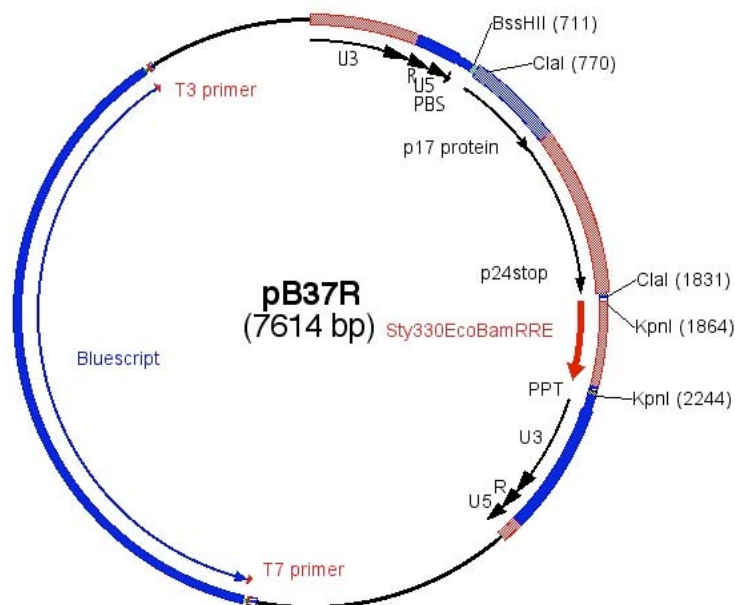
Nr.	Name	Sequenz (5'-3')
35508	5'-Retro	GGCTGCCGACCCCGGGGGTGG
36509	3'-pFB	TGAGCGGGACTCTGGGGTTCG
36510	Linker-polydT	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCT CGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
37444	3'-Mutant-Rev-NheI	GGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTAGCTC CTGCACC
37443	5'-SacII-Rev	TCCAGCCTCCGCGGGCGCGCAAGAAATG GCAAGCGCA
38548	CMV-mRNAstart	ATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTT T
39090	5'-BssHII-NheI-Rev	GGCGCGCAAGAAATGGCTAGCGCAGGAA GAAGC
43163	5'-Rev-PAAAA	GCCTGTGCCTCTTCAGCTACCAGCGGCA GCGGCATTA ACTCTTGATTGTAACGAGG
39093	5-Rev-M5xI	GAATAGAGCAGCAAGGTGGAGAGAGAGA CAG
39091	5'-Rev-M5xxI	GAATAGAGCAGCAAGGTGGCTCGAGAGA CAG
39089	3'-Rev-GAGA-NheI	GCTAGCTCCTGCACCATTCTCTTTAGTTC CTGACTC
39658	5'-Rev-RTV->EDR	CGACGAAGAGCTCATCGAGGACAGAAGA CTGATCAAGCTTCTC
28914	5'-SacII-SecSig(BamHI)	ATGCAAGAGCCGCGGATGGAGACAGACA CACTCCTGCTATGGGTA CTGCTGCTCTGG G
28916	3'-SecSig-NheI	TACTAATGCTAGCTGCCCCGGATCCGTCA CCAGTGGAACCTGGAACCCAGAGCAGCA GTACC
46008	5'-SacII-BssHII-Rev(noNheI)	AGCCTCCGCGGGCGCGCAAGAAATGGCT TCTGCAGGAAGAAGCGGA
46009	3'-Rev-RexNES-HpaI-NheI	GCTAGCGTTAACGGGAGGGCTGTGCGAGT GACAGAGATGAGTATAGCTGTGCGCTCAG TGCATCCATCACAGGCTCTGCAGATCGTC C
39865	5'-p17-CIaI	GCCATCGATAAGCTTTGGGAAAAAATTCTG GTTAAGGCCAGGGGG

39866	3'-p17-ClaI	ATTATCGATGGGTAATTTTGGCTGACCTG ATTGCTG
39867	5'-p24-ClaI	GCCATCGATAAGCTTCTATAGTGCAGAA CATCCAGGGGC
39868	3'-p24-ClaI	ATTATCGATGGCTACAAAACCTTTGCCTTA TGGCCGGGTCC
32119	5'-INS4-new	CGAATTCGAGACGGCCATCGATAAGCTTA AAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAG
32120	3'-INS4-new	TCGAATTCGATTATCGATGGATCGAGAAC TAGGTATGGTAAATGCAGTATACTTCTG
32121	5'-INS5-new	CGAATTCGAGACGGCCATCGATAAGCTTA AGTCAGATTTACCCAGGGATTAAAGTAAG GC
32122	3'-INS5-new	TCGAATTCGATTATCGATGGATCGAGATA TGGGCAGTTTAAATTTAGGAGTCTTTCCC C
32123	5'-INS6-new	CGAATTCGAGACGGCCATCGATAAGCTTC ACCCTAACTGACACAACAATCAGAAGAC TG
32124	3'-INS6-new	TCGAATTCGATTATCGATGGATCGAGAAT AGTACTTTCTGATTCCAGCACTGAC
32125	5'-INS7-new	CGAATTCGAGACGGCCATCGATAAGCTTT CCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTAT G
32126	3'-INS7-new	TCGAATTCGATTATCGATGGATCGAGAAT CACCTGCCATCTGTTTTCCATAATCCC
32127	5'-INS10-new	CGAATTCGAGACGGCCATCGATAAGCTTG ACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCA C
32128	3'-INS10-new	TCGAATTCGATTATCGATGGATCGAGACA CAGGGTGTAAACAAGCTGGTGTCTCTCC
32459	5-INS-sequencing	GTGGAGCAGTACGAGCGCACCGAG
32458	3'-INS-sequencing	CTCTTTGCCTTGGGGTACCGAGCTCG
28037	5'-Red-BssHII-ATG-NheI	AATAGCGCGCGGGATGGCTAGCGCTGTG CGCTCCTCCAAGAACGTC
28039	3'-Red-STOP-ClaI	TTTCTAATCGATGGCCTACAGGAACAGGT GGTGGCGGCCCTCGGTGCGCTC
39112	5'-SacII-BsshII-NheI-alpha b4	AGCCTCCGCGGGCGCGCAAGAAATGGCT AGCCATGAGGCAAGAGACTTCATTACTGA AATC
39111	3'-SpeI-alpha b4 -ClaI	TATCGATGTTAACTAGTTTCTGCACCCTG AGAATTAGATGATGACTGTGAAATAGG

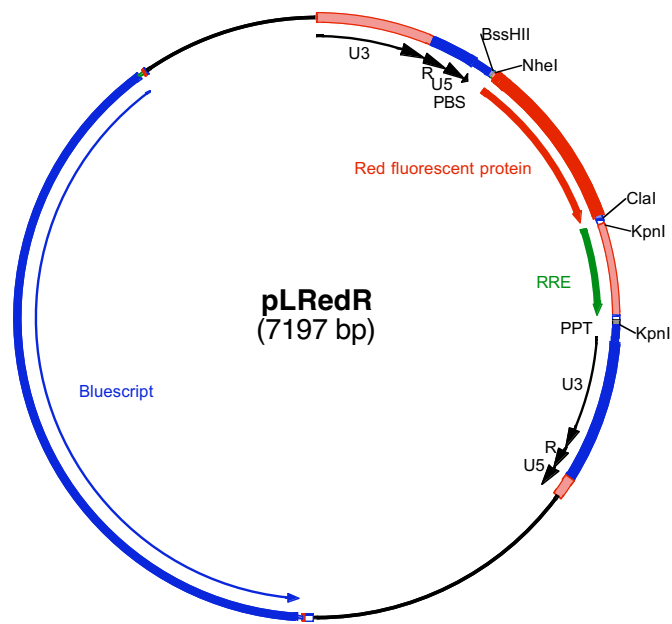
Anhang II -Plasmidkarten

In diesem Anhang sind einige wichtige Plasmid-Karten zusammengestellt, die für das Verständnis der vorgestellten Ergebnisse von Bedeutung sind. Die Aufreihung ist nicht komplett, da dies den Rahmen dieser Dissertation sprengen würde. Für Klonierungen benutzte Restriktionsstellen sind angegeben, ebenso wie wichtige ORFs und Promotor-Regionen. Eine ausführliche Beschreibung der Plasmide findet sich im Materialteil.

