



---

# Vergleichende Untersuchung der regulierten Genexpression von integrierter und episomaler HIV-1 LTR\*

\* LTR: Long Terminal Repeat  
HIV-1: Humanes Immundefizienz Virus Typ 1

---

Manja Ziegler

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

München, 28. November 2006

**Vergleichende Untersuchung der regulierten Genexpression von integrierter und episomaler HIV-1 LTR**

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)

Durchgeführt am Institut für Molekulare Virologie des GSF-Forschungszentrums  
für Umwelt und Gesundheit

vorgelegt von  
Dipl. Biol. Manja Ziegler  
aus Stuttgart Bad-Cannstatt

Gutachter:  
PD Dr. Ruth Brack-Werner  
Prof. Dr. Thomas Cremer

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Mai 2007

*Indes sie forschten, röntgten, filmten, funkten, entstand von selbst die köstlichste Erfindung: der Umweg als die kürzeste Verbindung zwischen zwei Punkten.*

Erich Kästner



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Zellkernarchitektur einer Säugetierzelle</b>	<b>2</b>
1.1.1	Kompartimente der funktionalen Zellkernarchitektur	2
1.1.2	Epigenetische Mechanismen der Transkriptionsregulation	6
1.1.3	Das CT-IC-Modell	12
<b>1.2</b>	<b>Die Genexpression von HIV-1 als Modell für eine induzierbare Genexpression</b>	<b>13</b>
1.2.1	Aufbau der HIV-1 LTR	15
1.2.2	Transkriptionsaktivierung der LTR durch das virale Protein Tat	17
1.2.3	Transkription von nicht integrierter HIV-1 DNA	23
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>26</b>
2.1.1	Puffer, Lösungen und Bakterienmedien	26
2.1.2	Reagenzien und Enzyme	28
2.1.3	Medien für eukaryotische Zellen	29
2.1.4	Verwendete Kits	30
2.1.5	Verbrauchsmaterial	31
2.1.6	Plasmide	31
2.1.7	Oligonukleotide	34
2.1.8	Antikörper	34
2.1.9	Humane Zellen/Zelllinien	35
2.1.10	Prokaryotische Zellen	35
2.1.11	Spezielle Software	35
2.1.12	Spezielle Geräte	36
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>37</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden zur Klonierung	37
2.2.2	Zellkulturtechniken und Immunfärbung	42
2.2.3	FISH	45
2.2.4	Genomische DNA-Methoden	49
2.2.5	RNA-Methoden	51
2.2.6	Real-Time PCR	51
2.2.7	Fluoreszenzmikroskopie	54
2.2.8	FACS-Analysen	54
2.2.9	ChIP-Prozedur	56

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Das „Gene Positioning System“ und dessen molekularen Bausteine</b>	<b>58</b>
3.1.1	Die fluoreszierenden Proteine als Markierung	58
3.1.2	Das Indikatorgen und seine Klonierung	60
3.1.3	Klonierung des „Gene Tags“ zur Visualisierung des Indikatorgens auf DNA-Ebene	62
3.1.4	Visualisierung von Referenzstrukturen	64
<b>3.2</b>	<b>Die Synthese des Indikatorproteins des episomalen Indikatorgens ist nur in Anwesenheit von Tat sichtbar</b>	<b>68</b>
3.2.1	Die Expression des episomalen Indikatorgens lässt sich durch Tat in PBMCs induzieren	69
3.2.2	Die Expression des episomalen Indikatorgens lässt sich durch Tat in HeLa-Zellen induzieren	71
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung der Zelllinien mit dem Indikatorgen</b>	<b>73</b>
3.3.1	Herstellung der Indikatorzelllinien (HeLa-Indi)	73
3.3.2	Charakterisierung der drei Zelllinien auf DNA-Ebene	78
3.3.3	Analyse der Transkriptionsaktivierung der drei Zelllinien auf Proteinebene	82
<b>3.4</b>	<b>Die Visualisierung des Indikatorgens ist in lebenden Zellen nur episomal möglich</b>	<b>88</b>
3.4.1	Das episomale Indikatorgen ist durch den „Gene Tag“ zu erkennen	88
3.4.2	In den Zelllinien ist kein Indikatorgen durch den „Gene Tag“ zu erkennen	89
<b>3.5</b>	<b>Das epsiomale Indikatorgen colokalisiert mit der RNA Polymerase II</b>	<b>91</b>
<b>3.6</b>	<b>Tat fördert die Elongation und das Spleißen der RNA vom episomalen und integrierten Indikatorgen</b>	<b>93</b>
3.6.1	Analyse der Transkriptionsaktivierung auf RNA-Ebene	93
3.6.2	Tat fördert indirekt das Spleißen der mRNA	96
<b>3.7</b>	<b>Bilden nicht replizierende Episomen Chromatin?</b>	<b>104</b>
3.7.1	Eine Colokalisation von H3 mit dem epsiomalen Indikatorgen kann nicht eindeutig gezeigt werden	104
3.7.2	ChIP-Analyse für das integrierte Indikatorgen	105
3.7.3	ChIP-Analyse der nicht integrierten HIV-LTR im Vergleich	108
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>111</b>
<b>4.1</b>	<b>Das GePS im Vergleich zu anderen Systemen</b>	<b>111</b>
4.1.1	Die visualisierenden Bestandteile des GePS	111
4.1.2	Andere Lebendzell-Systeme in Säugetierzellen	113
4.1.3	Das Indikatorgen und daraus entstehende Vorteile gegenüber den anderen Lebendzell-Systemen	114

<b>4.2</b>	<b>64 Operatoren und daran gebundene „Gene Tags“ reichen nicht aus, das solitäre Indikatorgen zu visualisieren</b>	<b>116</b>
4.2.1	Reduzierung des Signal/Rausch-Verhältnisses im Kern bzw. eindeutige Identifikation eines Signals	116
4.2.2	10 Kopien des Indikatorgens sieht man in einem Mikroinjektionsversuch	118
4.2.3	In der Literatur finden sich nur Tandem-Arrays mit hoher Anzahl an Operatoren	118
4.2.4	Klonierung von 256 Operatoren war in diesem LTR-System nicht möglich	119
<b>4.3</b>	<b>Das episomale Indikatorgen lässt sich in lebenden HeLa-Zellen visualisieren und bildet eine geringe Anzahl von Clustern im Kern, die transkribiert werden</b>	<b>120</b>
4.3.1	Cluster-Bildung der Episomen - ein Transfektions-Artefakt?	120
4.3.2	Die Cluster werden transkribiert	122
<b>4.4</b>	<b>Tat-abhängige Transkription und Spleißen</b>	<b>123</b>
<b>4.5</b>	<b>Funktion und Relevanz des episomalen Indikatorgens als HIV-1 basiertes Konstrukt</b>	<b>127</b>
4.5.1	Strukturelle Gemeinsamkeiten des HIV-basierten episomalen Indikatorgens und nicht integrierter HIV-1 DNA	128
4.5.2	Expression des HIV-basierten episomalen Indikatorgens und nicht integrierter HIV-1 DNA in PBMCs und HeLas	130
<b>4.6</b>	<b>Das episomale Indikatorgen bildet wahrscheinlich kein Chromatin</b>	<b>131</b>
4.6.1	ChIP und die Bindung von Histon H3 und seine Modifikationen an der HIV-1 LTR	132
4.6.2	H3 zeigt keine Colokalisation mit dem episomalen Indikatorgen	135
<b>4.7</b>	<b>Die Basisaktivität der LTR</b>	<b>137</b>
4.7.1	Einfluss des Integrationslocus auf die Basisaktivität der HIV-1 LTR	137
4.7.2	Die Zelllinien HeLa-Indi.21 und .II9 und das episomale Indikatorgen zeigen nur auf RNA-Ebene eine Basisaktivität	139
4.7.3	Einfluss des Chromatins der linearen Umgebung auf die Basisaktivität der HIV-LTR in HeLa-Indi.II9-Zellen	139
4.7.4	Einfluss der transkriptionellen Aktivierung der HIV-1 LTR durch Tat auf das linear benachbarte Gen in HeLa-Indi.II9-Zellen	140
4.7.5	Die Integrationsorte der Zelllinien HeLa-Indi.4 und HeLa-Indi.21 konnten nicht bestimmt werden	141
<b>4.8</b>	<b>Das episomale und integrierte Indikatorgen im Vergleich</b>	<b>142</b>
<b>4.9</b>	<b>Ausblick</b>	<b>144</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>146</b>

<b>6</b>	<b>Verzeichnisse</b>	<b>148</b>
6.1	Literaturverzeichnis	148
6.2	Abkürzungen	157
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>159</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>160</b>
8.1	<b>Zusätzliche Abbildungen</b>	<b>160</b>
8.1.1	Mikroinjektionsversuch	160
8.1.2	Transkriptionelle Aktivierung des benachbarten Gens RABGAP-1L	161
8.2	<b>Primer</b>	<b>161</b>
8.2.1	Primer für die Klonierungen	161
8.2.2	Primer für die gerichtete Mutagenese	162
8.2.3	Primer für die Real-Time-PCR	163
8.2.4	Primer für die LM-PCR	164
8.2.5	Primer für die analytischen PCRs	164
8.3	<b>Plasmidkarten und Sequenzen</b>	<b>164</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>167</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>168</b>



# 1 Einleitung

Das diploide Genom einer menschlichen Zelle umfasst 46 Chromosomen - 44 Autosomen und 2 Geschlechtschromosomen. Der einfache Chromosomensatz beinhaltet schätzungsweise zwischen 20.000 und 25.000 Protein-codierende Gene, die in ca. 2.900 Mb DNA enthalten sind (IHGSC 2004). Gene repräsentieren ein Viertel der genomischen Sequenz. Nur etwas mehr als 1% der Erbinformation enthält genetisch codierende Information (Exons), ein größerer Teil stellt Introns (24%) und regulierende Sequenzen dar. Wahrscheinlich wird aber auch von dem großen Anteil an nicht-codierender DNA transkribiert, wodurch nicht-protein-codierende RNAs (ncRNAs) entstehen, die möglicherweise kontrollierende Funktion bei der Entwicklung haben (Mattick 2003; Mattick 2005). Würde man die Länge der DNA-Fäden aller 46 Chromosomen eines Zellkerns addieren, erhielte man 2 m DNA. Diese DNA-Fäden sind so organisiert, dass sie in aufgewickeltem und gefaltetem Zustand in einem Zellkern von 10 µm Durchmesser Platz finden.

Bis heute ist nicht klar, wie das Zusammenspiel dieser zigtausend Gene in den verschiedenen Zelltypen eines vielzelligen Organismus funktioniert, wie benötigte Gene aktiviert und nicht benötigte in inaktivem Zustand gehalten werden. Die Genexpression wird auf verschiedenen Ebenen reguliert (van Driel, Fransz et al. 2003). Zum einen wird die Transkription auf DNA-Ebene reguliert. Durch allgemeine und gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren können Promotoren, Response-Elemente, Enhancer und Silencer gebunden und die Transkription aktiviert bzw. reprimiert werden. In anderen Fällen wird die Translation bzw. die RNA-Prozessierung reguliert. Durch Sekundärstrukturen der mRNA können sich Response-Elemente bilden, die durch Bindung von Proteinen die Translation verhindern oder fördern. Auch komplementäre RNA kann durch Interferenz (RNAi) zur Ausbildung von transkriptionell inaktivem Chromatin (Heterochromatin) beitragen. DNA-Methylierung und Histonmodifikationen (Modifikationen der DNA bindenden und verpackenden Proteine) stellen die epigenetische Regulation dar, bei der durch Anfügen/Entfernen von Acetylgruppen die Ladung des Chromatins verändert werden kann oder durch Methylgruppen DNA-Protein-Interaktionen ermöglicht werden, so dass der Verpackungsgrad und somit die Zugänglichkeit für andere Faktoren beeinflusst wird (vgl. 1.1.2). Die Regulation der Genexpression findet wahrscheinlich aber auch auf der höheren Ebene der Zellkernarchitektur statt. Möglicherweise kann durch die dreidimensionale Position eines Gens innerhalb des Kerns bzw. innerhalb eines Chromosomenterritoriums über die Aktivität eines Gens und seine Expression entschieden werden. Somit ist auch die Organisation des Kerns an sich und die topologische Lage eines Gens innerhalb eines Kerns

für die Genexpression von großer Bedeutung (Cremer and Cremer 2001; Bartova and Kozubek 2006; Cremer, Cremer et al. 2006).

Diese komplex interagierenden Ebenen verdeutlichen, dass die lineare Abfolge der Basen nur einen Teil des Reglement der Expression in einer Zelle darstellt, aber nicht ausreicht, um die Expression der vielfältigen genetischen Programme der verschiedenen Zelltypen so zu verstehen, dass man darin eingreifen könnte. Darum leisten die epigenetischen und topologischen Beschreibungen der dynamischen Veränderungen bei der Transkriptionsaktivierung einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Regulation der Genexpression in einer Zelle.

## **1.1 Zellkernarchitektur einer Säugetierzelle**

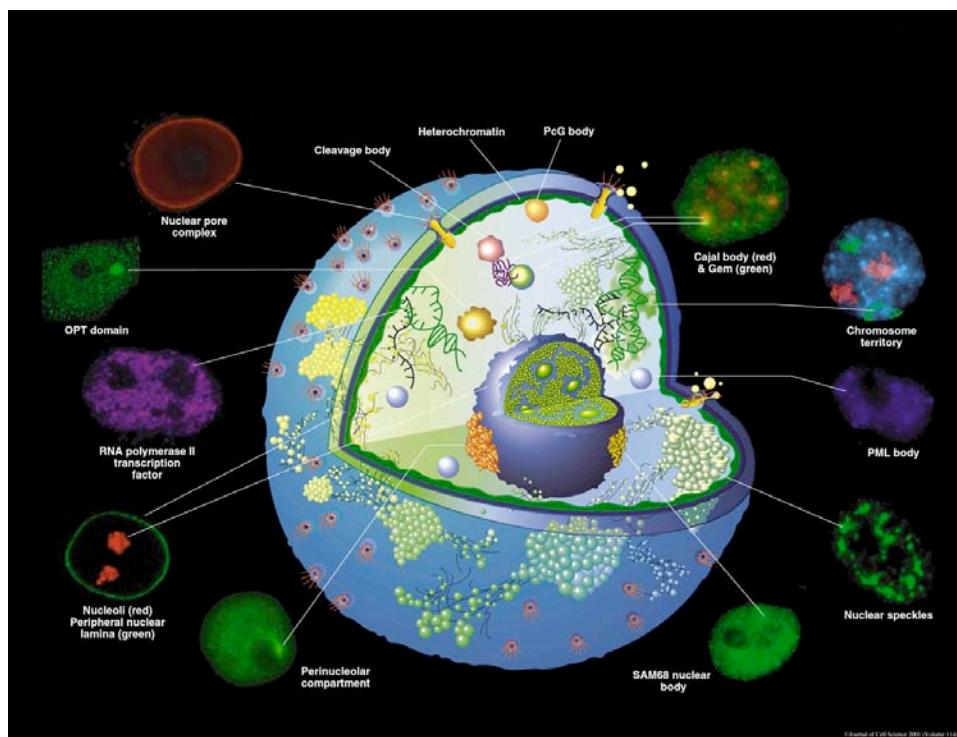
Der Zellkern einer Säugetierzelle ist ein sehr komplexes Organell mit vielen Funktionen und verschiedenen Subkompartimenten, die allerdings nicht, z.B. durch Membranen, voneinander abgegrenzt sind (Spector 2001), (Abb. 1). Er ist nicht nur Speicher für die Erbinformation, sondern auch Hauptort für DNA-Replikation, Reparatur, Transkription und DNA-Modifikationen (Spector, O'Keefe et al. 1993; Lamond and Earnshaw 1998; Misteli 2000; Dundr and Misteli 2001; Fakan 2004). Nachdem die Chromosomen nur während der Mitose in kondensiertem Zustand als abgegrenzte Strukturen zu sehen sind, stellt sich die Frage, wie die Chromosomen in dekondensiertem Zustand im Zellkern in der Interphase organisiert sind, während die Zelle transkriptionell aktiv ist und Proteine synthetisiert.