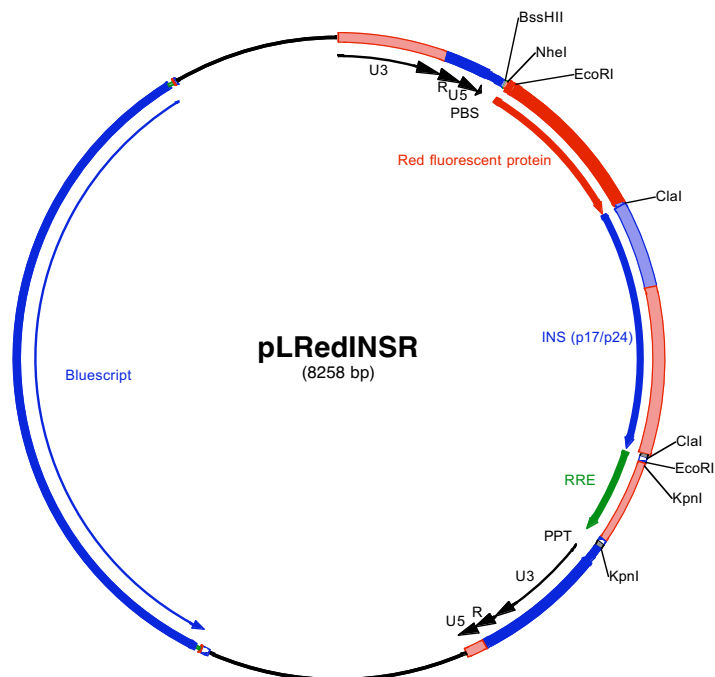
Reportervektoren



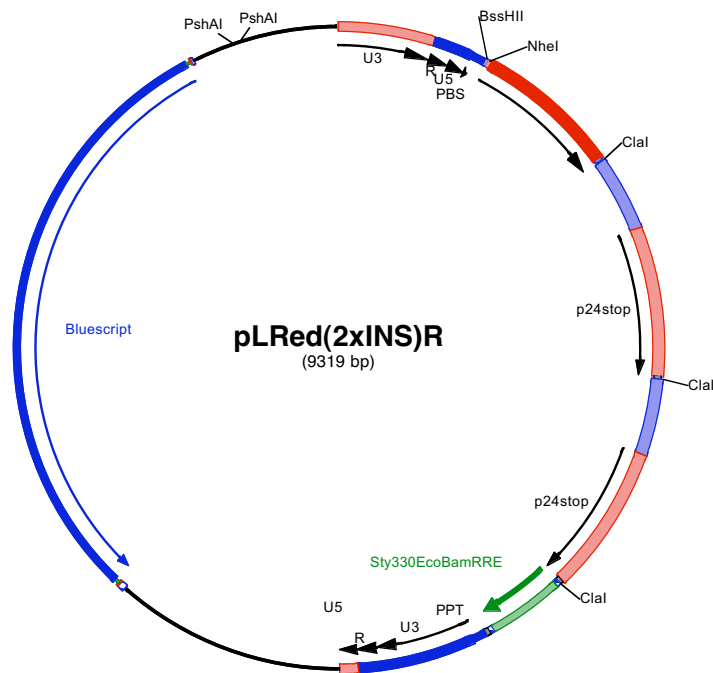
pB37R: Exprimiert Rev- und Tat-abhängig p37 Gag Protein.



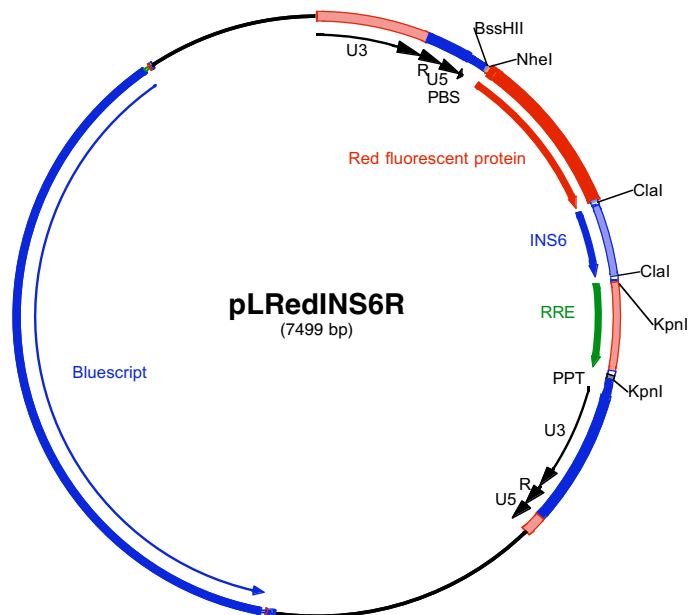
pLRedR: Exprimiert Tat- (und wenig Rev-) abhängig *DsRed1* (RFP).



pLRedINSR: Exprimiert Tat- und Rev-abhängig *DsRed1* (RFP).

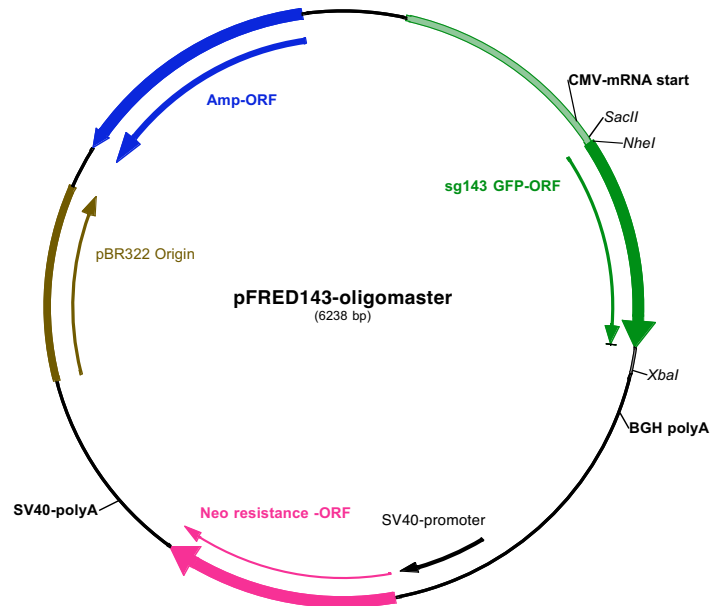


pLRed(2xINS)R: Exprimiert Tat- und stark Rev-abhängig DsRed1 (RFP).

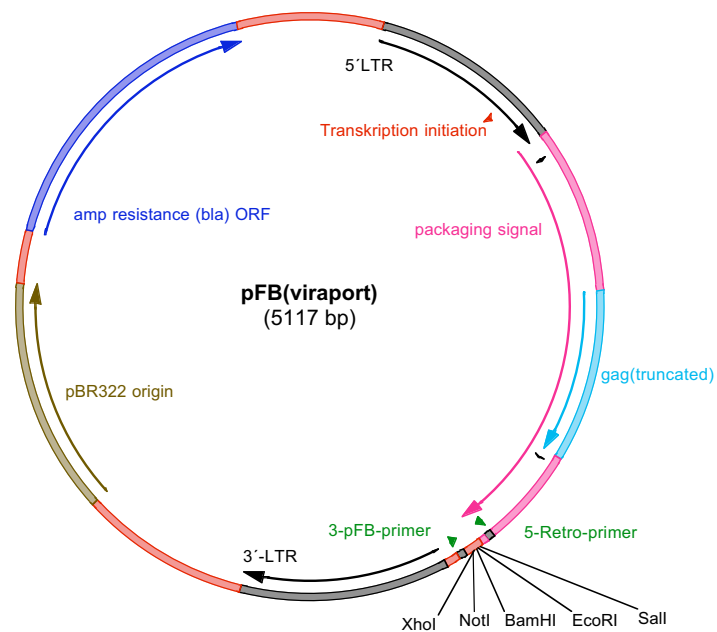


pLRedINS6R: Basierend auf pLRedR; exemplarisch dargestellt für alle weiteren Konstrukte, die zur Bestimmung der INS-Aktivität (s. Ergebnisteil) generiert wurden.

Weitere Vektoren

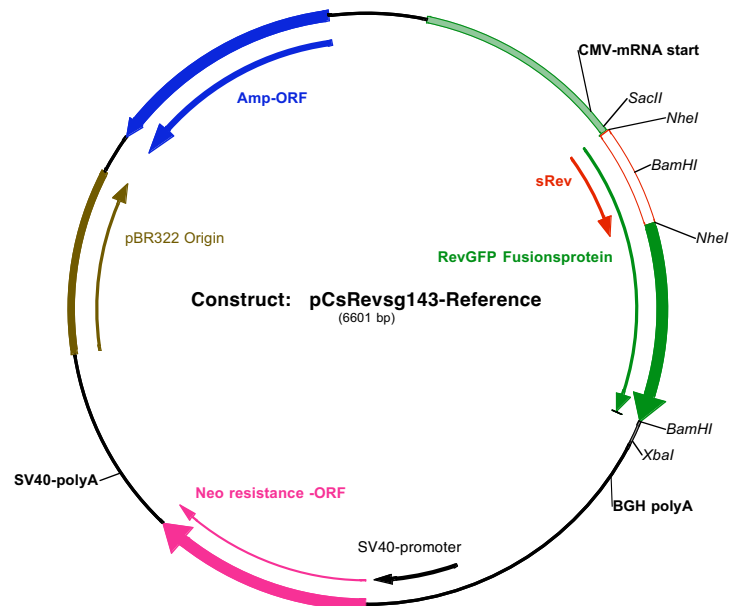


pFred143-(oligomaster): Exprimiert GFP unter Kontrolle des CMV-Promotors.



pFB: Retroviraler Vektor, der cDNAs unter MMLV-Kontrollern transkribiert. Dies ist der Basisvektor für die "fetal brain cDNA library" (Stratagene). Unter anderem sind die Multi-Cloning-Site (MCS) und Bindungsstellen für die Primer 5'-Retro und 3'-pFB angegeben, die die MCS flankieren.