### **1.1.1 Kompartimente der funktionalen Zellkernarchitektur**

#### **Chromosomenterritorien**

Bereits Ende des 19., Anfang des 20. Jahrhunderts befassten sich C. Rabl (1885) und T. Boveri (1909) mit Vorgängen und Anordnungen der Chromosomen im Zellkern. Boveri entwickelte Rabl's Hypothese von der Kontinuität der Chromosomen im Interphasenkern zu einer Theorie der Chromosomenindividualität weiter (Cremer 1985). Erst in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts konnten experimentelle Hinweise erbracht werden, dass Chromosomen in der Interphase tatsächlich als voneinander abgegrenzte, kompakte Bereiche - sogenannte Chromosomenterritorien - vorliegen (Cremer, Cremer et al. 1982). Dies wurde später durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) bestätigt (Manuelidis 1985; Schardin, Cremer et al. 1985; Cremer, Lichter et al. 1988; Lichter, Cremer et al. 1988).

Weiterhin konnte durch FISH-Experimente gezeigt werden, dass die beiden Chromosomenarme innerhalb eines Chromosomenterritoriums eigene Domänen bilden (Dietzel, Jauch et al. 1998).



**Abbildung 1**

**Schematische Darstellung eines Interphase-Zellkerns** mit verschiedenen Organellen und Kompartimenten. Im Uhrzeigersinn sind folgende Kompartimente durch Immunofluoreszenz oder Fusion an fluoreszierende Proteine dargestellt: **Cajal Bodies** (enthalten pre-mRNA-Spleißfaktoren, beteiligt an Biogenese der snRNPs) und **Gems** (Gemini der Cajal Bodies, beteiligt an Reifung der snRNPs), **Chromosomenterritorien** (Chromosomen sind im Kern in distinkte Bereiche arrangiert), **PML Body** (das promyelotische Leukämie-Protein, aber auch SUMO1, CBP oder SP100 lokalisieren hier), **Speckles** (Lagerstätte für pre-mRNA Spleißfaktoren), **SAM68 Body** und **perinukleolares Kompartiment** (assoziiieren mit der Oberfläche von Nucleoli und spielen eine Rolle im RNA-Metabolismus), **Nucleoli** (Ort der rRNA Synthese, rRNA Prozessierung und Zusammenbau von ribosomalen Untereinheiten) und **Lamina** (beteiligt an Regulierung der Kernhüllen-Struktur und Anker für Interphasen-Chromatin), **RNA Polymerase II** (repräsentiert Orte der aktiven Transkription), **OPT Domäne** (Oct/PTF/Transkriptions Domäne enthält naszierende Transkripte und andere Transkriptionsfaktoren), **Kernporen Komplex** (dient als Transportweg zwischen Zellkern und Zytoplasma), **Cleavage Body** (enthält Faktoren, die in das Schneiden und die Polyadenylierung bei der pre-mRNA Prozessierung involviert sind, colokalisieren/überlappen sehr häufig mit Cajal Bodies), **Heterochromatin** (repräsentiert transkriptionell inaktives Chromatin), **PcG-Bodies** (enthalten Proteine der Polycomb-Gruppe und assoziieren häufig mit perizentromerem Heterochromatin). Abbildung aus (Spector 2001).

Während in Fibroblastenkernen eine hohe Variabilität an spezifischen Nachbarschaften von homologen und heterologen Chromosomenterritorien beobachtet wurde (Bolzer, Kreth et al. 2005), konnte in vielen Zelltypen eine radiale Chromatinanordnung nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Chromosomen sich im Kern anhand ihrer Gendichte anordnen, so liegen gendichte Chromosomen eher im Zentrum eines Kerns, wohingegen genarme Chromosomen eher peripher lokalisieren (Tanabe, Habermann et al. 2002; Cremer, Kupper et al. 2003; Gilbert, Gilchrist et al. 2005). Übersichtsartikel in (Pederson 2004; Foster and Bridger 2005).

Bei der Betrachtung der Architektur eines Zellkerns können also drei Bereiche unterschieden werden. Zum einen gibt es die Chromosomenterritorien. Diese bestehen aus „offenen“, höher organisierten Chromatinkompartimenten und „geschlossenen“ Chromatinkompartimenten. Gilbert *et al.* zeigten kürzlich einen Zusammenhang von „offener“ Chromatinstruktur und hoher Gendichte, nicht aber zwingender Weise zu hoher Genexpression (Gilbert and Ramsahoye 2005). Zum anderen gibt es die Interchromatindomänen (Cremer, Kurz et al. 1993; Zirbel, Mathieu et al. 1993).

### **Interchromatinkompartiment**

Eine sich dabei aufdrängende Frage entsteht in Bezug auf die Grenzen der einzelnen Chromosomenterritorien. Ob diese Grenzen strikt durch Interchromatinbereiche getrennt sind oder einen gewissen Grad an Vermischung zeigen, ist bis heute auf Grund des mikroskopischen Auflösungsvermögens und Methodik schwer zu beantworten (Williams 2003; Aten and Kanaar 2006; Cremer, Cremer et al. 2006).

Branco und Pombo entwickelten kürzlich eine neue Kombination aus hochauflösender Mikroskopie und akkurater Vielfarben-FISH und konnten damit die Vermischung der Chromosomen an den Territoriegrenzen zeigen. Die Autoren vermuten, dass sich in Lymphozyten mehr als 40% eines Chromosoms mit dem restlichen Genom vermischen und dies auch ein Zusammenhang zwischen Zellkernarchitektur und Funktion darstellt. Inhibierte man die generelle Transkription, veränderte sich auch das Verhältnis an Vermischung verschiedener Chromosomenpaare (Branco and Pombo 2006).

Während die Arbeit von Branco und Pombo eher gegen ein Interchromatinkompartiment spricht, konnte in anderen Arbeiten die Existenz eines Interchromatinbereiches gezeigt werden. Albiez *et al.* konnten in ihren Untersuchungen durch Hyper-Kondensation des Chromatins das Interchromatinkompartiment vergrößern. So wurden bereits im normalen Zustand der Zelle sichtbare Kanäle verdeutlicht, als auch andere überhaupt visualisiert. Der Interchromatinbereich konnte als ein netzartiges, strukturell distinktes Kernkompartiment

gezeigt werden. An der Oberfläche des hyper-kondensierten Chromatins wurde naszierende DNA und RNA, als auch die RNA Polymerase II beobachtet, wohingegen PML-Bodies, SC35-Speckles und Rad51 nur eine sehr geringe/geringe Überlappung mit dem Chromatin zeigten und somit im Interchromatin lokalisieren (Albiez, Cremer et al. 2006).

Bridger *et al.* war es möglich, ein interchromosomales Kompartiment zu identifizieren, indem sie das fibrillenbildende Vimentin-Protein aus *Xenopus* stabil in humane Zellen brachten. Vimentin lokalisiert bei 37°C als gesprenkeltes Muster im Kern, bildet aber bei 28°C filamentöse Aggregate, die sich ausschließlich außerhalb der Chromosomenterritorien bilden und mit nukleärer RNA, Coiled Bodies und PML Bodies colokalisieren (Bridger, Herrmann et al. 1998). Dieses Interchromatinkompartiment bildet Kanäle, die an den Kernporen beginnen und sich zwischen den Chromosomenterritorien ausbreiten und in diese hineinragen. Sie enden zwischen benachbarten ~1 Mb-Domänen bzw. den darin enthaltenen 100 kb-Chromatinschleifen. Die Kanäle beinhalten makromolekulare Komplexe für Transkription, Spleißen, DNA-Replikation und –Reparatur (Cremer, Kreth et al. 2000; Cremer and Cremer 2001; Albiez, Cremer et al. 2006) und bilden möglicherweise eine Transportstraße für Transkripte zu den Kernporen.

Kleine Proteine können durch die Chromosomenterritorien diffundieren, wohingegen makromolekulare Komplexe, wie z.B. RNA-Protein-Komplexe, auf die Interchromatindomänen beschränkt sind (Politz, Browne et al. 1998; Politz, Tuft et al. 1999; Lukacs, Haggie et al. 2000; Politz and Pederson 2000). „Offenes“ Chromatin und somit transkriptionell aktive Gene liegen an der Oberfläche der ~1 Mb-Domänen und ragen in das Interchromatinkompartiment hinein. Dadurch sind sie für Faktoren des Interchromatinkompartiments erreichbar. Dauerhaft inaktive Gene („geschlossenes“ Chromatinkompartiment) liegen im Inneren der Domänen und sind für größere Faktoren nicht zugänglich (Cremer, Kreth et al. 2000; Cremer and Cremer 2001; Albiez, Cremer et al. 2006). Dies ist mit Beobachtungen vereinbar, dass RNA an Chromatinoberflächen synthetisiert wird (Cmarko, Verschure et al. 1999; Verschure, van Der Kraan et al. 1999). Perichromatin-Fibrillen bilden die *in situ* Form der hnRNP Transkripte, mit denen die RNA Polymerase II und andere Transkriptionsfaktoren interagieren. Diesen Bereich aus expandierendem Chromatin zwischen Chromatinbereichen und Interchromatinraum bezeichnet man als Perichromatin-Region (Fakan and Bernhard 1971; Cremer, Kupper et al. 2004). Diese enthält sowohl aktiv transkribierte Gene als auch deren Transkripte (Cmarko, Verschure et al. 1999; Trentani, Testillano et al. 2003).

### 1.1.2 Epigenetische Mechanismen der Transkriptionsregulation

Russo *et al.* definierten 1996 den Begriff der Epigenetik mit „The study of mitotically and/or meiotically heritable changes in gene function that cannot be explained by changes in DNA sequence“ (Russo 1996). Zu den epigenetischen Mechanismen der Transkriptionsregulation gehören die DNA-Methylierung (Klose and Bird 2006) und Proteinkomplexe der Polycomb-Trithorax-Gruppen (Lachner, O'Sullivan *et al.* 2003; Martin and Zhang 2005).

#### Kondensation des Chromatins

Die Erbinformation einer Säugetierzelle liegt im Zellkern als Chromatin vor, das aus DNA und DNA-bindenden Proteinen besteht. Der DNA-Protein-Komplex stellt nicht nur die Stabilität gegen Nukleasen sicher, sondern nimmt auch Einfluss auf den Kondensations- bzw. Verpackungsgrad der DNA und übernimmt regulatorische Funktionen bei der Genexpression. Das Nukleosom bildet die grundlegende Verpackungseinheit des Chromatins. Der DNA-Faden windet sich über 146 bp in 1,7 superhelikalen Windungen um ein Nukleosom (Luger, Mader *et al.* 1997), ein Proteinkomplex, der aus acht Untereinheiten besteht (jeweils 2 Core-Histone H2A, H2B, H3 und H4). Das Linker-Histon H1 stabilisiert die aneinander gereihten Nukleosomen-DNA-Komplexe zwischen zwei Nukleosomen, die im Gesamten die 10 nm-Fiber bilden („beads on a string“). Die nächste Kondensationsstufe ist die 30 nm-Fiber, die aus einer aufgewickelten 10 nm-Fiber besteht (Adkins, Watts *et al.* 2004). Übergeordnete Levels der Chromatinstruktur können nur spekulativ diskutiert werden. Sie sind möglicherweise in eine Chromonema-Fiber mit 100 nm Durchmesser (Belmont and Bruce 1994; Belmont, Dietzel *et al.* 1999; Tumbar, Sudlow *et al.* 1999) oder in Schleifen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt organisiert. So geht eine Modellvorstellung von einer Chromatinrosette, ausgehend von „small-scale chromatin loops“ von 50-200 kbp aus (Munkel, Eils *et al.* 1999), wohingegen eine andere besagt, dass Chromosomenterritorien durch „giant loops“ (GL) mit einigen Mbp organisiert sind (Sachs, van den Engh *et al.* 1995; Gilbert, Boyle *et al.* 2004). Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass beide Organisationen, „small-scale loops“ und „giant loops“, eine Bedeutung bei der Chromatinorganisation haben (Kosak and Groudine 2002; Cremer, Cremer *et al.* 2006).

Konventionell werden die verschiedenen Kondensationsstufen von Chromatin im Kern als Heterochromatin und Euchromatin bezeichnet. Das stärker kondensierte Heterochromatin lässt sich weiter unterteilen, in konstitutives Heterochromatin, das repetitive Sequenzen in perizentromeren Regionen darstellt, und fakultatives Heterochromatin, das entwicklungsabhängiges Heterochromatin darstellt, welches gewebespezifische Gene enthält und die Möglichkeit besitzt in Euchromatin zu konvertieren. Das inaktivierte X-Chromosom ( $X_i$ ) stellt

ein Beispiel für fakultatives Heterochromatin dar. Das weniger stark kondensierte/lockerere Euchromatin ist Nuklease-sensitiv und darin liegende Gene werden exprimiert. Gene, die normal im Euchromatin liegen, zeigen in der Nähe von zentromerem oder telomerem konstitutivem Heterochromatin verminderte Transkriptionsaktivität. Dieser Effekt konnte in *Drosophila* (Csink and Henikoff 1996; Dernburg, Broman et al. 1996) und für das DNA-Binde-Protein Ikaros aus Maus-B-Lymphozyten gezeigt werden. Ikaros rekrutiert wahrscheinlich in der Interphase inaktive Gene zum Heterochromatin, die dadurch inaktiviert werden. In der Ruhephase  $G_0$  konnte dies nicht beobachtet werden, jedoch eine Repositionierung zu Heterochromatin nach Stimulierung der Zelle (Brown, Baxter et al. 1999).

### **DNA-Methylierung**

In menschlichen somatischen Zellen sind ungefähr 1% aller Basen 5-Methyl-Cytosine ( $m^5C$ ), das entspricht ungefähr 70-80% aller CpG-Dinukleotide des menschlichen Genoms (Ehrlich, Gama-Sosa et al. 1982). Bioinformatische Analysen schätzen, dass es 29.000 CpG-Inseln im Genom gibt (Venter, Adams et al. 2001), die häufig im 5' Bereich von Genen liegen, wobei diese selbst wenn es sich um ein nicht exprimiertes gewebsspezifisches Gen handelt auch methylierungsfrei sein können. Generell führt aber die Methylierung der DNA in Bereichen von Promotoren zur stabilen Inaktivierung der Genexpression. Daher erfolgt die *de novo* Methylierung fast ausschließlich in den Keimzellen oder im frühen Embryo durch die beiden Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B. Bei der semikonservativen Replikation der DNA kopiert die Methyltransferase DNMT1 das Methylierungsmuster vom parentalen Strang auf den neu entstehenden DNA-Strang und gibt das Methylierungsmuster so an die Tochterzellen weiter (Klose and Bird 2006). DNA-Methylierung kann auf zwei Wegen die Transkription inhibieren, zum einen direkt durch das Blockieren der Bindung von Transkriptionsfaktoren (Watt and Molloy 1988) und zum anderen indirekt durch Methyl-CpG-bindende Proteine, die Repressoren der Transkription rekrutieren (Nan, Campoy et al. 1997). DNA-Methyltransferasen sind also Repressoren der Transkription und assoziieren auch mit Chromatin-Remodeling-Enzymen. Geimann *et al.* zeigten, dass DNMT3B beispielsweise mit Histon-Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen interagiert (Geiman, Sankpal et al. 2004). Die zwei Methyltransferasen - DNA- und Histon-Methyltransferase - scheinen möglicherweise zusammen zu arbeiten. Methyl-CpG-bindende Proteine rekrutieren zum einen Chromatin-Remodeling-Enzyme, zum anderen führt Histon-Methylierung möglicherweise auch zur nachfolgenden DNA-Methylierung (Bird 2001; Peters and Schubeler 2005; Klose and Bird 2006).

## Posttranslationale Histonmodifikationen

Die Methylierung von Lysin (K) der Histone H3 und H4 gehört auch zu den längerfristigen Veränderungen des Chromatins, wodurch ein zelltypspezifisches Transkriptionsprogramm während der Entwicklung über viele Zellteilungen beibehalten werden kann. Die antagonistischen Funktionen der Polycomb- und der Trithorax-Protein-Gruppen (Pc-G und trx-G) spielen eine bedeutende Rolle bei diesem Phänomen (Lachner, O'Sullivan et al. 2003; Martin and Zhang 2005; Peters and Schubeler 2005).

Sie sind entweder in die vererbte Gen-Inaktivierung (Polycomb Repression) oder in die Aufrechterhaltung eines transkriptionspermissiven Status eines Gens (Trithorax Aktivierung) involviert, weshalb einige Mitglieder dieser Gruppen eine Histon-Methyltransferase-Aktivität besitzen (Orlando 2003; Pirrotta, Poux et al. 2003). Das Polycomb-Gruppen Protein „enhancer of zeste“ (E(z)) wird zu einer Histon-Methyltransferase, wenn es mit einem anderen Polycomb-Gruppen Protein komplexiert, und methyliert H3K27 und H3K9, was wiederum zur vermehrten Bindung von dem Chromodomain Protein Polycomb und somit zum inaktiven Status des Chromatins führt (Czermin, Melfi et al. 2002). Histon-Methyltransferasen der Trithorax-Gruppe dagegen zeigen z.B. Spezifität für Dimethylierung von H3K4 oder kombinatorisch von H3K4, H3K9 und H4K20 und rekrutieren Co-Aktivatoren, die die Bindung von reprimierenden Proteinen wie HP-1 verhindern und somit einen aktiven Transkriptionsstatus erzeugen (Beisel, Imhof et al. 2002). Janicki *et al.* konnten z.B. in einem Doxycyclin induzierbarem System die Induktion durch RNA-bindende Proteine auf RNA-Ebene, Verminderung von HP1- $\alpha$  und die Depositionierung von H3.3 am Transgenlocus nachweisen (Janicki, Tsukamoto et al. 2004). In Abb. 2 ist ein zusammenfassendes Flussdiagramm der verschiedenen Abläufe der epigenetischen Regulation dargestellt aus (Lachner, O'Sullivan et al. 2003).

Die N-Termini der Histone werden posttranslational durch Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinierung oder ADP-Ribosylierung modifiziert. Durch die Entdeckung modifizierender Enzyme bzw. von Proteinen, die spezifisch die modifizierten Histone binden, liegt die Vermutung nahe, dass die modifizierten N-Termini der Histone eine Art von genetischem Code bilden, der Chromatin-Regionen markiert und einen Einfluss auf die epigenetische Kontrolle und funktionale Chromosomen-Organisation hat (Lachner, O'Sullivan et al. 2003; Sims, Nishioka et al. 2003; Schubeler, MacAlpine et al. 2004; Martin and Zhang 2005; Peters and Schubeler 2005). Siehe dazu Abb. 2 aus (Lachner, O'Sullivan et al. 2003).

Acetylierung und Arginin-Methylierung werden mit transkriptioneller Aktivität in Verbindung gebracht (Schubeler, MacAlpine et al. 2004; Brinkman, Roelofsen et al. 2006). Tumber *et al.*



konnten in einem Lebend-Zellsystem zeigen, dass nach Transkriptionsaktivierung eines Transgens Histone hyperacetyliert und mindestens drei verschiedene Histon-Acetyltransferasen rekrutiert werden (Tumbar, Sudlow et al. 1999).

Phosphorylierung dagegen stellt einen Marker für Aktivierung von frühen Genen und ein Signal für mitotische Chromatin-Kondensation dar (Wei, Yu et al. 1999; Schubeler, MacAlpine et al. 2004).

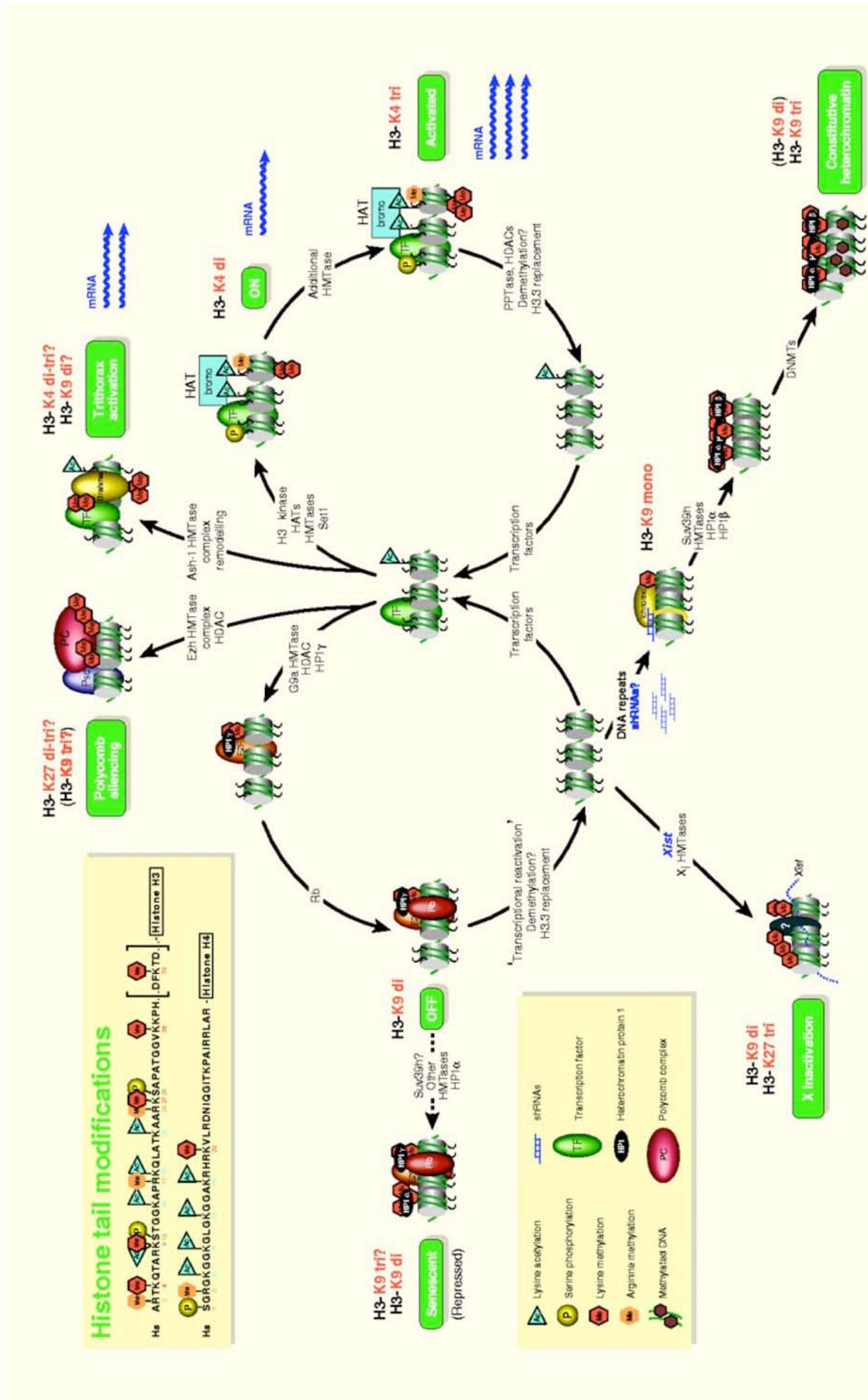
Die Methylierung der Lysine der Histone H3 und H4 ist wesentlich komplexer als die anderen Modifikationen. Die Lysine an den Positionen K4, K9, K27, K36 und K79 von H3 und an Position K20 von H4 können mono-, di- oder trimethyliert (me1, me2, me3) werden (Fischle, Kiermer et al. 2001).

Dabei assoziieren H3K4 mit aktiver Transkription und Trithorax-Aktivierung; H3K9 mit Transkriptions-Repression (inaktives Euchromatin), Polycomb-Repression und X-Chromosom-Inaktivierung (konstitutivem/fakultativem Heterochromatin); H3K27 mit Polycomb-Repression (fakultativem Heterochromatin); H3K36 und H3K79 mit Genexpression und H4K20 mit transkriptioneller Repression und mitotischer Kondensation des Chromatins (konstitutivem Heterochromatin), (Schubeler, MacAlpine et al. 2004; Martin and Zhang 2005).

Zinner *et al.* konnten durch Immunofluoreszenz in humanen Zellen zeigen, dass die verschiedenen Methylierungen im dreidimensionalen Zellkern distinkte Regionen anfärben und nur wenig Überlappung untereinander zeigen. H4K20me3 und H3K9me3 z.B. assoziiert mit konstitutivem Heterochromatin wie z.B. den Zentromeren (Zinner, Albiez et al. 2006).

## Abbildung 2 (nächste Seite)

**Schematische Darstellung der epigenetischen Abläufe bei einer Transkriptions-Aktivierung bzw. – Inaktivierung (Lachner, O'Sullivan et al. 2003).** Der **rechte Kreislauf zeigt die Transkriptionsaktivierung:** durch Rekrutierung von Kinasen, Histon-Acetyltransferasen und Histon-Methyltransferasen kommt es zur Phosphorylierung, Acetylierung und spezifischen H3K4 Dimethylierung, das Chromatin wird in einen transkriptionell aktiven Zustand versetzt. Durch weitere Histonmethyltransferasen kommt es zur H3K4 Trimethylierung. Histon-Deacetylasen, Demethylierung und H3.3-Austausch führen wieder zurück zur transkriptionellen Inaktivität. Der **linke Kreislauf zeigt die transkriptionelle Repression:** durch Bindung von Histon-Methyltransferasen, Histon-Deacetylasen und HP1- $\gamma$  wird das Chromatin in einen transkriptionell inaktiven Zustand versetzt, H3K9 wird dimethyliert, der Tumor Suppressor Rb bindet, HP1- $\alpha$  und Histon-Methyltransferasen werden rekrutiert, H3K9 wird trimethyliert, die Transkription ist unterdrückt. Durch Demethylierung und H3.3-Austausch kann dieser Zustand wieder aufgehoben werden.



## **Einfluss der Topologie des Zellkerns auf die Genexpression**

Eine ungelöste Frage besteht immer noch in Bezug auf die dreidimensionale Position von aktiven und inaktiven Genen relativ zu den Chromosomenterritorien.

Dem CT-IC-Modell (Cremer and Cremer 2001) folgend kann man sich die Chromosomenterritorien (CT) wie einen Schwamm aufgebaut vorstellen, bis in dessen kleinste Zwischenräume kanalartig das Interchromatin-Kompartiment (IC) hineinragt. Durch die rosettenartige Schleifenstruktur des Chromatins und seinen „small-scale loops“ (100 kbp DNA-Schleifen) bekommen Gene die Chance, durch expressionsabhängige Dekondensierung ins Interchromatin zu ragen (Cremer, Kreth et al. 2000; Cremer, Cremer et al. 2006).

Verschiedene Arbeiten zeigen auch für das CT-GL-Modell („giant loop“, einige Mbp DNA-Schleifen), dass selbst große DNA-Regionen aus den Chromosomenterritorien heraus Schleifen bilden können. Auf dem menschlichen Chromosom 6 gibt es in der Region für die Gene des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC) Chromatinschleifen mit einigen Mb DNA-Gehalt, die sich von der Chromatinoberfläche abheben. Diese Schleifen repräsentieren dekondensiertes Chromatin und ragen möglicherweise in das Interchromatinkompartiment hinein. Durch Hochregulierung der Transkription mit Interferon- $\gamma$  steigt die Häufigkeit deutlich an, mit der aktive Gene auf diesen Schleifen gefunden werden (Volpi, Chevret et al. 2000). Williams *et al.* beobachtete das selbe Phänomen für den „epidermal differentiation complex“ (EDC) auf Chromosom 1 in Keratinocyten (Williams, Broad et al. 2002). Auch bei der Embryonalentwicklung der Maus konnte ein Ausschleifen des *hoxb* Gen-Cluster beobachtet werden (Chambeyron, Da Silva et al. 2005).