Rev-Expressionsplasmid



pCsRevsg143: Exprimiert RevGFP unter Kontrolle des CMV-Promotors. Die Rev-Konstrukte Rev1-79RexNES, SecSigRev, RevEDR, RevM5, RevM10bl, RevP(A)₄, sowie alle weiteren Plasmide zur Expression verschiedener Rev-GFP Fusionsproteine basieren auf diesem Plasmid. Der ORF von sRev dieses Plasmids wurde durch die jeweilige Sequenz ersetzt.

Anhang III –cDNA-Sequenzen und Ergebnisse der Datenbanksuche (BLAST)

In diesem Anhang sind die cDNA-Nukleotidsequenzen der im Ergebnisteil (3.1.7) aufgeführten Faktoren abgebildet, soweit diese sequenziert werden konnten. Die Sequenzierungen wurden direkt im isolierten Vektor pFB mit den Primern 5'-Retro und 3'-pFB durchgeführt (s. Anhang II, Weitere Vektoren). Wenn eine Translation der Nukleotidsequenz in Proteinsequenz Homologien zu bereits bekannten Proteinsequenzen ergab, sind diese im Ein-Buchstaben-AS-Code ebenfalls angegeben. Nach der eigentlichen cDNA-Sequenz ist das Ergebnis einer BLAST-Suche mit dieser cDNA-Sequenz abgebildet (Stand Juni 2003). Hochsignifikante Treffer, sowie ein Auszug eines entsprechender Datenbankeintrag sind gezeigt.

I-alpha b4

```

1  ATAACATTAATATATGAATGAATATTACTGCTTTAAATTTGTTTTACCCAGTGCACAAAACGAAAATATTTAAATAC
81  TTTTGTAGTTAAAATGCTTTAAATTTTAGGGAATATTCCTTAACAGTTTTTCAGTAATTTAATCATCTACTTTTCTGTTT
161  TATAGTAAAATATTTTAC ATG TGT CTA GGT CAA AAA AAA AAA TCT CAA GTG ACC ATG GCA
225  TGT TTT AGG TTC ATG TAT GTA GTT GAA TTG TTT ATA TAT TTG TCT GTA TTA CGT TCC AGA
285  AAC TGT TCA GGT TCC ATT ATC AAA ACG AGC AAA ATT TGT TGG ACC TGG TGG CTA TAA CTTA
346  AAAAAACTTCAGGCTGAAACAGGTGTAACACTATTAGTCAGGTGGATGAAGAAACGTTTTCTGTATTTGCACCAACCCAG
426  TGCT ATG CAT GAG GCA AGA GAC TTC ATT ACT GAA ATC TGC AAG GAT GAT CAG GAG CAG CAA
      1► M H E A R D F I T E I C K D D Q E Q Q
487  TTA GAA TTT GGA GCA GTA TAT ACC GCC ACA ATA ACT GAA ATC AGA GAT ACT GGT GTA ATG
20► L E F G A V Y T A T I T E I R D T G V M
547  GTA AAA TTA TAT CCA AAT ATG ACT GCG GTA CTG CTT CAT AAC ACA CAA CTT GAT CAA CGA
40► V K L Y P N M T A V L L H N T Q L D Q R
607  AAG ATT AAA CAT CCT ACT GCC CTA GGA TTA GAA GTT GGC CAA GAA ATT CAG GTG AAA TAC
60► K I K H P T A L G L E V G Q E I Q V K Y
667  TTT GGG ACG TGA CCC AGC CCG ATG
80► F G T

```

Abbildung III-1a: Sequenz von cDNA I-alpha b4

Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(bits)	Value
gi 31335240 gb AY290863.1 Homo sapiens PNPase mRNA, partia...	743	0.0
gi 24308347 ref NM_033109.1 Homo sapiens 3'-5' RNA exonucl...	743	0.0
gi 20987770 gb BC021170.1 Homo sapiens, clone IMAGE:393083...	743	0.0
gi 20372921 emb AJ458465.1 HSA458465 Homo sapiens mRNA for ...	743	0.0
gi 13543674 gb BC005986.1 BC005986 Homo sapiens, clone IMAG...	743	0.0
gi 12654098 gb BC000862.1 BC000862 Homo sapiens, clone IMAG...	743	0.0
gi 31657165 gb BC053660.1 Homo sapiens 3'-5' RNA exonuclea...	743	0.0
gi 24943087 gb AY027528.1 Homo sapiens 3'-5' RNA exonuclea...	735	0.0

Abbildung III-1b: Hochsignifikante BLAST-Suchergebnisse zu I-alpha b4

NM_033109. Homo sapiens 3'-5'...[gi:24308347] [Links](#)

LOCUS OLD35 2616 bp mRNA linear PRI 06-APR-2003
DEFINITION Homo sapiens 3'-5' RNA exonuclease (OLD35), mRNA.
ACCESSION NM_033109
VERSION NM_033109.1 GI:24308347
KEYWORDS .
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2616)
AUTHORS Leszczyniecka,M., Kang,D.C., Sarkar,D., Su,Z.Z., Holmes,M.,
Valerie,K. and Fisher,P.B.
TITLE Identification and cloning of human polynucleotide phosphorylase,
hPNPase old-35, in the context of terminal differentiation and
cellular senescence
JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16636-16641 (2002)
MEDLINE [22388240](#)
PUBMED [12473748](#)
REMARK GeneRIF: an important role for hPNPase(old-35)in growth control
associated with terminal differentiation and cellular senescence.
REFERENCE 2
AUTHORS Rajmakers,R., Egberts,W.V., van Venrooij,W.J. and Pruijn,G.J.
TITLE Protein-protein interactions between human exosome components
support the assembly of RNase PH-type subunits into a six-membered
PNPase-like ring
JOURNAL J. Mol. Biol. 323 (4), 653-663 (2002)
MEDLINE [22307406](#)
PUBMED [12419256](#)

REMARK GeneRIF: Protein-protein interactions between human exosome components support the assembly of RNase PH-type subunits into a six-membered PNPase-like ring

COMMENT PROVISIONAL [REFSEQ](#): This record has not yet been subject to final NCBI review. The reference sequence was derived from [AJ458465.1](#).

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..2616
/organism="Homo sapiens"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9606"
/chromosome="2"
/map="2p15"

[gene](#) 1..2616
/gene="OLD35"
/note="synonyms: PNPASE, old-35"
/db_xref="LocusID:[87178](#)"

[CDS](#) 19..2370
/gene="OLD35"
/function="exoribonuclease"
/note="polynucleotide phosphorylase-like"
/codon_start=1
/product="3'-5' RNA exonuclease"
/protein_id="[NP_149100.1](#)"
/db_xref="GI:24308348"
/db_xref="LocusID:[87178](#)"

(....)

Abbildung III-1c: Datenbank-Eintrag zu I-alpha b4

I-kappa b2

```

1 gctctgtgggtcggctctctccggcacttgggctccagtcgcgccctccaagccctt
58 caggccgccccagtgctctctctctctccggccagaccagccccgcaagatggt
1► M V
115 ggaccgagcaactggtgcagaaagcccggtggccgagcaggcggagcgtacga
2► D R E Q L V Q K A R L A E Q A E R Y D
172 cgacatggccgcccgaatgaagaacgtgacagagctgaatgagccactgtcgaatga
21► D M A A A M K N V T E L N E P L S N E
229 ggaacgaaaccttctgtctgtgacctacaagaacgttggggggcagccctcttc
40► E R N L L S V A Y K N V V G A R R S S
286 ctggaggggtcatcagtagcattgagcagaagacatctgcagcggcaatgagaagaa
59► W R V I S S I E Q K T S A D G N E K K
343 gattgagatggtcgtgctacgggagagatagagaaggagttggaggctgtgtg
78► I E M V R A Y R E K I E K E L E A V C
400 ccaggatgtgctgagcctgctggataactacctgatcaagaattgcagcagagacca
97► Q D V L S L L D N Y L I K N C S E T Q
457 gtacgagagcaagtgttctactgaagatgaaggggactactaccgctactctggc
116► Y E S K V F Y L K M K G D Y Y R Y L A
514 tgaagtggccaccggagagaaaagggcgaggtggtggagtcctcgagaaggccta
135► E V A T G E K R A T V V E S S E K A Y
571 cagcgaagcccacgagatcagcaagagcacatgcagcccaccacccatccgatt
154► S E A H E I S K E H M Q P T H P I R L
628 aggcctggctcttaactactccgtcttctactatgagatccagaacgccccagagca
173► G L A L N Y S V F Y Y E I Q N A P E Q
685 agcgtgcacttggccaagaccgcttcgacgacgcatcgccgagcttgacaccct
192► A C H L A K T A F D D A I A E L D T L
742 caacgaggactcctacaaggactccacgctcatcatgcagctcctccgagacaacct
211► N E D S Y K D S T L I M Q L L R D N L
799 cagctctggacgagcagaccagcagcagcagatggcggcgaaggcaacaattaagg
230► T L W T S D Q Q D D D G G E G N N
856 cccaggggaactggcagcgcacgagatgctactactgcagtcttt

```

Abbildung III-2a: Sequenz von cDNA I-kappa b2

Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(bits)	Value
gi 4753219 gb AC006388.3 Homo sapiens BAC clone CTA-363M4 ...	720	0.0
gi 21464100 ref NM_012479.2 Homo sapiens tyrosine 3-monoox...	720	0.0
gi 10436557 dbj AK024230.1 Homo sapiens cDNA FLJ14168 fis,...	720	0.0
gi 6016837 dbj AB024334.1 Homo sapiens mRNA for 14-3-3gamma...	720	0.0
gi 18088512 gb BC020963.1 BC020963 Homo sapiens, 14-3-3 pro...	462	e-127

Abbildung III-2b: Hochsignifikante BLAST-Suchergebnisse zu I-kappa b2

1: AB024334. Homo sapiens mRNA...[gi:6016837] [Links](#)

LOCUS AB024334 3712 bp mRNA linear PRI 08-OCT-1999
DEFINITION Homo sapiens mRNA for 14-3-3gamma, complete cds.
ACCESSION AB024334
VERSION AB024334.1 GI:6016837
KEYWORDS 14-3-3gamma; human 14-3-3gamma.
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (sites)
AUTHORS Horie,M., Suzuki,M., Takahashi,E. and Tanigami,A.
TITLE Cloning, expression, and chromosomal mapping of the human
14-3-3gamma gene (YWHAG) to 7q11.23
JOURNAL Genomics 60 (2), 241-243 (1999)
MEDLINE [99417686](#)
PUBMED [10486217](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 3712)

AUTHORS Horie,M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (26-FEB-1999) Masato Horie, Otsuka Pharmaceutical Co.,
Ltd., Otsuka GEN Research Institute; 463-10 Kagasuno, Kawauchi-cho,
Tokushima, Tokushima 771-0192, Japan (E-mail:mhorie@otsuka.gr.jp,
Tel:81-88-665-2888, Fax:81-88-637-1035)
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..3712
/organism="Homo sapiens"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9606"
/tissue_type="fetal brain"
[gene](#) 1..3712
/gene="14-3-3gamma"
[CDS](#) 170..913
/gene="14-3-3gamma"
/codon_start=1
/product="14-3-3gamma"
/protein_id="[BAA85184.1](#)"

/db_xref="GI:6016838" (...)

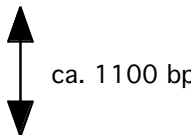
Abbildung III-2c: Ein Datenbank-Eintrag zu I-kappa b2

III-delta-37

```

1 CTAGACTGCCGGATCGAATTGTCGACGAATTCGGCACGAGGGAGAGAGAGAGAGAG
57 AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
113 A

```



```

1200 CGGCTTGGGAGCCTCTGGTGTAAAGCACTTGTCTACTGTTGCCATTACTGTTTCTGTT
1256 AGTAGTTATTTTCATTCCTGCTGCCTTACCAAGTGTGAATATCTGTTTATTTCAAG
1312 CAAGTCCTGCCACAGCACTCATGGGTAGCCTTGATCACAGGAGTCCTCCCTTTGCA
1368 CAATCCAGTAATGCACACATGTTAGTTTCCACAGTGTAGTTAACACCTGTTCCCC
1424 AGCAGCATGGTCCCATTTTCAGTCACCACAGTACCTAGCCGTGCAAGTTAGGTGCA
1480 GTGCATTTACCAGCCTACGTGCGGCAGGTGTCGTGATGAAGATGCTGATAACCCAC
1536 CAGTGGTGTCTCGGCAATGTTTCAGGACGTTGAAGTTTGTGCAAAGGGTGAATGT
1592 TGCAAGTGGGTTACAGACGTAGAAAAGAATAGGACAGGCCAGGCACAGTGGCTACA
1648 CCTGTAATCCCAGCACTTTGGGGGGCCCGAGGCAGGTGGATCACCTGAGGTGAGGA
1704 GTTTGACACCAGTCTGACCAGCATGGCAAACCATCTCTACTAAAAATACAAAAAT
1760 TAGCTGGTTGTGGTGGCGGGGCGCTGTGGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAG
1816 GAGAATTGATTGAACTTAGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACATCACTG
1872 CATTCCAGCCTGGGTGACAGACCGAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1928 AAAAAAAAAAAAAA

```

Abbildung III-3a: Sequenz von cDNA III-delta-37. ein Bereich von etwa 1100 bp konnte wegen der repetitiven Sequenzen am 5'-Ende bisher nicht sequenziert werden.

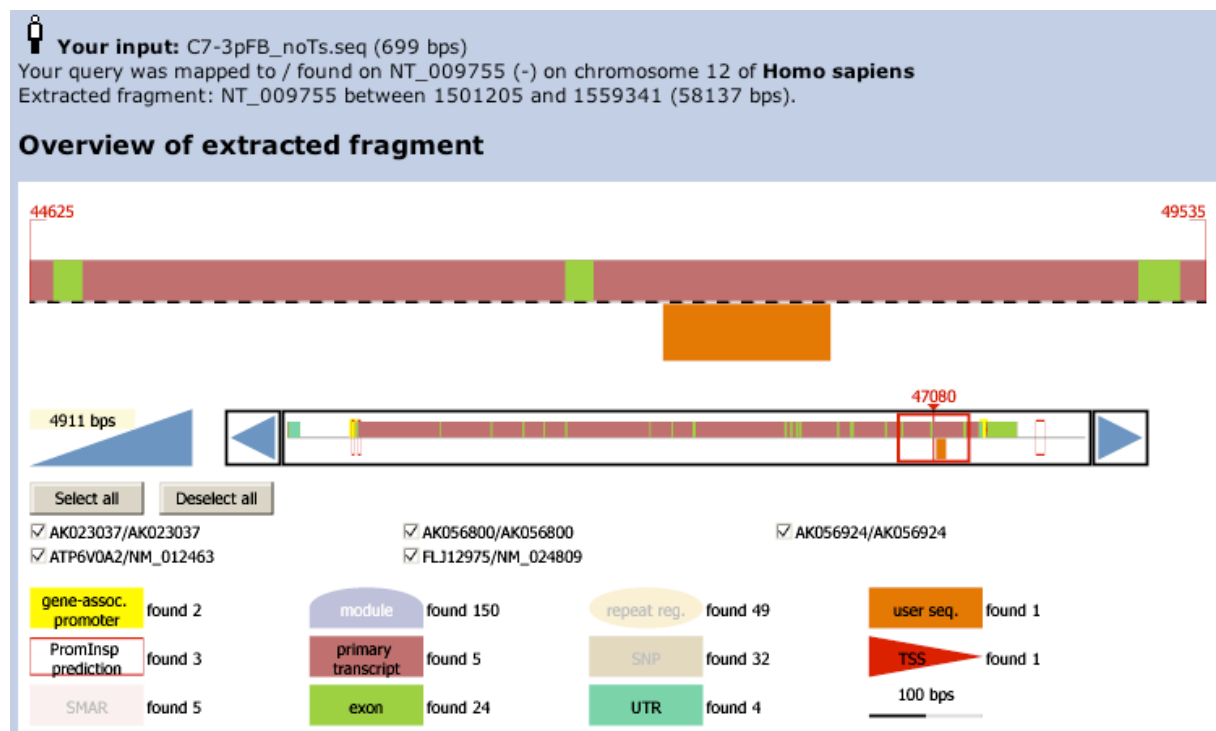


Abbildung III-3b: Lokalisation des 3'-gelegenen Teils der III-delta-37 cDNA-Sequenz in einem Intron des Gens einer humanen ATPase. Der orange-farbene Block repräsentiert die isolierte cDNA-Sequenz. Eine Legende ist in der Abbildung selbst enthalten. Entnommen aus EIDorado, Genomatix Software GmbH.