Untersuchungen der Chromatinorganisation in Zusammenhang mit der transkriptionellen Aktivität konnte auch in lebenden Zellen gemacht werden. Durch gezielte Rekrutierung der VP16 *Acidic Activation Domain* (AAD) durch Lac-Repressor/Lac-Operator-Bindung zu einer bestimmten Chromosomenstelle, wird die Transkription an dieser Stelle aktiviert. In diesem System konnte eine Bewegung des Chromatins ins Innere des Kerns und ein Verweilen dort beobachtet werden. In nicht aktiviertem Zustand bewegt sich diese Chromosomenstelle nur während der frühen G<sub>1</sub> und frühen S-Phase für kurze Zeit ins Innere des Kerns (Tumbar and Belmont 2001). Außerdem öffnet sich nach Stimulierung der Transkription das Chromatin. Der Dekondensationsgrad scheint proportional zur Menge des Transkripts zu sein (Tsukamoto, Hashiguchi et al. 2000; Muller, Walker et al. 2001; Janicki, Tsukamoto et al. 2004).

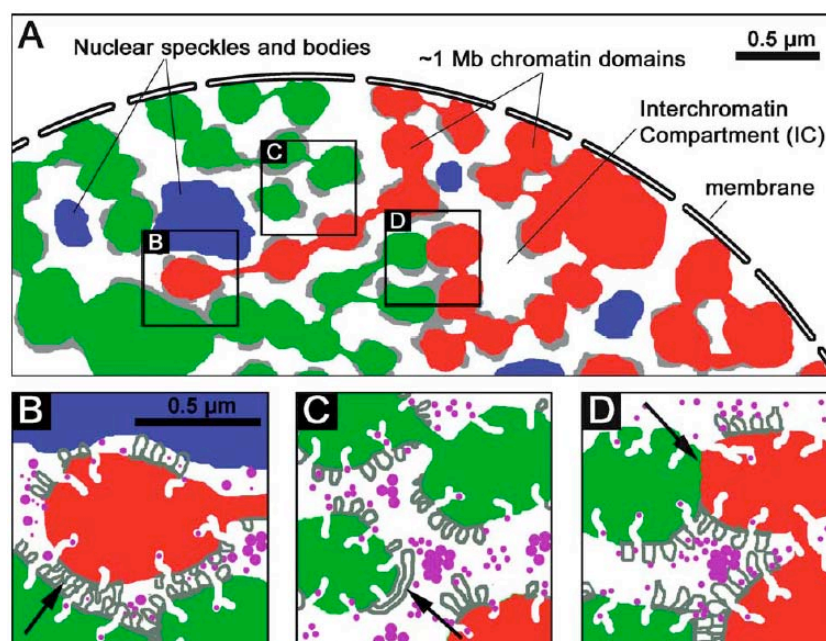
Wahrscheinlich stellen die oben beschriebenen Fälle jedoch nur Sonderfälle dar, die nicht als allgemein gültig betrachtet werden können. Küpper *et al.* können in ihrer Arbeit zeigen, dass hoch exprimierte Gene nicht zwingend an der Oberfläche eines Chromosomenterritoriums liegen, auch wenn sie das Ausschleifen der hoch-aktiven 2 Mb-Region 11p15.5 des Chromosom 11 (Mahy, Perry *et al.* 2002) bestätigen konnten (Kupper, Kölbl *et al.*). Eine Korrelation von Gendichte und der radialen Verteilung von Chromatin im Zellkern bzw. polarer Verteilung innerhalb eines Chromosomenterritoriums kann jedoch unabhängig von der Transkriptionsaktivität gezeigt werden, so lokalisiert genreiches Chromatin eher im Inneren, wohingegen genärmeres Chromatin eher peripher liegt (Kupper, Kölbl *et al.*; Gilbert, Gilchrist *et al.* 2005).

### 1.1.3 Das CT-IC-Modell

Auf der Basis der Erkenntnisse über Chromosomenterritorien (CTs) und dem Interchromatinkompartiment (IC) entwickelten T. und C. Cremer das CT-IC-Modell. Es beschreibt ein Modell der Zellkernarchitektur und der möglichen Folgen für die Regulation der Genexpression auf topologischer Ebene (Cremer and Cremer 2001; Albiez, Cremer *et al.* 2006; Cremer, Cremer *et al.* 2006). Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung von Bereichen eines funktionalen Interphasekerns. Die einzelnen Bestandteile sind im Folgenden beschrieben, aus (Albiez, Cremer *et al.* 2006):

Die radiale Anordnung der Chromosomenterritorien im Kern und eine Polarität innerhalb eines Territoriums konnte mit der Gendichte in Zusammenhang gebracht werden. So befindet sich genarmes Chromatin eher in der Peripherie, wohingegen genreiche Bereiche weiter innen lokalisieren, unabhängig von der transkriptionellen Aktivität der Gene. In A) ist ein Bereich eines Interphasekerns schematisch dargestellt. Farblich (rot und grün) sind die 1 Mb-Chromatindomänen zweier benachbarter Chromsomenterritorien gezeigt. Diese sind durch das Interchromatinkompartiment getrennt (weiß). Die Ausmaße des Interchromatinkompartiments variieren zwischen einer Größenordnung von Micrometern bis zu Nanometern. Diese Kanäle breiten sich zwischen den Chromatindomänen aus und enthalten Speckles (blau) und andere Kernorganellen, sowie Faktoren der Transkriptions- und Spleißmaschinerie (pink). Die dünnsten Ausläufer (<100 nm) des Interchromatinkompartiments ragen möglicherweise bis in die 1 Mb-Domänen hinein und enden zwischen 100 kb Schleifen (nicht gezeigt). An der Peripherie der Chromatindomänen befindet sich die Perichromatin Region (grau dargestellt), in der sich Gene befinden, die für die Transkription bereit sind oder sich in Transkription befinden. Dem entsprechend befinden sich dauerhaft

transkriptionell inaktive Gene im Inneren der Chromatindomänen. In B) ist eine 1 Mb-Chromatindomäne vergrößert (rot), die aus ihrem Chromosomenterritorium in ein benachbartes (grün) hineinragt. Dadurch wird auch ein direkter Kontakt von Schleifen/Perichromatin Region zweier benachbarter Chromatindomänen ermöglicht, die nicht zwingend zu einem Chromosomenterritorium gehören. Die Vergrößerung C) zeigt, dass die dekondensierten Chromatinschleifen an den Oberflächen der Chromatindomänen verschiedene Größen haben können. Direkter Kontakt zweier Chromatindomänen von benachbarten Territorien ist durchaus denkbar, das mögliche Ausmaß solcher direkter Vermischungen (Intermingling) ist bisher noch nicht bekannt (D).



**Abbildung 3**

**Schematische Darstellung des CT-IC-Modells.** Beschreibung siehe Text oberhalb, aus (Albiez, Cremer et al. 2006).

## 1.2 Die Genexpression von HIV-1 als Modell für eine induzierbare Genexpression

Die Expression der viralen Proteine des Humanen Immundefizienz Virus-1 (HIV-1) stellt im Chromatinkontext eine induzierbare, regulierte Genexpression dar (Sodroski, Rosen et al. 1985). Die virale Transkription wird über die Long Terminal Repeats (LTRs) gesteuert. Die 5'-LTR besitzt eine Promotor- und die 3'-LTR eine Terminationsfunktion für die Transkription (Freed 2001). Nach Integration der proviralen DNA ins Genom der Wirtszelle entstehen

ausgehend von der Basisaktivität der LTR in der frühen Phase des Replikationszyklus kleine mehrfach gespleißte mRNAs, die für die regulatorischen Proteine Tat und Rev kodieren. Tat dient als starker Stimulator der Transkription (siehe 1.2.2). Sobald genügend Rev vorhanden ist, exportiert Rev ungespleißte und einfach-gespleißte mRNAs ins Zytoplasma, damit diese dort in die Gag-, Pol- und Env-Vorläuferproteine translatiert werden können (Cullen 2003). In verschiedenen Studien zeigt das integrierte Provirus in den meisten Fällen so gut wie keine Basisaktivität, wodurch das Virus das Überdauern in Zellen, die ein Virusreservoir bilden, sicherstellt. Zelluläre Inhibitoren der Transkription und die Integration in einen schwach transkribierten Bereich des Wirtsgenoms tragen ihren Teil dazu bei (Fischle, Kiermer et al. 2001; Jordan, Defechereux et al. 2001). Dennoch kann die Transkription auch in diesen Zellen durch verschiedene Stimuli und spezifisch durch das virale Protein Tat aktiviert werden und zur Virusproduktion führen (Pomerantz, Trono et al. 1990; Chen and Shyu 1995).

Während molekularbiologisch die Chromatinstruktur und die Transkriptionsaktivierung der integrierten Virus-DNA untersucht wurde und einigermaßen bekannt ist (vgl. dazu 1.2.2), (Van Lint, Emiliani et al. 1996; Jordan, Defechereux et al. 2001; He, Ylisastigui et al. 2002; Kim, Bourgeois et al. 2002; Quivy and Van Lint 2002; Lusic, Marcello et al. 2003; Pumfery, Deng et al. 2003; Zhou, Deng et al. 2004), gibt es über den Einfluss der räumlichen Anordnung der viralen DNA in der Wirtszelle und der Chromatinumgebung auf die HIV-Genexpression wenige Erkenntnisse. Berthold und Maldarelli konnten durch FISH zeigen, dass mehrfach gespleißte HIV-Transkripte mit Speckles colokalisieren, wohingegen ungespleißte Transkripte diffus im Kern verteilt vorkommen (Berthold and Maldarelli 1996). Die Arbeitsgruppe von Maul konnte eine Colokalisation von nicht-integrierter HIV-DNA mit Speckles beobachten, nicht aber mit PML Bodies (Bell, Montaner et al. 2001). Durch FRET-Experimente entwickelt Marcello *et al.* ein Modell der Tat-Transaktivierung, in dem Cyclin T1, CDK9 und p300/CBP in PML Bodies lokalisieren und so von der Transkription an der HIV-LTR abgehalten werden und erst durch die Expression von Tat aus den „Vorratsbehältern“ gelockt werden. Tat interagiert spezifisch mit Cyclin T1 im Nukleoplasma, jedoch nur zu einem geringen Teil in PML Bodies (Marcello, Lusic et al. 2004).

Insgesamt gesehen bietet die Transkriptionseinheit des HIV-1 ein gutes Modell für eine induzierbare Genexpression, die dadurch unter verschiedenen Aspekten betrachtet und verglichen werden kann, wie z.B. Veränderung der Chromatinstruktur und topologische Lage der DNA bei Transkriptionsaktivierung oder Einfluss der umliegenden Chromatin-konformation auf die Transkriptionsaktivierung.

### 1.2.1 Aufbau der HIV-1 LTR

#### **Core-Promotor, Enhancer und die regulatorische Region**

Die HIV-LTR besteht nach der reversen Transkription aus den drei strukturellen Einheiten U3, R und U5 und den vier funktionellen Bereichen, dem Core-Promotor, dem Enhancer, der regulatorischen/modulatorischen Region und dem Tat-Activation-Response Element (TAR), (Abb. 4), (Pereira, Bentley et al. 2000; Quivy and Van Lint 2002).

Das TAR-Element befindet sich in der R-Region an Nukleotid-Position +1 bis +60, der Core-Promotor (-78 bis -1), die Enhancer Region (-105 bis -79) und die regulatorische Region (-454 bis -104) liegen in der U3-Einheit. Im Bereich des Core-Promotors liegt die TATA-Box, ein Initiator Element (INR) und drei Bindungsstellen für den zellulären Transkriptionsaktivator SP1. 5' davon befindet sich die Enhancer Region, bestehend aus NF $\kappa$ B-Bindungsstellen. Die regulatorische Region enthält eine Vielzahl an Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren, wie COUP, AP-1, NF-AT, USF, TCF-1 $\alpha$  und NF $\kappa$ B (Gaynor 1992; Pereira, Bentley et al. 2000), (Abb. 4). Darüber hinaus wird ein negatives regulatorisches Element (NRE) in der U3-Region vermutet, da durch Deletion im Bereich -340 bis -184 die Transkription von der HIV-LTR und die Replikation in verschiedenen Zelllinien, u.a. Jurkat, gesteigert werden konnte (Rosen, Sodroski et al. 1985; Lu, Touzjian et al. 1990; Giacca, Gutierrez et al. 1992). Dies wurde jedoch nicht in allen Studien bestätigt, weshalb das NRE kontrovers diskutiert bleibt (Hirsch, Spire et al. 1990; Ludvigsen, Werner et al. 1996; Naghavi, Estable et al. 2001).

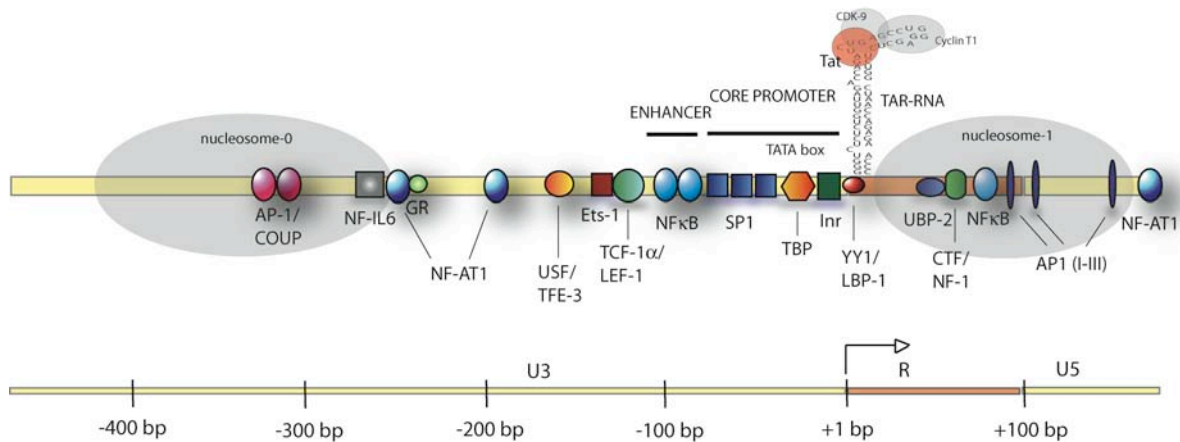
#### **Das TAR-Element**

Direkt 3' des Transkriptionsstarts, am Beginn der R-Region, liegt das TAR-Element (Tat-Activation-Response-Element) in der HIV-LTR. Das TAR ist ein RNA-Element mit 59 Basen, die eine Haarnadelstruktur bilden, bestehend aus einem Stamm, einer Wulst und einer apikalen Schleife (Karn 1999). Im Gegensatz zu anderen Enhancer Elementen funktioniert TAR nur in richtiger Orientierung und am besten unmittelbar 3' vom Promotor (Muesing, Smith et al. 1987). Das regulatorische HIV-Protein Tat bindet an den Wulst der RNA, rekrutiert dort die zellulären Faktoren Cyclin T1 und CDK9, die gemeinsam die Tat-assoziierte Kinase (TAK), auch positiver Transkriptions-Elongationsfaktor bII (pTEFbII) genannt, bilden und dadurch die zur Elongation benötigte Phosphorylierung der RNA Polymerase II bewerkstelligen (Karn 1999), (Abb. 4).

### Nukleosomen-Organisation der HIV-1 LTR

Unabhängig vom Integrationsort binden zwei Nukleosomen an die HIV-LTR, das Nukleosom 0 (Nuc-0), das 5' der regulatorischen Region an Nukleotid-Position -425 bis -256 liegt, und das Nukleosom-1 (Nuc-1), das direkt 3' des Transkriptionsstarts an Position +1 bis +155 liegt (He, Ylisastigui et al. 2002), (Abb. 4).

Aktive Transkription geht im Chromatinkontext mit einem Remodeling der Nukleosomen einher, das auch für das Nuc-1 der HIV-LTR beobachtet werden konnte. Schon nach Integration ins Genom der Wirtszelle zeigt Nuc-1, je nach zell- und integrationspezifischer Basisaktivität der LTR, eine „lockere“ Nukleosomen-Konformation, die nach spezifischer Aktivierung der Transkription gesteigert werden kann (Jordan, Defechereux et al. 2001). Diese Umorganisation stellt sich nach Transkriptionsaktivierung durch den Tumornekrose-Faktor TNF- $\alpha$  oder Phorbol ester TPA ein (Verdin, Paras et al. 1993). Dies konnte auch nach Aktivierung der LTR durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren wie Natrium-Butyrat oder Trichostatin A bestätigt werden, die die Deacetylierung der Histone verhindern und es so zu einer Hyperacetylierung des Chromatins kommt (Laughlin, Chang et al. 1995; Jordan, Defechereux et al. 2001; Zhou, Deng et al. 2004).



**Abbildung 4**

**Schematische Darstellung der Transkriptionsregulations-Einheit von HIV, die 5'-LTR.** Gezeigt sind die drei Einheiten U3, R und U5 mit ihren Ausmaßen in bp, mit dem Transkriptionsstart an Position +1 und die Region des Core-Promotors und Enhancers. Die zwei großen grauen Ellipsen stellen die Nukleosomen 0 und 1 dar, die kleinen farbigen Kreise und Rechtecke eine Auswahl an möglichen zellulären Transkriptionsfaktoren, die die LTR binden können. Ab Position +1 ist die TAR-Region als Basenabfolge in ihrer Sekundärstruktur gezeigt mit den daran bindenden Proteinen Tat, Cyclin T1 und CDK9.



### Die „leader region“ und andere funktionelle Bereiche des Virusgenoms

Das Virusgenom liegt nach der Infektion einer Zelle als einzelsträngiges RNA-Molekül vor, das durch seine 5'-Cap- und 3'-PolyA-Sequenzen einer eukaryotischen mRNA ähnelt. Direkt im Anschluss an die U5-Region der HIV-LTR liegt die Primer Bindungsstelle (PB), eine 18 bp lange Sequenzfolge, an die komplementär eine zelluläre tRNA<sup>Lys</sup> bindet und als Primer für die Synthese des ersten DNA-Stranges bei der reversen Transkription dient.

Direkt angrenzend an die U3-Region der 3'-LTR von HIV und zentral in der *pol*-kodierenden Sequenz befinden sich Purin-reiche Sequenzen (PP), die bei der Synthese des DNA-Doppelstranges wichtig sind, da sie als Primer bei der Synthese des zweiten Doppelstranges behilflich sind (Rausch and Le Grice 2004; Wurtzer, Goubard et al. 2006).

Den Sequenzbereich zwischen der Primer Bindungsstelle und dem Start-ATG der *gag*-Gene bezeichnet man als „leader region“. Diese Region beinhaltet den Haupt-Spleißdonor, der für das Spleißen sämtlicher Transkripte verwendet wird. Außerdem befindet sich hier die  $\psi$ -Stelle, durch die sich das RNA-Genom bei der Morphogenese an die Nukleokapsidproteine der sich bildenden Viruspartikel heftet (Modrow, Falke et al. 2003).

## 1.2.2 Transkriptionsaktivierung der LTR durch das virale Protein Tat

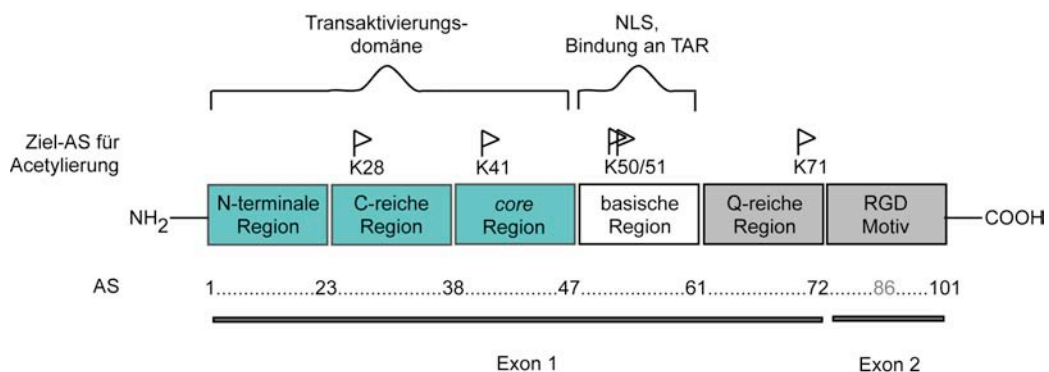
### Das virale Tat-Protein

Tat, der Transaktivator der Transkription, ist ein regulatorisches Protein des HI-Virus, ca. 14-16 kDa groß und lokalisiert im Kern bzw. den Nukleoli (Hauber, Perkins et al. 1987). Es besteht aus 101 Aminosäuren (AS) und wird von zwei Exons kodiert, die vor bzw. überlappend im *env*-Gen liegen (Sodroski, Patarca et al. 1985). Durch eine Punktmutation kommt es bei der codierenden Sequenz für Tat im HIV-Laborstamm HXB2 zu einem Translations-Stopp und dadurch zu einem trunkierten Tat-Protein mit 86 AS, welches aber das volle Transaktivierungspotenzial besitzt (Jeang, Xiao et al. 1999; Rana and Jeang 1999). Das erste Exon kodiert für die N-terminalen 72 AS, die bereits für eine vollständige Transaktivierung der Transkription ausreichend sind, da die drei dafür wichtigen Regionen (Cystein-reiche-, *core*- und basische Region) vorhanden sind (Garcia, Harrich et al. 1988). Ein vergleichbares Protein kommt in allen Lentiviren der Primaten vor (Jeang, Chang et al. 1991) und zeigt eine stark konservierte Cystein-reiche Region und *core*-Region (Jones and Peterlin 1994).

Es lassen sich zwei funktionale Domänen und sechs Bereiche unterscheiden (Kuppuswamy, Subramanian et al. 1989), (Abb. 5). Die Aktivierungsdomäne bezeichnet die eine funktionale Domäne und liegt zwischen den Aminosäuren (AS) 1 und 47. Die andere funktionale

Domäne (AS 48-59) stellt eine Arginin-reiche, basische Region dar, die für die nukleäre Lokalisation durch direkte Bindung an Importin- $\beta$  verantwortlich ist (Truant and Cullen 1999) und die Bindung von Tat an die TAR-RNA vermittelt (Rana and Jeang 1999). Darüber hinaus bindet Tat über diese basische Region zelluläre Faktoren wie p300/CBP (Marzio, Tyagi et al. 1998) und bewerkstelligt mit dieser Domäne aus der Zelle ausgeschleust zu werden ohne ein Signalpeptid für die Sekretion zu besitzen (Helland, Welles et al. 1991; Chang, Samaniego et al. 1997). Weitere Bereiche des Proteins sind eine Cystein-reiche Region (AS 23-38), eine *Core*-Region (AS 39-49) und eine Glutamin-reiche Region (AS 61-72). Die Cystein-reiche Region erhielt ihren Namen auf Grund der hoch konservierten Anordnung von sieben Cysteinen, die den Aufbau von intramolekularen Disulfidbrücken erlauben und eine entscheidende Rolle in der biologischen Funktion von Tat spielen (Koken, Greijer et al. 1994). Exon 2 codiert für einen weiteren Bereich, die sich durch ein Arginin-Glycin-Asparagin-Motiv (RGD-Motiv) auszeichnet. Über diese Region bindet Tat an Integrinrezeptoren und trägt so zur Zelladhäsion bei (Brake, Debouck et al. 1990).

Tat besitzt in verschiedenen Regionen Lysine, die als Ziel von Acetylierung dienen und wichtig für die Funktion von Tat sind. So zeigen verschiedene Gruppen die Acetylierung von Lysin an Position K28, K41, K50, K51 und K71 (Kiernan, Vanhulle et al. 1999; Deng, de la Fuente et al. 2000; Deng, Wang et al. 2001). Durch Übertragung einer Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A werden diese Lysine modifiziert. Diese Modifikation ist reversibel und dient als eine Art Signal für Bromodomänen, über die Proteine Acetylierungen erkennen können. So erkennen z.B. GCN5 (general control non-derepressible-5), P/CAF (p300/CBP associated factor) und p300/CBP (cAMP responsive binding protein) über ihre Bromodomänen acetyliertes Tat-Protein (Yang 2004).



**Abbildung 5**

**Schematische Darstellung der Bereiche des Tat-Proteins.** Das Tat-Protein ist unterteilt in zwei Exons (gekennzeichnet durch den darunter liegenden Balken) und die funktionalen Domänen (oberhalb der Bereiche beschriftet). Die sechs Bereiche sind als Rechtecke dargestellt, farbig den zwei Domänen zugeordnet. Die AS, die einen jeweiligen Bereich abtrennen, sind unterhalb und die Ziel-AS für Acetylierung sind oberhalb gelistet.

Das Tat-Protein kann von der Zelle nicht nur sekretiert sondern auch von anderen Zellen der Umgebung durch Bindung an Sulfatgruppen von freiem Heparin, Heparan-Sulfat und Zelloberflächen Heparan-Sulfat-Proteo-Glycan wieder in die Zelle aufgenommen und in den Kern transportiert werden (parakrine Wirkungsweise von Tat) (Frankel and Pabo 1988; Mann and Frankel 1991; Rusnati, Tulipano et al. 1999). Tat zeigt seine biologische Funktion daher nicht nur als nukleäres Protein, sondern auch extrazellulär. Extrazelluläres Tat regt Zellen zur Produktion von Zytokinen an, wie aktivierte T-Zellen zur Produktion von IL-2 (Westendorp, Li-Weber et al. 1994) oder Makrophagen zur Sekretion von TGF- $\beta$  (Zauli, Davis et al. 1992). Tat bindet zelluläre Rezeptoren wie VEGFR-1 und -2 (Albini, Benelli et al. 1996; Mitola, Sozzani et al. 1997; Mitola, Soldi et al. 2000), Chemokinrezeptoren wie CCR-2 und -3 (de Paulis, De Palma et al. 2000) und konkurriert mit einer X4-HIV-1 Infektion von T-Zellen durch Bindung an den CXCR4-Rezeptor (Xiao, Neuveut et al. 2000). Außerdem fungiert es als chemischer Lockstoff für Leukozyten (Benelli, Barbero et al. 2000). Auf diese Weise nimmt es entscheidenden Einfluss auf Zellen des Immunsystems und die Transkription zellulärer Gene. Durch Bindung an verschiedene Rezeptoren kann Tat eine Reihe von Signal-Transduktionswegen in Gang setzen, die in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B, AP-1 oder CREB resultieren, was eine Rolle in Proliferation und Überleben der Zelle bzw. eine Hyperaktivierung des Immunsystems während einer HIV-Infektion vermuten lässt (Abb. 6), (Mischianti, Pironi et al. 1999; Brigati, Giacca et al. 2003; Fortin, Barat et al. 2004).

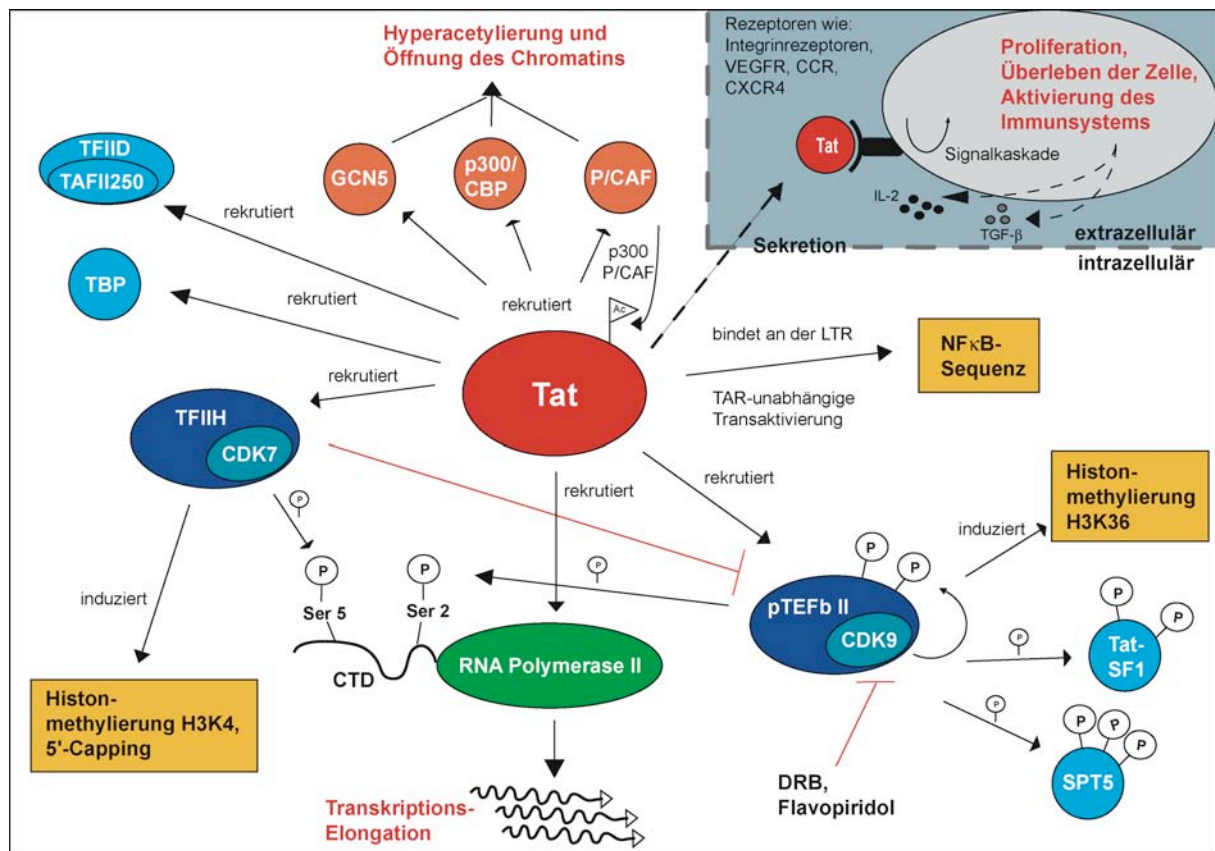
### **Basisaktivität der HIV-LTR**

Durch die Bindung zellulärer Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B oder SP1 erhält die HIV-LTR ihre Basisaktivität, die notwendig ist, um die ersten viralen Transkripte nach der Integration ins Genom der Wirtszelle zu erhalten und die regulatorischen Proteine Tat und Rev synthetisieren zu können. Die Transkription aufgrund der Basisaktivität erfolgt jedoch sehr ineffizient, da die Polymerase meist nach wenigen Basen unspezifisch von der DNA abfällt (Kao, Calman et al. 1987).