II-alpha-89

```

1  agcagcagcggcagcagcagcagcggcagcagcggcagcagcggcagcagcggcagcagcctgatgtt
                                     1▶ M F
57  cgacctgagcttgaatttctctcaaagcgcgcacagcggcagcagcagcagcagctgg
2▶  D L S L N F S Q S A H S A S E Q Q L
113  gggcggcgcggcggcggggaacctgtccctgtcgtggtggataaggatttgat
21▶ G G G A A A G N L S L S L V D K D L D
169  tcgttcagcagggcagcctgggctcccacttcgagttccccgactactgcacgcc
40▶ S F S E G S L G S H F E F P D Y C T P
225  ggagctgagcagatgatcgcggggactggctggaggcgaacttctccgacctgg
58▶ E L S E M I A G D W L E A N F S D L
281  tgttcacatattgaaaggcggcggcgtcgtcgtctttctcggagggtgcagagc
77▶ V F T Y
337  tgggttccttgggaggaagttgtagtggatgatgatgatgatgataatgatgat
393  gatgatggtggtggtgatggtggcgggtagggaggaggaggagagaagaagatgc
449  tgatgatattgataagatgctgtgacgcaagaattggaaaacatga

```

Abbildung III-4a: Sequenz von cDNA II-alpha-89

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
gi 30581115 ref NM_003108.3 Homo sapiens SRY (sex determin...	644	0.0
gi 22297035 gb AC108025.4 Homo sapiens BAC clone RP11-38F5...	644	0.0
gi 6527111 dbj AB028641.1 Homo sapiens mRNA for SOX11, com...	644	0.0
gi 12848833 dbj AK012222.1 Mus musculus 11 days embryo who...	84	2e-13

Abbildung III-4b: Hochsignifikante BLAST-Suchergebnisse zu II-alpha-89

1: AB028641. Homo sapiens mRNA...[gi:6527111] [Links](#)

LOCUS AB028641 8743 bp mRNA linear PRI 07-DEC-1999
 DEFINITION Homo sapiens mRNA for SOX11, complete cds.
 ACCESSION AB028641
 VERSION AB028641.1 GI:6527111
 KEYWORDS SOX11.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (sites)
 AUTHORS Azuma,T., Ao,S., Saito,Y., Yano,K., Seki,N., Wakao,H., Masuho,Y.
 and Muramatsu,M.
 TITLE Human SOX11, an upregulated gene during the neural differentiation,
 has a long 3' untranslated region
 JOURNAL DNA Res. 6 (5), 357-360 (1999)
 MEDLINE [20039622](#)
 PUBMED [10574465](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 8743)
 AUTHORS Azuma,T., Ao,S., Yano,K., Saito,Y., Wakao,H., Seki,N., Masuho,Y.
 and Muramatsu,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (08-JUN-1999) Takanori Azuma, Helix Research Institute,
 Biological Technology Laboratory; 1532-3 Yana, Kisarazu, Chiba
 292-0812, Japan (E-mail:azuma@hri.co.jp,
 Tel:+81-438-52-3951(ex.5631), Fax:+81-438-52-3952)

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..8743
 /organism="Homo sapiens"

```
/mol_type="mRNA"  
/db_xref="taxon:9606"  
/chromosome="2"  
/map="2p25.3"  
/cell_line="Ntera-2 RA"  
/cell_type="neuroepithelial cells"  
/note="induced with retinoic acid for 5 weeks"  
gene 1..8743  
/gene="sox11"  
CDS 56..1381  
/gene="sox11"  
/codon_start=1  
/product="SOX11"  
/protein_id="BAA88122.1"  
/db_xref="GI:6527112"  
  
(.....)
```

Abbildung III-4c: Ein Datenbank-Eintrag zu II-alpha-89

II-delta-76

```

1 tttttgatcagtttggtgaatacattgctcgttgctactgttccaaccattggt
58 aaaaaaaaaatagttaccttttgcctttggatgctcatgtctaaacttggaaaata
115 agtcattgccccttttagagaatgtttgtgtagtccaaagattgtgagctccatag
172 tatgaaaatcaagtacttttgcacatgcaatagcagtttcaagtgaatattataa
229 ttaatcttttcaagtagatcaaaaattcctaactgattaataaagtattttatca
286 atatatcatccccctttcagagagaagtcaccagaagagacagcacacttagcaatt
343 gccctcattattaaaggcctaggtgagtgccataaaggccatagcagattatggtt
400 caaggtaacattacctaaccctgtgtgggttaaaaacagtgagcagagattaccc
457 actgcaacgagactcgggccagagactgtgctggcgacacagtgagactctg
514 tctcaaaaataaataaataagtaaatagaacctcctgagctaccctggctataagga
571 ttcagattactttaggaatttagcattagcactaggagggggagagatggctggca
628 aaacttctagctagcaacctatgcttagcacatgggtaactaacatagcgagatcc
1 M S S T W V T N H S E I
685 tgaacacatatcctctaggtgcaggtggagggaacgatgtccaatacctgaagcaga
13 L N T Y P L G A G G G N D V Q Y L K Q
742 atctcacatggacggaacgtctgtatttccctcctcctgcacgaatcactcatctc
32 N L T W T E R L Y F P L L H E S L I I
799 ttggaggccttctctgacattcctcttttctctcctccctccctgcctttgtct
51 L G G L L C I P P F L L S P P L P F V
856 ttctaaagagctgaactccgatttccatgctctcctgctacattaataagcaaaa
70 F S K E S E L R F P C S P A T L I S K
913 cctgctgtgtgtacggttcttactggaacatgactttttgttctgtattggtt
89 T C L C V R F F T G N M T F C F C I G
970 ttactgtcatccagttttctagtttaatatctagcaaaactaaatctgaatgtactc
108 F T V I Q F S S L I S S K T K S E C T
1027 gctttttccgtaagatgccaagcactcgggtgaaaggcttgactcaaacaggaa
127 R F F R
1084 gtcttgctggaattcgtctctgaacacttgaaaaacagaaacctgagcgcgaacaa
1141 acatgcctctgtgtgctgggattgcctttgtctctgcttccatgtggcttttcctt
1198 tgtagctatgcttagtgacataatcttccctcttctagccttctcctttcaagcctg
1255 tctgttaattaaccatgtcagatt

```

Abbildung III-5a: Sequenz von cDNA II-delta-76

Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(bits)	Value
gi 8218056 emb AL023583.25 HS500L14 Human DNA sequence from...	1269	0.0
gi 10439797 dbj AK026843.1 Homo sapiens cDNA: FLJ23190 fis...	1269	0.0

Abbildung III-5b: Hochsignifikante BLAST-Suchergebnisse zu II-delta-76

1: AK026843. Homo sapiens cDNA...[gi:10439797] [Links](#)

LOCUS AK026843 2124 bp mRNA linear PRI 29-SEP-2000
DEFINITION Homo sapiens cDNA: FLJ23190 fis, clone LNG12190.
ACCESSION AK026843
VERSION AK026843.1 GI:10439797
KEYWORDS oligo capping; fis (full insert sequence).
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (sites)
AUTHORS Kawakami,T., Noguchi,S., Itoh,T., Shigeta,K., Senba,T.,
Matsumura,K., Nakajima,Y., Mizuno,T., Morinaga,M., Tanigami,A.,
Fujiwara,T., Ono,T., Yamada,K., Fujii,Y., Ozaki,K., Hirao,M.,
Ohmori,Y., Ota,T., Suzuki,Y., Obayashi,M., Nishi,T., Shibahara,T.,
Tanaka,T., Nakamura,Y., Isogai,T. and Sugano,S.
TITLE NEDO human cDNA sequencing project
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 2124)
AUTHORS Sugano,S., Suzuki,Y., Ota,T., Obayashi,M., Nishi,T., Isogai,T.,
Shibahara,T., Tanaka,T. and Nakamura,Y.

TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (29-AUG-2000) Sumio Sugano, Institute of Medical Science,
University of Tokyo, Laboratory of Genome Structure Analysis, Human
Genome Center; Shirokane-dai, 4-6-1, Minato-ku, Tokyo 108-8639,
Japan (E-mail:cdna1@ims.u-tokyo.ac.jp, Tel:81-3-5449-5286,
Fax:81-3-5449-5416)
COMMENT NEDO human cDNA sequencing project supported by Ministry of
International Trade and Industry of Japan; cDNA full insert
sequencing: Research Association for Biotechnology; cDNA library
construction, 5'- & 3'-end one pass sequencing: Department of
Virology and Human Genome Center, Institute of Medical Science,
University of Tokyo (partly supported by Science and Technology
Agency).
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..2124
/organism="Homo sapiens"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9606"
/clone="LNG12190"
/tissue_type="human lung"
/clone_lib="LNG"
/note="cloning vector pME18SFL3" (...)