Ein anderer Faktor, der die Basisaktivität bestimmt, stellt die Chromatinumgebung der Integrationsstelle dar. Integriert die provirale DNA in einen transkriptionell aktiven Bereich im Genom der Wirtszelle, erlangt die HIV-LTR eine höhere Grundaktivität, im Gegensatz zur Integration in eine nicht aktiv transkribierte Chromatin-Region, wie genarme Bereiche oder zentromerisches Heterochromatin (Jordan, Defechereux et al. 2001; Lewinski, Bisgrove et al. 2005).

## Transkriptionsaktivierung und Nukleosomen-Remodeling

Die Aktivierung der HIV-LTR kann durch verschiedene Stimuli geschehen, wie z.B. durch Zytokine (TNF- $\alpha$ ), Phorbol-Ester (TPA), Inhibitoren von Histon-Deacetylasen (HDACi) oder über das virale Protein Tat (Verdin, Paras et al. 1993; Laughlin, Chang et al. 1995; Jordan, Defechereux et al. 2001; Lusic, Marcello et al. 2003). Momentan gibt es zwei Modelle für die Transkriptionsaktivierung der HIV-LTR durch Tat. Zum einen soll Tat die Initiation der Transkription fördern (Laspia, Rice et al. 1989; Garcia-Martinez, Ivanov et al. 1997), zum anderen die RNA Polymerase II so modifizieren, dass die vollständige Elongation der Transkription gewährleistet wird (Kobor and Greenblatt 2002).



**Abbildung 6**

**Übersichtsdiagramm der Tat-Aktivität inner- bzw. außerhalb der Zelle.** Die bei der Transkriptionsaktivierung der HIV-LTR durch Tat beteiligten verschiedenen Faktoren sind als farbige Ellipsen dargestellt: hellblau: Transkriptionsfaktoren, dunkelblau: Transkriptionsfaktoren mit Kinaseaktivität, orange: Histon-Acetyltransferasen. Schwarze Pfeile repräsentieren die Richtung einer Auswirkung (Rekrutierung, Bindung, Phosphorylierung (P), Acetylierung (Ac)) von einem Faktor auf einen anderen, rote T-Linien die Blockade eines Faktors. Der weiße Bereich stellt Vorgänge in der infizierten Zelle dar, der blau-graue Bereich die Funktionen von Tat als extrazelluläres Protein bzw. die Auswirkungen auf eine benachbarte Zelle.

Tat bindet an die TAR der frisch transkribierten mRNA und vermittelt dadurch die Rekrutierung verschiedener Faktoren. Auf zwei verschiedenen Wegen trägt Tat durch die Bindung an TAR zur Transaktivierung bei. Erstens rekrutiert Tat generelle Transkriptionskomplexe wie TBP (TATA box binding protein), TAFII250, TFIIB und die RNA Polymerase II, aber auch Chromatin-modifizierende Enzyme, wie Histon-Acetyltransferasen (HATs) oder generell Faktor-Acetyltransferasen (FATs) (Kashanchi, Piras et al. 1994; Veschambre, Simard et al. 1995; Wu-Baer, Sigman et al. 1995; Veschambre, Roisin et al. 1997; Lusic, Marcello et al. 2003; Zhou, Deng et al. 2004). Zweitens werden TFIID und pTEFb rekrutiert, die die C-Terminale Domäne (CTD) der Polymerase II an Serin 5 bzw. 2 phosphorylieren. Dies führt zur gesteigerten Elongation der Transkripte (Karn 1999) und induziert das 5' Capping, die Methylierung von Histon H3 und die Phosphorylierung von Transkriptions-Elongationsfaktoren wie SPT5 und Tat-SF1 (Gerber and Shilatifard 2003; Zhou, Deng et al. 2004). Unabhängig von der Bindung an TAR erfolgt durch Tat eine Aktivierung von NF $\kappa$ B bzw. die direkte Bindung von Tat an die NF $\kappa$ B Enhancer Sequenz in der HIV-LTR und induziert so eine TAR-unabhängige Transkription (Dandekar, Ganesh et al. 2004). Somit bewerkstelligt Tat die Öffnung des Chromatins, die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren, die Modifizierung der RNA Polymerase II und wirkt selber als ein Transkriptionsfaktor. Einige Funktionen von Tat sind in Abb. 6 zusammengestellt.

Ein weiterer wichtiger Vorgang bei der Transkriptionsaktivierung der HIV-1 LTR ist die Acetylierung der Histone des Nuc-1 (Van Lint, Emiliani et al. 1996; Lusic, Marcello et al. 2003). Tat rekrutiert die zellulären HATs p300/CBP, P/CAF und GCN5 an die LTR, wodurch das Nukleosomen-Remodeling, respektive die Hyperacetylierung und daraus resultierende lockere Chromatinkonformation bei der Transkriptionsaktivierung am Nuc-1 stattfindet (Marzio, Tyagi et al. 1998; Kiernan, Vanhulle et al. 1999; Col, Caron et al. 2001; Lusic, Marcello et al. 2003). Die HIV-LTR zeigt sowohl eine Transkriptionsaktivität *in vitro* nach Zugabe von HATs (Steger, Eberharter et al. 1998) für nukleosomen-gebundene DNA, als auch nach Zugabe von HDACi bei integrierten LTR-Reporter-Plasmiden (Van Lint, Emiliani et al. 1996). Dieses Remodeling am Nuc-1 ist ATP-abhängig (Widlak, Gaynor et al. 1997) und scheint auch auf die beiden Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und SP1 angewiesen zu sein. Transkription und Nukleosomen-Remodeling finden nur statt, wenn NF $\kappa$ B und SP1 an chromatin-assoziierte DNA gebunden haben (Pazin, Sheridan et al. 1996). Fehlen die beiden Bindungsstellen für NF $\kappa$ B und SP1 in der HIV-LTR kommt es zu keinem Nukleosomen-Remodeling und zu keiner Transkription (El Kharroubi, Piras et al. 1998). Daher ist es möglich, dass NF $\kappa$ B und Tat beide für die Rekrutierung von HATs verantwortlich sind und es so zur Transkriptionsaktivierung kommt.

### **mRNA-Diversität durch Spleißen**

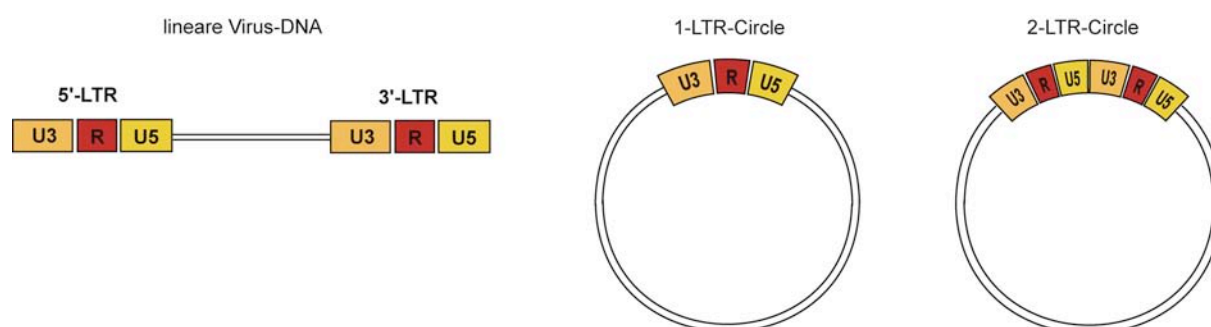
Der molekulare Vorgang Spleißen bedeutet das Entfernen von Introns und das Zusammensetzen der Exons. Bewerkstelligt wird dieser Vorgang durch Spleißosomen, die aus Komplexen von snRNPs und assoziierten non-snRNPs, deren Hauptgruppe die SR-Proteine sind, bestehen (Sanford and Caceres 2004). SR-Proteine sind Serin-Arginin-reiche (SR-reiche) Proteine, die sich durch ein oder zwei RNA-Bindedomänen und eine SR-reiche C-terminale Domäne auszeichnen (Fu 1995; Graveley 2000). Während manche Introns konstitutiv entfernt werden, gibt es andere Introns, die alternativem Spleißen unterworfen sind (Black 2003). 60-90% der mRNAs von menschlichen Genen werden alternativ gespleißt und erzeugen so eine größere Protein-Diversität ausgehend von einer genomischen Sequenz (Graveley 2001; Boue, Letunic et al. 2003). Defekte im alternativen Spleißen oder Ungleichgewichte an mRNA-Spezies von einem Gen können zu Erkrankungen wie  $\beta$ -Thalassämie oder Cystischer Fibrose führen (Faustino and Cooper 2003).

Auch HIV-1 ist auf den Vorgang des alternativen Spleißens angewiesen. Das HIV-Genom ist nur 9000 bp lang, beherbergt aber die codierende Sequenz für 15 Proteine, deren Synthese essentiell für die Virusreplikation ist (Frankel and Young 1998). Ausgehend von dem viralen Promotor, der HIV-LTR, wird bei der Transkription ein Transkript abgelesen, das aber durch die zelluläre Spleiß-Maschinerie in mehr als 30 mRNAs verwandelt wird. Das Genom von HIV besitzt vier Spleißdonors und acht Akzeptoren, durch deren Verwendung und Kombination beim alternativen Spleißen diese Vielzahl an mRNAs entsteht. Die entstehenden Transkripte lassen sich in drei Klassen einteilen: die mehrfach gespleißten 2 kb Transkripte, die einfach gespleißten 4 kb Transkripte und das 9 kb lange Volllängetranskript (Purcell and Martin 1993). Die 2 kb mRNAs sind vollständig gespleißt und codieren prinzipiell für die regulatorischen Proteine Tat und Rev und die akzessorischen Proteine Vpr und Nef. Die einfach gespleißten 4 kb Transkripte sind bicistronisch und codieren für die Env Glycoproteine und den viralen Faktor Vpu. Das 9 kb Volllängetranskript dient sowohl als Matrize für Gag und das Gag-Pol Polyprotein, als auch als pre-genomische RNA beim Zusammenbau eines Virus (Jacquenot, Decimo et al. 2005). Rev ist für den Export von einfach- und ungespleißter RNA ins Zytoplasma verantwortlich, damit auch die Translation der *env*-, *gag*- und *pol*-Gene garantiert wird und Viren produziert werden können (Felber, Hadzopoulou-Cladaras et al. 1989; Malim, Hauber et al. 1989). Das Spleiß-Muster an sich ist daher von großer Bedeutung, Ungleichgewichte können zu verminderter Virusproduktion führen (Jacquenot, Decimo et al. 2005).

### 1.2.3 Transkription von nicht integrierter HIV-1 DNA

Obwohl die Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom ein notwendiger Schritt in der Replikation des HI-Virus ist, zeigen immer mehr Studien, dass auch nicht integrierte provirale DNA in Zellen des Gehirns, CD4-positiven T-Zellen, Makrophagen und verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden kann (Engelman, Englund et al. 1995; Wiskerchen and Muesing 1995; Teo, Veryard et al. 1997; Bell, Montaner et al. 2001; Wu and Marsh 2003). Während der sehr frühen asymptomatischen Phase einer HIV-Infektion können sogar bis zu 99% der viralen DNA nicht integriert in der Zelle vorliegen (Chun, Carruth et al. 1997). Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass diese nicht-integrierte Virus-DNA früh nach der Infektion in der Zelle zirkularisiert, als Episomen in der Zelle vorliegt und auch aktiv transkribiert wird (Cara and Reitz 1997; Bell, Montaner et al. 2001; Wu and Marsh 2003; Brussel and Sonigo 2004; Wu 2004), wobei nur ein kleiner Teil der so gebildeten RNA auch wirklich translatiert wird und als funktionsfähiges Protein dann in der Zelle zur Verfügung steht (Wu and Marsh 2003).

Es gibt drei mögliche Formen der nicht integrierten proviralen DNA. Sie kann entweder als linearer Strang nach der reversen Transkription, oder als ein 1-LTR-Circle oder 2-LTR-Circle vorliegen, die entweder durch virale oder zelluläre Faktoren zu ringförmigen Episomen ligiert werden (Abb. 7). Über die Existenz von nicht integrierter HIV-1 DNA hinaus, konnte auch eine niedrige, aber konstante Expression von einem Integrase-defizienten Virus vier Wochen nach Infektion gezeigt werden (Engelman, Englund et al. 1995; Wiskerchen and Muesing 1995; Gillim-Ross, Cara et al. 2005).



**Abbildung 7**

**Schematische Darstellung der nicht integrierten HIV-DNA Formen.** Nach der reversen Transkription kann die HIV-DNA als linearer Doppelstrang oder als ligierte 1- oder 2-LTR-Circels vorliegen.

Es ist jedoch bisher sehr wenig über die Lokalisation, deren mögliche transkriptionsabhängige Veränderung und die Chromatinstruktur, die solche Episomen bilden könnten, bekannt.

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Im CT-IC-Modell (Cremer and Cremer 2001) ist der Zellkern in Chromosomenterritorien und ein Interchromatinkompartiment geteilt. Im Interchromatinkompartiment befinden sich Faktoren für Transkription, Spleißen, Replikation und Reparatur der DNA. Aktiv transkribierte Gene haben Kontakt zum Interchromatinkompartiment, wohingegen inaktive Gene davon abgewandt liegen. Nach diesem Modell ist es nötig, dass ein bislang inaktives Gen bei seiner Aktivierung die Position ändert, um Kontakt zum Interchromatinkompartiment und den darin enthaltenen Faktoren zu bekommen. Ein Gen, das inaktiviert werden soll, muss sich dagegen von diesem abwenden, um den Kontakt zum Interchromatinkompartiment zu verlieren.

Lange Zeit war es nur möglich, solche Untersuchungen an fixierten Zellen mit Techniken wie Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) oder Antikörperfärbungen durchzuführen. Mit Einführung der Lebendzell-Farbstoffe in Form von fluoreszierenden Proteinen, wie GFP (Grün fluoreszierendes Protein), YFP (Gelb fluoreszierendes Protein), CFP (Cyan fluoreszierendes Protein), DsRed (Rot fluoreszierendes Protein) und daraus entstandene Varianten wurde ein weites Feld an neuen Möglichkeiten eröffnet, um solche Fragestellungen in lebenden Zellen beobachten zu können (Chudakov, Lukyanov et al. 2005; Matz, Labas et al. 2006).

Um das CT-IC-Modell (Cremer and Cremer 2001; Albiez, Cremer et al. 2006) zu testen, soll ein System entwickelt werden, mit dem die expressionsabhängigen Veränderungen der Genstruktur in lebenden Zellen beobachtet werden können. Dabei soll überprüft werden, ob es möglich ist, die Position eines einzelnen Transgens zu visualisieren. Wenn möglich, soll dieses Transgen vor und nach der Transkriptionsaktivierung in Bezug auf das Chromosomenterritorium, in dem es sich befindet, und in Bezug auf benötigte Komponenten des Interchromatinkompartiments beobachtet werden. Dazu soll ein HIV-basiertes System entwickelt werden, das ein Transgen unter der Kontrolle des Promotors von HIV-1, der 5' HIV-LTR, besitzt. Bei der HIV-LTR handelt es sich um einen Promotor, der sich an die Transkription in menschlichen Zellen angepasst und auf deren Funktion hin optimiert hat, der sich spezifisch durch das virale Tat-Protein induzieren lässt und dessen Chromatinbeschaffenheit z.T. bekannt ist. Es gibt Modelle, die eine mögliche Abfolge bzw. Interaktionen von transkriptionsrelevanten Faktoren mit der HIV-LTR beschreiben. Diese Eigenschaften sollten es ermöglichen, einen parallelen Vergleich bzw. den Zusammenhang der molekularbiologischen und topologischen Veränderungen bei der Transkriptionsaktivierung durch Tat zu beschreiben. Die Lokalisation des Transgens soll auf DNA-Ebene



durch Bindung eines Fluoreszenz-markierten DNA-Bindeproteins visualisiert werden. Durch spezifische Aktivierung der Transkription kann so die Position vor und nach der Aktivierung verglichen werden. Die Aktivität des Transgens soll einfach durch das Reporterprotein zu erkennen sein. Sichtbare Referenzpunkte können dabei helfen, die Eigenbewegung der Zelle und Brown'sche Molekularbewegungen auszugleichen.

Darüber hinaus zeigen Untersuchungen in der molekularen Virologie, dass von nicht integrierter viraler HIV-1-DNA transkribiert wird und Proteine synthetisiert werden. Die Transkription von dieser episomalen HIV-DNA deutet darauf hin, dass die nicht integrierte retrovirale DNA durchaus Bedeutung für den Vermehrungszyklus von HIV haben kann. Möglicherweise steht durch die Expression des frühen regulatorischen Proteins Tat von nicht integrierter viraler DNA dieses sofort nach Integration der proviralen DNA zur Verfügung, um die Transkriptionsinitiation und damit verbundenes Nukleosomen-Remodeling und die Rekrutierung transkriptionsrelevanter Faktoren einzuleiten (Wu 2004).

Um einen direkten Vergleich der Expression und der expressionsabhängigen Veränderungen eines integrierten und nicht integrierten HIV-LTR-regulierten Transgens ziehen zu können, soll das System so konzipiert werden, dass die topologische Lage und Chromatinbeschaffenheit für einen integrierten und nicht integrierten Status des Transgens gezeigt und untersucht werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Puffer, Lösungen und Bakterienmedien

Name	Zusammensetzung
50% Formamidlösung	50 ml 50% Formamid 10 ml 20xSSC pH 7,0 ad 100 ml <i>aqua dest.</i>
Auftragspuffer für DNA	15% Ficoll 5 mM EDTA 0,01% Bromphenolblau 0,01% Xylenyanol
Blocklösung für Antikörpernachweis bei FISH	4% BSA in 4xSSC/Tween
Einfriermedium für prokaryotische Zellen	2 Teile 80% Glycerin 1 Teil 10 mM MgCl <sub>2</sub>
Fixativ (3D-FISH)	Methanol/Eisessig 3:1
HIRT-Gradientenpuffer (HIRT-Extraktion)	3 M CsCl 0,5 M KAc 0,3 M Eisessig
Hybridisierungslösung (Southern Blot, radioaktiv)	1 M NaCl 50 mM Tris (pH 7,5) 10% Dextransulfat 1% SDS 250 µg/ml Heringsperma
LB-Amp-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 100 µg/ml Ampicillin ad 1 l <i>aqua dest.</i> , pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Agar
LB-Amp-Platten	LB-Agar 100 µg/ml Ampicillin

LB-Amp-IPTG-X-Gal-Platten	LB-Agar 100 µg/ml Ampicillin 20 mM IPTG-Lösung 80 µg/ml X-Gal
Neutralisierungslösung (Southern Blot)	0,5 M Tris 1 M NaCl pH 7,2
PBS (Phosphat gepufferte Saline)	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 9,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
PBS/MgCl <sub>2</sub>	95 ml PBS, 5 ml 1 M MgCl <sub>2</sub>
Pepsinlösung 3D FISH	49,5 ml <i>aqua dest.</i> 0,5 ml 1N HCl 10 ml Pepsin (37°C)
Pepsinlösung 2D FISH	10% Pepsinstocklösung 1:2000 in 0,01 M HCl
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 mM KCl 20 mM Glucose ad 1 l <i>aqua dest.</i> , pH 7,0
TAE (50x)	2 M Tris 1 mM Eisessig 0,1 M EDTA
SSC (20x)	175,3 g NaCl 88,2 g NaCitrat ad 1l <i>aqua dest.</i> pH 7,0
SSC/Tween	0,2% Tween in SSC
TBE (10x)	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA (pH 7,0) ad 1 l <i>aqua dest.</i>
TE (1x)	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 7,5
Transfer Puffer (Southern Blot)	0,4 M NaOH 0,5 M NaCl
Waschlösung 1 (Southern Blot)	2x SSC/0,5% SDS

Waschlösung 2 (Southern Blot)

1x SSC/0,5% SDS

X-Gal Lösung

2% X-Gal  
in 100% N,N-Dimethylformamid

Alle nicht aufgeführten Puffer und Lösungen sind in den einzelnen Protokollen der Herstellerfirmen der verwendeten Kits beschrieben. Puffer und Lösungen, die für die Zellkultur verwendet wurden, wurden autoklaviert, zur sonstigen Verwendung, wenn nötig, sterilfiltriert.

## 2.1.2 Reagenzien und Enzyme

Reagenz/Enzym	Hersteller
1 kb DNA Längenstandard	New England Biolabs, Schwalbach
2 log DNA Längenstandard	New England Biolabs, Schwalbach
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	New England Biolabs, Schwalbach
Chromosom 1q DNA	Microlibrary, im Labor AG Cremer vorhanden
Colcemid (10 µg/ml)	Seromed Biochrom, Berlin
Cot-1-DNA	Gibco, Karlsruhe
DAPI	Sigma, Deisenhofen
dCTP, <sup>32</sup> P markiert	Hartmann Analytik, Hamburg
dNTPs, 10 mM	Promega, Madison, USA
dUTP, Biotin markiert	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
dUTP, TAMRA markiert	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Dextransulfat	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunsschweig
DNaseI	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethidiumbromid, 1% (w/v) in <i>aqua dest.</i>	Serva, Heidelberg
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
Formaldehyd 37%	Sigma, Deisenhofen
Formamid, deionisiert	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
FuGENE™ 6 Transfection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Genetecin	Gibco, Karlsruhe
Glycerol	Sigma, Deisenhofen

Hoechst 33342	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Heringsperma-DNA	Gibco, Karlsruhe
IPTG, 0,2% in <i>aqua dest.</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Schwalbach
M-MLV Reverse Transcriptase RNaseH	Promega, Madison, USA
Minus, Point Mutant	
PCR Master Mix	Promega, Madison, USA
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin Lösung	Gibco, Karlsruhe
Pepsin	Sigma, Deisenhofen
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
RNaseH	Promega, Madison, USA
RNAsin	Promega, Madison, USA
SeaKem <sup>®</sup> LE Agarose	FMC Bio Products, Risingevej, Dänemark
SDS, 10% (w/v) Natriumdodecylsulfat in <i>aqua dest.</i>	Merck, Darmstadt
SuperScript First Strand Synthesis System für RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe
Triton X 100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom AG, Berlin, Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Vectashield	Vector, Burlingame, USA
X-Gal	Roche Diagnostics, Mannheim

Allgemeine Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Deisenhofen oder Merck, Darmstadt bezogen. Sämtliche Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs, Schwalbach verwendet. Nicht aufgeführte Reagenzien sind in den einzelnen verwendeten Kits enthalten. Lösungen, die für die Zellkultur verwendet wurden, wurden autoklaviert, zur sonstigen Verwendung, wenn nötig, sterilfiltriert.

### 2.1.3 Medien für eukaryotische Zellen

#### Zellkulturmedium für HeLa-Zellen

DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) mit Glutamax-I (L-Analyl-L-Glutamin), Pyruvat und 4,5 g/l Glucose (Gibco, Karlsruhe). Zugegeben wurden 10% inaktiviertes fötales

Kälberserum (bei 56°C 1 Std. Hitze inaktiviert) und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Zelllinien HeLa-Indi wurden zusätzlich mit 0,5 mg/ml Geneticin unter Selektion gehalten.

#### **Zellkulturmedium für PBMCs** (Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts)

RPMI 1640 Medium mit 2 g/l NaHCO<sub>3</sub> und Glutamin (Biochrom AG, Berlin). Zugegeben wurden 20% inaktiviertes fötales Kälberserum (bei 56°C 1 Std. Hitze inaktiviert) und 1% Penicillin/Streptomycin.

#### **Einfriermedium für eukaryotische Zellen**

Zellkulturmedium mit 20% inaktiviertem fötalem Kälberserum (bei 56°C 1 Std. Hitze inaktiviert), 1% Penicillin/Streptomycin und 10% DMSO.

### **2.1.4 Verwendete Kits**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
ChIP-IT Enzymatic	Active Motif, Rixensart, Belgien
DynabeadkilobaseBINDER Kit	Dynal Biotech, Hamburg
Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System, CDP-Star	GE Healthcare, Freiburg
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
Nucleobond PC500	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Megaprime DNA Labelling Kit, dCTP	GE Healthcare, Freiburg
Multi Site directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Primary human T-Cell Kit	Amaxa, Köln
Qiaamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.5 Verbrauchsmaterial

Spezielles Verbrauchsmaterial	Hersteller
35 mm Zellkulturschälchen mit 14 mm Glasboden	MatTek Corp., Ashland, USA
BD CPT Vaccutainer Röhrchen	Becton Dickinson, Düren
Bio-Spin 30 Columns	Bio-Rad, München
Hybond N <sup>+</sup> , Nucleic acid transfer membranes	GE Healthcare, Freiburg
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
LightCycler Kapillaren 20µl	Roche Diagnostics, Mannheim
Whatman Papier, 3 mm	Whatman, Maidstone, UK
Zählkammer für eukaryotische Zellen	Madaus Diagnostics, München

Sonstige Verbrauchsmaterialien/Plastikwaren wurden von Becton Dickinson, Düren; Nalge Nunc International, Wiesbaden; Eppendorf, Hamburg; Gilson, Den Haag, Niederlande; Sarstedt, Newton, USA und Corning Inc., New York, USA bezogen.

### 2.1.6 Plasmide

#### **p3'SS-EGFP-dimer lac repressor**

Dieser Vektor basiert auf dem p3'SS Vektor, einem Expressionsplasmid für den Wildtyp Lac-Repressor (Fieck, Wyborski et al. 1992). Durch spätere Verwendung als Fusionsprotein, z.B. mit GFP (Robinett, Straight et al. 1996; Tumber, Sudlow et al. 1999), ging der C-Terminus des Lac-Repressors verloren, wodurch dieser eher Dimere als Tetramere bildet (Chen and Matthews 1992). Der F9-1 Promotor ist ein schwacher Maus Polyoma-Virus Promotor.

#### **pBind**

pBind ist ein Vektor des Check Mate Mammalian Two Hybrid Systems (Promega). Dieser Vektor besitzt ein chimäres Intron, wodurch die Transkriptionseffizienz in Eukaryoten gesteigert wird.

#### **pCENP-B-DsRed**

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus dem Centromer-Binding-Protein CENP-B und DsRed und wurde freundlicherweise von H. Leonhardt, München zur Verfügung gestellt.

### **pCsRev-GFPsg143**

PCsRev-GFPsg143 stammt von dem Plasmid pFRED 143/Oligomaster ab und kodiert unter der Kontrolle eines CMV-Promotors für ein Fusionsprotein aus sRev und GFPsg143 (Ludwig, Silberstein et al. 1999).

### **pCTat**

pCTat kodiert unter der Kontrolle eines CMV-Promotors die Expression des 86-AS langen Tat-Proteins aus HXB3 (B. Cullen).

### **pCTatsg25**

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus dem 86-AS langen Tat und dem GFPsg25 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.

### **pFRED143/Oligomaster**

pFRED143 ist ein Expressionsplasmid für A.v. GFP unter einem veränderten CMV-Promotor. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde durch folgende Mutationen ca. 100fach gegenüber dem Wildtyp-GFP erhöht: T66C, Y107F, I168T, L232H.

### **pH2B-GFP und pH3-GFP**

Durch diese Plasmide werden das GFP-fusionierte Histon H2B bzw. H3 visualisiert, die uns freundlicherweise von T. Kanda zur Verfügung gestellt wurden (Kanda, Sullivan et al. 1998).

### **pL3Tat**

Dieser Vektor ist ein Tat-Expressionsplasmid mit der HIV-LTR als Promotor. Es kodiert für die 1-Exon-Variante von Tat mit 72 Aminosäuren. Sein Rückgrat stammt aus dem Plasmid pBR (Felber, Drysdale et al. 1990).

### **pLBR-YFP**

Von diesem Plasmid wird der Lamin B-Rezeptor kodiert, fusioniert an ein gelb-fluoreszierendes Protein (YFP), (Ellenberg and Lippincott-Schwartz 1999). Es wurde uns freundlicherweise von J. Ellenberg, Heidelberg zur Verfügung gestellt.