Abbildung III-5c: Ein Datenbank-Eintrag zu II-delta-76

III-delta-55

```

1  tgcaaggacactcctgggtttattgtgaaccgcctcctggttcatacctcatg
                                     1 M
55  gaagcaatcaggctgtatgaacgaggtgacgcatccaaagaagacattgacact
2  E A I R L Y E R G D A S K E D I D T
109 gctatgaaattaggagccggttaccctatgggccatttgagcttctagattat
20  A M K L G A G Y P M G P F E L L D Y
163 gtcggactggatactacgaagttcatcgtggatgggtggcatgaaatggatgca
38  V G L D T T K F I V D G W H E M D A
217 gagaaccattacatcagcccagccatccttaataagctggtagcagagaac
56  E N P L H Q P S P S L N K L V A E N
271 aagttcggcaagaagactggagaaggattttacaatacaagtgatgtgcagct
74  K F G K K T G E G F Y K Y K
325 tctccggctctgagaagaacacctgagagcgctttccagccagtgccccgagtg
379 cctgtgggaatgctctttggtcagacattccctcacacagtacagtttaataaa
433 tgtgcattttgattgtaattctatcgaagtgattattaccaggttacagcagta
487 atagattctccattaagaataattcccttttttagtctgttcatttctgtgta
541 ttttctaacagctttacacccttgggtccttgagcaaacatgttttttgaac
595 cttgtcatttttgaagaattgcctagattccttctctcatcaacgggaaagt
649 acttctctgagagtgagtgaccatgctcactgttctgctgctgggagagtc
703 acaagccactggcaagc

```

Abbildung III-6a: Sequenz von cDNA III-delta-55

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 4885386 ref NM_005327.1 Homo sapiens L-3-hydroxyacyl-Co...	1334	0.0
gi 1483510 emb X96752.1 HSSCHAD H.sapiens mRNA for L-3-hydr...	1334	0.0
gi 2078326 gb AF001902.1 HSAF001902 Human 3-hydroxyacyl-CoA...	1334	0.0
gi 21755399 dbj AK096018.1 Homo sapiens cDNA FLJ38699 fis,...	1334	0.0
gi 21307584 gb AC118062.4 Homo sapiens BAC clone RP11-637E...	1294	0.0
gi 4263637 gb AC004059.2 AC004059 Homo sapiens chromosome 4...	1294	0.0
gi 4240476 gb AF095703.1 AF095703 Homo sapiens short chain ...	1287	0.0
gi 2078328 gb AF001903.1 HSAF001903 Human 3-hydroxyacyl-CoA...	1277	0.0

Abbildung III-6b: Hochsignifikante BLAST-Suchergebnisse zu III-delta-55

1: X96752. H.sapiens mRNA fo...[gi:1483510] [Links](#)

LOCUS HSSCHAD 1877 bp mRNA linear PRI 06-AUG-1996
DEFINITION H.sapiens mRNA for L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase.
ACCESSION X96752
VERSION X96752.1 GI:1483510
KEYWORDS 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; SCHAD gene.
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1
AUTHORS Vredendaal,P.J., van den Berg,I.E., Malingre,H.E., Stroobants,A.K.,
Olde Weghuis,D.E. and Berger,R.
TITLE Human short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: cloning and
characterization of the coding sequence
JOURNAL Biochem. Biophys. Res. Commun. 223 (3), 718-723 (1996)
MEDLINE [96268746](#)
PUBMED [8687463](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1877)
AUTHORS Vredendaal,P.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (21-MAR-1996) P. Vredendaal, Department for Metabolic

Diseases, Wilhelmina Childrens Hospital, P.O.Box 18009, 3501 CA
Utrecht, NETHERLANDS
REMARK Revised by author 25-APR-96
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1877
/organism="Homo sapiens"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9606"
/clone="HLSCHAD3"
/tissue_type="liver"
/clone_lib="lambda ZAP"
[gene](#) 1..1877
/gene="SCHAD"
[5'UTR](#) 1..87
/gene="SCHAD"
[CDS](#) 88..1032
/gene="SCHAD"
/EC_number="[1.1.1.35](#)"
/codon_start=1
/product="3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase"
/protein_id="[CAA65528.1](#)"
/db_xref="GI:1483511"
/db_xref="SWISS-PROT:Q16836" (...)

Abbildung III-6c: Ein Datenbank-Eintrag zu III-delta-55

II-beta-47

```

1 tttttaagaacctacaactattttatggagaacaagcagccccgaggatgatctttttg
1 M E N K Q P E D D L F
58 atagactcaatactgggtattctgaataagcatcttcaggatctcatggagggttga
12 D R L N T G I L N K H L Q D L M E G L
115 cagccaaggtattccgtacatacaaatgcctccatcacgctacagcagcagctaaaag
31 T A K V F R T Y N A S I T L Q Q Q L K
172 aactgacagccccggatgagaacatcccagcgaagatcctttcttataaccgtgccca
50 E L T A P D E N I P A K I L S Y N R A
229 atcgagctgttgcaattctttgtaaccatcagagggcaccacaaaaacttttgaga
69 N R A V A I L C N H Q R A P P K T F E
286 agtctatgatgaacttgcaactaagattgatgccaagaaggaacagctagcagatg
88 K S M M N L Q T K I D A K K E Q L A D
343 cccggagagacctgaaaagtgcctaggctgatgccaaggtcatgaaggatgcaaaaga
107 A R R D L K S A K A D A K V M K D A K
400 cgaagaaggtagtagagtcaaagaagaaggctgttcagagactggaggaacagttga
126 T K K V V E S K K K A V Q R L E E Q L
457 tgaagctggaagttcaagccacagaccgagaggaataaacagattgccctgggaa
145 M K L E V Q A T D R E E N K Q I A L G
514 cctcaaaactcaattatctggaccctagatcacagtggcttggcaagaagtggg
164 T S K L N Y L D P R I T V A W C K K W
571 gtgtcccaattgagaagatttacaacaaaaccagcgggagaagtttgctgggcca
183 G V P I E K I Y N K T Q R E K F A W A
628 ttgacatggctgatgaagactatgagttttagccagttcctcaagagggcagagttctgt
202 I D M A D E D Y E F
685 gaagaggaacagtggtgttgggaagatggataaactgagcctcacttgcctcgt
742 gcctgggg

```

Abbildung III-7a: Sequenz von cDNA II-beta-47

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 19913404 ref NM_003286.2 Homo sapiens topoisomerase (DN...	769	0.0
gi 12803011 gb BC000943.2 BC000943 Homo sapiens, clone IMAG...	769	0.0
gi 11345540 emb AL022394.3 HS511B24 Human DNA sequence from...	769	0.0

Abbildung III-7b: Hochsignifikante BLAST-Suchergebnisse zu II-beta-47

1: NM_003286. Homo sapiens topo...[gi:19913404] [Links](#)

LOCUS TOP1 3734 bp mRNA linear PRI 05-APR-2003

DEFINITION Homo sapiens topoisomerase (DNA) I (TOP1), mRNA.

ACCESSION NM_003286

VERSION NM_003286.2 GI:19913404

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 3734)

AUTHORS Staker,B.L., Hjerrild,K., Feese,M.D., Behnke,C.A., Burgin,A.B. Jr.

and Stewart,L.

TITLE The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog

JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (24), 15387-15392 (2002)

MEDLINE [22342671](#)

PUBMED [12426403](#)

(.....)

COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [M60688.1](#).

On Apr 3, 2002 this sequence version replaced gi:[11225259](#).

Summary: This gene encodes a DNA topoisomerase, an enzyme that

controls and alters the topologic states of DNA during transcription. This enzyme catalyzes the transient breaking and rejoining of a single strand of DNA which allows the strands to pass through one another, thus altering the topology of DNA. This gene is localized to chromosome 20 and has pseudogenes which reside on chromosomes 1 and 22.

COMPLETENESS: full length.

```

FEATURES             Location/Qualifiers
source               1..3734
                    /organism="Homo sapiens"
                    /mol_type="mRNA"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /chromosome="20"
                    /map="20q12-q13.1"
gene                1..3734
                    /gene="TOP1"
                    /note="synonym: TOPI"
                    /db_xref="LocusID:7150"
                    /db_xref="MIM:126420"
misc feature        1
                    /gene="TOP1"
                    /note="5' most of multiple alternative transcription
                    initiation sites"
                    /evidence=experimental
CDS                 247..2544
                    /gene="TOP1"
                    /EC_number="5.99.1.2"
                    /note="type I DNA topoisomerase"
                    /codon_start=1
                    /product="DNA topoisomerase I"
                    /protein_id="NP_003277.1"
                    /db_xref="GI:11225260"
                    /db_xref="LocusID:7150"

                    /db_xref="MIM:126420"(.....)

```

Abbildung III-7c: Ein Datenbank-Eintrag zu II-beta-47

II-gamma-52

```

1 CACGAGGGTGGAGAGCATCCAGCAGAGTGCCTCTGAAATCTCATACTGCTTGCAAAAGAGGTAGAACCAAG
72 CAGGCCTACCACGGAATGGAAAACCAAGACCACCATTTCTTCTCTGCCTTTAAGCATTATATAAATCA
143 CGTTCCTCCTTATTATGTATATAGCTGCCACATTTTGTCTTCTTTCGGTATTGTTGCATACCCAATTTT
214 TTTCTTAGGAAACAGCTTAATTTTCAACACCAGTTTCCCAGACACTCTCCAGCCACATCAGAAGCCTT
285 CAAAACACAACACATGGCCAGGCGCGGTGGCTCACGCCTATAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGG
356 TGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAACGTGGTGAACCTCATCTACTAAAAATA
427 CAAACAAATTAGCTGGGCGTGGAGGCGTGCCTGTGGTCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAAGAGAAT
498 CGCTTGA

```

Abbildung III-8a: Sequenz cDNA II-gamma-52

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 21686931 gb AC090149.6 Homo sapiens chromosome 8, clone...	815	0.0
gi 19774534 gb AC090575.11 Homo sapiens chromosome 8, clon...	815	0.0
gi 19172907 gb AC037450.6 Homo sapiens chromosome 8, clone...	815	0.0
gi 14625532 emb AL159171.15 Human DNA sequence from clone ...	280	2e-72
gi 21747432 gb AC010519.8 Homo sapiens chromosome 19 clone...	274	1e-70

Abbildung III-8b: Hochsignifikante BLAST-Suchergebnisse zu II-gamma-52

1: AC090149. Homo sapiens chro...[gi:21686931] [Links](#)

```

LOCUS   AC090149      159476 bp  DNA  linear  PRI 03-JUL-2002
DEFINITION Homo sapiens chromosome 8, clone RP11-429M12, complete sequence.
ACCESSION AC090149
VERSION   AC090149.6 GI:21686931
KEYWORDS  HTG.
SOURCE    Homo sapiens (human)
  ORGANISM Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 159476)
  AUTHORS  Birren,B., Nusbaum,C. and Lander,E.
  TITLE    Homo sapiens chromosome 8, clone RP11-429M12
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 159476)
  AUTHORS  (...)

```

Only the first 159.5 kb of this clone are being submitted.
The remainder overlaps accession number AC037450 [WICGR project L9441].

```

FEATURES             Location/Qualifiers
  source              1..159476
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="8"
                     /map="8"
                     /clone="RP11-429M12"
                     /clone_lib="RPC1-11 Human Male BAC"
  (...)

```

Abbildung III-8c: Ein Datenbank-Eintrag zu II-gamma-52

III-beta-36

```

1 ccgagccccagccccggccgcatggacgacaaggcggtcaccaaggagctggacca
1 M D D K A F T K E L D Q
57 gtgggtcgagcagctgaacgagtgtgtaagcagctgaacgagaaccaagtcggagcg
12 W V E Q L N E C K Q L N E N Q V R T
113 tgtgcgagaaggcaaaagaaatTTTaaacaaagaatcaaatgtgcaagaggttcgt
31 L C E K A K E I L T K E S N V Q E V R
169 tgcctgttactgtctgtggagatgtgcatggtcaatttcagatcttatggaact
50 C P V T V C G D V H G Q F H D L M E L
225 ctttagaattggggaaaatcaccggatacaactacttattcatgggtgactatg
68 F R I G G K S P D T N Y L F M G D Y
281 tagacagaggatattttagtgaggactgtgactcttctgtagcattaaaggtg
87 V D R G Y Y S V E T V T L L V A L K V
337 cgttatccagaacgattacaatattgagaggaaatcacgaaagccgacaattac
106 R Y P E R I T I L R G N H E S R Q I T
393 ccaagtatatggcttttatgatgaatgtctgcaagatgggaatgccaacgttt
124 Q V Y G F Y D E C L R K Y G N A N V
449 ggaatattttacagatctctttgattatcttccacttacagcttagtagatgga
143 W K Y F T D L F D Y L P L T A L V D G
505 cagatattctgcctccatgggtgcctctccatccatagacacactggatcatat
162 Q I F C L H G G L S P S I D T L D H I
561 aagagccctggatcgtttacaggaagttccacatgagggccaatgtgtgatctgt
180 R A L D R L Q E V P H E G P M C D L
617 tatggtcagatccagatgatcgtgggtggatgggtatttcaccacgtgggtgctggc
199 L W S D P D D R G G W G I S P R G A G
673 tacacattggacaagacatttctgaaacctttaaccatgccaatgggtctcacact
218 Y T F G Q D I S E T F N H A N G L T L
729 ggtttctcgtgccaccagcttgaatggagggatacaattgggtgatgatcgga
236 V S R A H Q L V M E G Y N W C H D R
785 atgtggttaccattttcagtgacccaattactgttatcgttggggaaccaggct
255 N V V T I F S A P N Y C Y R C G N Q A
841 gctatcatggaattagatgacactttaaatattccttcttcaatttgaccggc
274 A I M E L D D T L K Y S F L Q F D P A
897 gcctcgtcgtggtagcctcatgttacacggcgcacccagactacttcctataaa
292 P R R G E P H V T R R T P D Y F L
953 tttctcctgggaaacctgcctttgtatgtggaagtatacctggctttttaaataat
1009 atgtattttaaacaacaaagcaacagtaactatgtgtttctgtaacaaat

```

Abbildung III-9a: Sequenz von cDNA III-beta-36

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 8748928 gb AC009314.4 Homo sapiens BAC clone RP11-465K4...	1150	0.0
gi 190225 gb M60484.1 HUMPP2AB Human protein phosphatase 2A...	1150	0.0
gi 21750344 dbj AK091875.1 Homo sapiens cDNA FLJ34556 fis,...	1150	0.0
gi 15080564 gb BC012022.1 BC012022 Homo sapiens, Similar to...	1110	0.0
gi 4758951 ref NM_004156.1 Homo sapiens protein phosphatas...	1070	0.0
gi 35580 emb X12656.1 HSP2A Human mRNA for protein phospho...	1070	0.0

Abbildung III-9b: Hochsignifikante BLAST-Suchergebnisse zu III-beta-36

1: NM_004156. Homo sapiens prot...[gi:4758951] [Links](#)

LOCUS PPP2CB 1541 bp mRNA linear PRI 07-APR-2003
DEFINITION Homo sapiens protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform (PPP2CB), mRNA.
ACCESSION NM_004156
VERSION NM_004156.1 GI:4758951
KEYWORDS .
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1541)
AUTHORS Zhou,J., Pham,H.T., Ruediger,R. and Walter,G.
TITLE Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of
protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit
interaction, and evolution
JOURNAL Biochem. J. 369 (Pt 2), 387-398 (2003)
MEDLINE [22399521](#)
PUBMED [12370081](#)
REMARK GeneRIF: Results describe the cell cycle expression, subcellular
distribution, and metabolic stability of protein phosphatase 2Abeta
in comparison with 2Aalpha.

(...)

COMMENT PROVISIONAL [REFSEQ](#): This record has not yet been subject to final
NCBI review. The reference sequence was derived from [X12656.1](#).

FEATURES Location/Qualifiers

source	1..1541
	/organism="Homo sapiens"
	/mol_type="mRNA"
	/db_xref="taxon:9606"
	/chromosome="8"
	/map="8p12-p11.2"
	/cell_type="fibroblast"
gene	1..1541
	/gene="PPP2CB"
	/note="synonym: PP2CB"
	/db_xref="LocusID: 5516 "
	/db_xref="MIM: 176916 "
CDS	22..951
	/gene="PPP2CB"
	/EC_number=" 3.1.3.16 "
	/codon_start=1
	/product="protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform"
	/protein_id=" NP_004147.1 "
	/db_xref="GI:4758952"
	/db_xref="LocusID: 5516 "
	/db_xref="MIM: 176916 " (...)

Abbildung III-9c: Ein Datenbank-Eintrag zu III-beta-36

II-lambda-23

```

1  gtgatactggatgagatgacccttcggcacatgggttcaggattgcactgctgtaaaa
1▶ M T L R H M V Q D C T A V K
58  actcagttactcaactgaaacgtctcctgcatcagcatgatggaagtgggttcattg
15▶ T Q L L K L K R L L H Q H D G S G S L
115 catgatattcaactgtcattgccatccagtcacagaaccagaagatgggtgataaagta
34▶ H D I Q L S L P S S P E P E D G D K V
172 tataagaatgaagatttataatgaaataaaacaacttaagacgaaataaagaaa
53▶ Y K N E D L L N E I K Q L K D E I K K
229 aaagatgaaagatccaactattagaacttcagcttgcaactcagcatatctgccac
72▶ K D E K I Q L L E L Q L A T Q H I C H
286 caaaaatgtaaagaggaaaaatgcacttatgctgataaatatacccaaacaccctgg
91▶ Q K C K E E K C T Y A D K Y T Q T P W
343 agacgaattcctgggtggtattctgctcctcctctcctctggcagggtcctctt
110▶ R R I P G G Y S A P S F S P W Q G S F
400 cagggatcccacggactgttcacgcacgcagacagacctcaagtactacagcc
129▶ Q G I P R T V P P H R R Q T S S T T A
457 ttccagcagcctcccagaccacagatcacaccagggaactaataaagccaca
148▶ F Q Q P S Q T H R S H P G K T N K A T
514 acgtatcgaggcccgagtgatgctcaatccaagacatgcatcagggcgggtcaca
167▶ T Y R G P Q
571 tccggaagaaagctttacacacgtcttcaccaagaagcaactatggtttgaaga
628 gcagcctttttcatcagggccacaaatcaaatggatgtggctaaagatcaccttc
685 tgaagcaacttaaacattactgtaaatgctcaagagccttatcatttggcaaacaa
742 tcaattagtgacatgcagtttatacccaacttctcctcagacacctcccgagtcaag
799 tacagttagaccaggctaagagagttggaagaatcagctccgccagtggttatat
856 gtctagcccaagtccttcagccttttaagccatcatattgagttctttgtgtacc
913 gcctccagtttctgaatca

```

Abbildung III-10a: Sequenz von cDNA II-lambda-23

Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(bits)	Value
gi 18088656 gb BC020910.1 Homo sapiens, clone IMAGE:473226...	969	0.0
gi 9795038 emb AL356115.9 Human DNA sequence from clone RP...	963	0.0
gi 24308130 ref NM_018999.1 Homo sapiens KIAA1128 protein ...	961	0.0

Abbildung III-10b: Hochsignifikante BLAST-Suchergebnisse zu II-lambda-23

1: NM_018999. Homo sapiens KIAA...[gi:24308130] [Links](#)

LOCUS KIAA1128 7248 bp mRNA linear PRI 07-MAY-2003
DEFINITION Homo sapiens KIAA1128 protein (KIAA1128), mRNA.
ACCESSION NM_018999
VERSION NM_018999.1 GI:24308130
KEYWORDS .
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 7248)
AUTHORS Hirosawa,M., Nagase,T., Ishikawa,K., Kikuno,R., Nomura,N. and Ohara,O.
TITLE Characterization of cDNA clones selected by the GeneMark analysis from size-fractionated cDNA libraries from human brain
JOURNAL DNA Res. 6 (5), 329-336 (1999)
MEDLINE [20039618](#)
PUBMED [10574461](#)
COMMENT PREDICTED [REFSEQ](#): The mRNA record is supported by experimental evidence; however, the coding sequence is predicted. The reference

sequence was derived from [AF241785.1](#).

```
FEATURES             Location/Qualifiers
source               1..7248
                    /organism="Homo sapiens"
                    /mol_type="mRNA"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /chromosome="10"
                    /map="10q23.2"
gene                 1..7248
                    /gene="KIAA1128"
                    /db_xref="LocusID:54462"
CDS                  553..2253
                    /gene="KIAA1128"
                    /codon_start=1
                    /product="KIAA1128 protein"
                    /protein_id="NP_061872.1"
                    /db_xref="GI:24308131"
                    /db_xref="LocusID:54462" (...)
```

Abbildung III-10c: Ein Datenbank-Eintrag zu II-lambda-23

III-alpha-65

Abbildung III-11a: Sequenz cDNA III-alpha-65

Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(bits)	Value
gi 13929472 ref NM_001788.2 Homo sapiens CDC10 cell divisi...	1003	0.0
gi 560622 gb S72008.1 S72008 hCDC10=CDC10 homolog [human, f...	1003	0.0
gi 18490882 gb BC022442.1 Homo sapiens, Similar to CDC10 c...	1001	0.0
gi 4914613 emb AL050392.1 HSM800547 Homo sapiens mRNA; cDNA...	924	0.0
gi 19684120 gb BC025987.1 Homo sapiens, CDC10 cell divisio...	872	0.0

Abbildung III-11b: Hochsignifikante BLAST-Suchergebnisse zu III-alpha-65

1: BC025987. Homo sapiens, CDC...[gi:19684120] [Links](#)

LOCUS BC025987 2333 bp mRNA linear PRI 22-MAR-2002
 DEFINITION Homo sapiens, CDC10 cell division cycle 10 homolog (S. cerevisiae), clone MGC:25988 IMAGE:4823810, mRNA, complete cds.
 ACCESSION BC025987
 VERSION BC025987.1 GI:19684120
 KEYWORDS MGC.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2333)
 AUTHORS Strausberg,R.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-MAR-2002) National Institutes of Health, Mammalian Gene Collection (MGC), Cancer Genomics Office, National Cancer Institute, 31 Center Drive, Room 11A03, Bethesda, MD 20892-2590, USA
 REMARK NIH-MGC Project URL: <http://mgc.nci.nih.gov>
 COMMENT Contact: MGC help desk
 Email: cgapbs-r@mail.nih.gov
 Tissue Procurement: Miklos Palkovits, M.D., Ph.D.
 cDNA Library Preparation: Michael J. Brownstein (NHGRI) & Shiraki Toshiyuki and Piero Carninci (RIKEN)
 cDNA Library Arrayed by: The I.M.A.G.E. Consortium (LLNL)
 DNA Sequencing by: Institute for Systems Biology
<http://www.systemsbiology.org>
 contact: amadan@systemsbiology.org
 Anup Madan, Jessica Fahey, Erin Helton, Mark Kettelman, Anuradha Madan, Stephanie Rodrigues, Amy Sanchez and Michelle Whiting

 Clone distribution: MGC clone distribution information can be found through the I.M.A.G.E. Consortium/LLNL at: <http://image.llnl.gov>
 Series: IRAK Plate: 33 Row: g Column: 20
 This clone was selected for full length sequencing because it passed the following selection criteria: matched mRNA gi: 13929472.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..2333
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="mRNA"

```
/db_xref="LocusID:989"  
/db_xref="taxon:9606"  
/clone="MGC:25988 IMAGE:4823810"  
/tissue_type="Testis"  
/clone_lib="NIH_MGC_97"  
/lab_host="DH10B"  
/note="Vector: pBluescript"  
CDS    54..1307  
/codon_start=1  
/product="CDC10 cell division cycle 10 homolog (S.  
cerevisiae)"  
/protein_id="AAH25987.1"  
  
/db_xref="GI:19684121"
```

(...)

Abbildung III-11c: Ein Datenbank-Eintrag zu III-alpha-65

III-alpha-56

```

1  CACGAGGCAAGGGATGACCTTCTATGTTATGGCTACATGGCTGTGATAACAGGTGGAGTTATGCCTG
71  TGCTCTAAACTTGCTGAGTCATGCAGGCCTGGACATCTGCCTAGGCATGTTCTTGACCAAAGCACATCC
141  ATGTACTTTACAATATGGTACCAAAAAAGAGTGAAACCACCTCAATAATATTTTCATGTTGATTCCA
211  TGTGAAATAACATTTGGGTATATTGGTTAAATACATATTATTGGCCAGGCTTGGTGGCTCACGCGTGT
281  AGTCCCAGCAGTTGGGATGCCAAAGCGGGTGGTACCTGAGGTCAGGAGTTGAGACCAGCCTGGCC
351  AACATGGTGAAACCCCGTCTACTTAAAAA

```

Abbildung III-12a: Sequenz cDNA III-alpha-56

Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(bits)	Value
gi 11190488 emb AL139100.9 Human DNA sequence from clone R...	674	0.0
gi 12061558 gb AC019233.7 AC019233 Homo sapiens clone RP11-...	180	1e-42
gi 26190551 gb AC132936.9 Homo sapiens chromosome 11, clon...	172	3e-40

Abbildung III-12b: Hochsignifikante BLAST-Suchergebnisse zu III-alpha-56

1: AL139100. Human DNA sequenc...[gi:11190488] [Links](#)

LOCUS AL139100 115968 bp DNA linear PRI 15-NOV-2000
DEFINITION Human DNA sequence from clone RP3-375P9 on chromosome 6, complete
sequence.
ACCESSION AL139100
VERSION AL139100.9 GI:11190488
KEYWORDS HTG.
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 115968)
AUTHORS Ramsay,H.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (15-NOV-2000) Sanger Centre, Hinxton, Cambridgeshire,
CB10 1SA, UK. E-mail enquiries: humquery@sanger.ac.uk Clone
requests: clonerequest@sanger.ac.uk
COMMENT On Nov 16, 2000 this sequence version replaced gi:[11061933](#).
During sequence assembly data is compared from overlapping clones.
Where differences are found these are annotated as variations
together with a note of the overlapping clone name. Note that the
variation annotation may not be found in the sequence submission
corresponding to the overlapping clone, as we submit sequences with
only a small overlap as described above.
This sequence has been finished according to sequence map criteria
as follows. An attempt is made to resolve all sequencing problems,
such as compressions and repeats, but not necessarily within known
annotated human repeat sequence elements (e.g. Alu). Where the
sequence is ambiguous, there is an annotation using the 'unsure'
feature key.
The following abbreviations are used to associate primary accession
numbers given in the feature table with their source databases:
Em., EMBL; Sw., SWISSPROT; Tr., TREMBL; Wp., WORMPEP; Information
on the WORMPEP database can be found at
http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/wormpep This sequence
was generated from part of bacterial clone contigs of human
chromosome 6, constructed by the Sanger Centre Chromosome 6 Mapping

Group. Further information can be found at

<http://www.sanger.ac.uk/HGP/Chr6>

RP3-375P9 is from the library RPCI-3 constructed at the Roswell Park Cancer Institute by the group of Pieter de Jong. For further

details see <http://bacpac.med.buffalo.edu/>

VECTOR: pCYPAC2

IMPORTANT: This sequence is not the entire insert of clone

RP3-375P9 It may be shorter because we sequence overlapping sections only once, except for a 100 base overlap.

The true left end of clone RP3-375P9 is at 1 in this sequence. The true left end of clone RP3-349A12 is at 115869 in this sequence.

```
FEATURES             Location/Qualifiers
source                1..115968
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="6"
                     /clone="RP3-375P9"

                     /clone_lib="RPCI-3" (.....)
```

Abbildung III-12c: Ein Datenbank-Eintrag zu III-alpha-56

Erklärung

Hiermit bestätige ich dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Mittel und Quellen angefertigt wurde.

München im Juni 2003

Horst Wolff