### **pLRedNES**

Der Vektor pLRed (Horst Wolff, GSF Neuherberg) kodiert für ein rotfluoreszierendes Protein aus *Discosoma spec.* (DsRed). Diese Sequenz befindet sich zwischen zwei LTR-Sequenzen aus dem HIV-Stamm HXB2. Das Rückgrat dieses Vektors stammt aus dem Plasmid pB37R (Ludwig, Silberstein et al. 1999). Durch Austausch der kodierenden Sequenz von DsRed



durch eine Kernexportsignal-enthaltende *DsRedNES* kodierende Sequenz entstand der Vektor pLRedNES.

### **pPOM121-(GFP)<sub>3</sub>**

Dieses Plasmid wurde uns von J. Ellenberg, Heidelberg zu Verfügung gestellt und kodiert für das Nuclear-Pore-Komplex Protein POM121, fusioniert an drei GFP-Moleküle (Daigle, Beaudouin et al. 2001).

### **pPS-8.8**

Dieses Plasmid stammt von einem veränderten pUC 18-Plasmid ab. Über einen Polylinker wurde mehrfach die Sequenz für Lac-Operatoren inseriert. Das Plasmid pPS-8.8 enthält 64x den Lac-Operator - die Erkennungssequenz für sein DNA-Binde-Protein Lac-Repressor (Robinett, Straight et al. 1996).

### **pSmB-CFP**

J. Sleeman, Dundee stellte uns dieses Plasmid zur Verfügung, das für den Spleißfaktor SmB, fusioniert an die kodierende Sequenz des cyan-fluoreszierenden Proteins (CFP) kodiert (Sleeman and Lamond 1999).

### **pSV40-Neo**

Durch einen Verdau mit XhoI und anschließender Religation des Plasmids pFRED 143/Oligomaster fällt die gesamte Genkassette für den CMV-Promotor und GFPsg143 heraus. Es entstand ein Plasmid, das unter der Kontrolle des SV40-Promotors das Resistenzgen für Neomycin reguliert.

### **pSV40-CFP**

Durch einen Verdau des Vektors pSV40-Neo mit BsaBI und BstBI wurde die Sequenz des Neomycin-Resistenzgens gegen die von CFP ausgetauscht.

### **Topo-*DsRed*<sub>olimut</sub>**

Die Sequenz von *DsRed*<sub>olimut</sub> unterscheidet sich in 3 Aminosäuren (R2A, K5E, K9T) von der ursprünglichen *DsRed*-Sequenz und erhält dadurch die Eigenschaft weniger zu oligomerisieren (H. Wolff, GSF Neuherberg).

### **Topo-YFP(F46L)**

Nach Mutagenese von eYFP wurde die Sequenz von YFP(F46L) in den Zwischenklonierungsvektor pCR2.1-Topo kloniert und diente dort als Ausgangsmaterial für weitere PCRs (A. Brebeck, GSF Neuherberg).

### **2.1.7 Oligonukleotide**

Oligonukleotide wurden entweder von Herrn U. Linzner, Institut für Experimentelle Genetik, GSF-Neuherberg oder von Metabion, Martinsried hergestellt. Die verwendeten Primer sind im Anhang unter 8.2 aufgelistet.

### **2.1.8 Antikörper**

#### **primäre Antikörper**

- Maus monoklonaler Antikörper gegen HIV Tat (Abcam, Cambridge, UK, ab24778), 1:100 bei Immunfärbung eingesetzt,
- Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen Histon H3, (Abcam, Cambridge, UK, ab1791), 2 µg bei ChIP eingesetzt,
- Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen trimethyliertes Histon H3K4, (Abcam, Cambridge, UK, ab8580), 2 µg bei ChIP eingesetzt,
- Ziege polyklonaler Antikörper gegen NFκB p50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA, SC-1190), 2 µg bei ChIP eingesetzt,
- Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen NFκB p65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA, SC-372), 2 µg bei ChIP eingesetzt,
- Maus monoklonaler Antikörper gegen RNA Polymerase II, (Active Motif, Rixensart, Belgien, #39097), 1:100 bei Immunfärbung eingesetzt,
- APC anti human CD4, direkt konjugiert, (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg), 1:5 bei Immunfärbung für FACS eingesetzt.

#### **sekundäre Antikörper**

- Ziege Alexa488 konjugierte Antikörper gegen Maus (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, #11001), 1:2000 bei Immunfärbung eingesetzt,
- Ziege Alexa488 konjugierte Antikörper gegen Kaninchen (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, #11008), 1:2000 bei Immunfärbung eingesetzt,
- Streptavidin, FITC markiert (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe).

## 2.1.9 Humane Zellen/Zelllinien

### HeLa BF

Humane epitheloide Zelllinie aus einem Cervix-Karzinom (B. Felber, National Cancer Institute-Advanced Bioscience Laboratories, Frederick, Md.).

### HeLa-Tat

Diese Zellen stammen von HeLa BF-Zellen ab. Sie exprimieren zusätzlich das HIV-1 Tat-Protein, das über den Vektor pL3Tat stabil in die Zellen gebracht wurde, wodurch diese zusätzlich eine G418-Resistenz erhalten haben (B. Felber, National Cancer Institute-Advanced Bioscience Laboratories, Frederick, Md.).

### PBMCs

Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) wurden frisch aus Blut isoliert. Zu PBMCs gehören überwiegend Lymphozyten und einige Monozyten.

## 2.1.10 Prokaryotische Zellen

### XL-10 Epicurian Coli<sup>®</sup>

*E. coli* Epicurian Coli<sup>®</sup> SoloPack<sup>™</sup> Gold kompetente/superkompetente/ultrakompetente Zellen zur chemischen Transformation (Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

### *E. coli* TOP 10 F'

Kompetente Bakterienzellen zur chemischen Transformation, im TOPO TA Cloning Kit enthalten (Invitrogen, Karlsruhe).

### MAX EFFICIENCY STBL 2<sup>®</sup> Competent Cells<sup>™</sup>

Diese *E. coli* sind ein Derivat des JM109-Stammes zur chemischen Transformation. Sie eignen sich besonders für die Klonierung von repetitiven und retroviralen Sequenzen (Invitrogen, Karlsruhe).

## 2.1.11 Spezielle Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems Inc., USA

Amira 3.1	TGS Inc., USA
AxioVision 4.5	Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos
CellQuest Pro	BD Biosciences, Düren
Endnote 6.0	Niles Software, USA
Gene Construction Kit 2.5	Textco Inc., USA
ImageJ 1.3.3u	Wayne Rasband, NIH, USA
LightCycler Software 3.5	Roche Molecular Biochemicals
LSM 510 Image Browser 2.3	Carl Zeiss, Göttingen
NCBI-Blast, Sequenzvergleich	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
NCBI-PubMed, Literaturrecherche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
OligoEd	AG BIODV, GSF-Neuherberg
Sequencher 4.2.2	Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA
Quantity One 2.4.1 Build 008	BioRad, München

### 2.1.12 Spezielle Geräte

- Cell Observer, Fluoreszenzmikroskop, Carl Zeiss, Jena mit einer Axiocam HR und folgenden verwendeten Filtersätzen und Objektiven:
  - Filtersatz Red „00“: Ex 530-585 FT 600, Em LP 615,
  - Filtersatz YFP „46“: Ex 500/20 FT 515, Em BP 535/30,
  - Filtersatz CFP „47“: Ex 436/20 FT 455, Em 480/40,
  - Filtersatz DAPI: Ex 360/40 FT 400, Em BP 460/50,
  - Filtersatz DsRed „15“: Ex 546/12 FT 580, Em LP 590,
  - Filtersatz GFP: Ex 475/40 FT 500, Em BP 530/50,
  - Plan Achromat 20x/0,75,
  - Plan Neofluar 40x/1,3, Öl-Immersion,
  - Plan Achromat 63x/1,4, Öl-Immersion.
- FACScalibur, Durchflusszytometrie, BD Biosciences, Düren
  - Anregungslaser: 488 nm, 15mW für FL-1, FL-2 und FL-3 und 635 nm für FL-4,
  - Fluoreszenzdetektoren: FL-1 (BP 530/30),  
FL-2 (BP 585/30),  
FL-3 (LP 650),  
FL-4 (LP 670).

- LightCycler, quantitative Real-Time-PCR mit LightCycler Software 3.5, Roche, Mannheim.
- Mikroinjektionsanlage FemtoJet, Eppendorf, Hamburg, integriert in ein Leica SP2 Konfokales Laser Scanning Mikroskop, Leica Mikrosystems, Bensheim.
- LSM 510, Konfokales Laser Scanning Mikroskop, Carl Zeiss, Jena
  - Anregungslaser 488 nm und 543 nm,
  - Emissionsfilter mehrfach variierbar,
  - Plan Neofluar 63x/1,25, Öl-Immersion.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden zur Klonierung

#### Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-Mini-Präparation wurde eingesetzt, um kleine Mengen an Plasmid-DNA aus einer großen Anzahl an Proben zu isolieren, um den Klonierungserfolg, z.B. nach einer Ligation, zu überprüfen. Dafür wurden einzelne Kolonien in 4 ml LB-Amp-Medium angeimpft und nach schüttelnder Inkubation bei 37°C am Folgetag die DNA mit dem NucleoSpin Plasmid Kit oder dem QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert. Dabei wurde den Herstellerangaben gefolgt.

Die Plasmid-Maxi-Präparation dagegen dient zur Isolierung größerer Mengen reiner Plasmid-DNA. Durch Animpfen von 200 µl einer Vorkultur in 200 ml LB-Amp-Medium und schüttelnder Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die DNA mit dem Nucleobond PC500-Kit, den Herstellerangaben folgend, gewonnen.

#### Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren

Im Anschluss an die Plasmid-Präparation wurde die Konzentration und Reinheit der präparierten DNA bestimmt. Dazu wurde eine 1:100 Verdünnung hergestellt und deren optische Dichte (OD) im Shimadzu UV-Vis Spektrometer bestimmt. Die gemessene  $OD_{260} \times 5$  für DNA und die gemessene  $OD_{260} \times 4$  für RNA gibt die Konzentration der Nukleinsäure in µg/µl an. Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt die Reinheit der Nukleinsäure an, wobei ein Wert  $>1,8$  anzustreben ist.

### **DNA-Restriktionsverdau**

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 500 ng-1 µg Plasmid-DNA eingesetzt und den Herstellerangaben folgend, der optimale mitgelieferte Puffer, bei Bedarf BSA und die empfohlene Menge Enzym (2 u) zugegeben. Die Inkubation erfolgte unter den Bedingungen, die für das Enzym optimal waren, für 1-2 Std.

Ein präparativer Restriktionsverdau unterschied sich durch die Menge eingesetzter DNA (5 µg), einem 10fachen Überschuss an Enzym (50 u) und einer Inkubationszeit von 3 Std. vom analytischen Restriktionsverdau.

### **Dephosphorylierung und Klenow-Reaktion**

Entstanden bei einem Restriktionsverdau kompatible Enden, mussten diese dephosphoryliert werden, um eine Religation bei einer weiteren Klonierung zu vermeiden. Entstanden dagegen überhängende Enden, obwohl für eine Klonierung blanke Enden benötigt wurden, wurden diese durch eine Klenow-Reaktion aufgefüllt. Konnte das Restriktionsenzym der vorangegangenen Reaktion Hitze-inaktiviert werden, konnte auf eine Umpufferung verzichtet werden. War diese jedoch nötig, wurde der Restriktionsansatz über Säulchen des NucleoSpin Extract II oder Qiaquick PCR purification Kit gereinigt.

Die anschließende Dephosphorylierung erfolgte den Herstellerangaben folgend durch Zugabe des entsprechenden Puffers, 1 u/µg DNA des Enzyms *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP) und 1-stündiger Inkubation bei 37°C.

Im Falle der Klenow-Reaktion wurde den aufzufüllenden DNA-Fragmenten mitgelieferter Puffer, 33 µM jedes dNTPs und 1 u/µg DNA Klenow-Fragment zugegeben. Die Inkubation erfolgte 30 Min. bei 25°C.

### **Ligation**

Die Ligation zweier DNA-Fragmente erfolgte mit dem Rapid DNA Ligation Kit unter Einsatz von DNA im Verhältnis 1:3 (Vektor:Insert) und Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur.

### **PCR zur DNA-Amplifikation**

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde aus mehreren Gründen angewandt. Zum einen als Anreicherung eines für die Klonierung benötigten Fragments, zum anderen zum Nachweis von genomischen DNA-Sequenzen oder zur qualitativen Analyse von Transkripten (cDNA). Wurden für eine Klonierung die Sequenzen von bestimmten Restriktionsendonukleasen benötigt, wurden diese durch überhängende Primer, die die Schnittsequenz im Überhang trugen, durch die PCR mitangefügt. Die Ansätze unterschieden sich prinzipiell nur in der Menge des Ausgangsmaterials und dem Endvolumen des Ansatzes. Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurden 50 ng in einem 25-50 µl-Ansatz eingesetzt. Für eine

PCR auf genomische DNA wurde 1 µg DNA in 100 µl Endvolumen verwendet. Und für eine PCR auf cDNA wurden 2 µl einer Reversen Transkriptions-Reaktion in 50 µl Endvolumen eingesetzt. Wurde das PCR-Produkt später für eine Klonierung benötigt oder kam es auf eine fehlerfreie Amplifikation der Sequenz an, wurde das Expand High Fidelity PCR System verwendet. Zur qualitativen Analyse von DNA-Fragmenten wurde der PCR Master Mix benutzt.

Im Folgenden ist ein typischer PCR-Reaktionsansatz aufgelistet:

x µl Ausgangsmaterial  
 200 µM dNTPs (10 mM Stocklösung)  
 2 mM MgCl<sub>2</sub> (50 mM Stocklösung)  
 0,5 µM 5' Primer (10 µM Stocklösung)  
 0,5 µM 3' Primer (10 µM Stocklösung)  
 PCR-Puffer (10x Stocklösung)  
 2 u Polymerase  
 ad Endvolumen *aqua dest.*

Es wurde folgendes Ausgangs-Programm benutzt. Die Annealing-Temperatur und Elongations-Dauer variierten je nach Schmelzpunkt der Primer und Länge des Amplifikats. So wurde die Annealing-Temperatur 5°C unter der Schmelztemperatur der Primer und eine Amplifikationsdauer von 1 Min. pro 1000 bp zu amplifizierender DNA gewählt. Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden meist 23-25 Zyklen eingesetzt, auf genomische DNA und cDNA 30-33 Zyklen:

94°C	5 Minuten	Denaturierung der DNA-Matrize	23-33 Zyklen
94°C	45 Sekunden	Denaturierung	
+/- 60°C	30 Sekunden	Bindung der Primer (Annealing)	
72°C	25-150 Sek.	Elongation	
72°C	10 Minuten	Vervollständigung der Elongation	
4°C	unbegrenzt	Lagerung	

Nach Beendigung der PCR wurde die Reaktion auf erfolgreiche Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments durch eine Gelelektrophorese überprüft.

### **Auffüllreaktion zweier überlappender Primer**

Das Auffüllen der freien Enden zweier überlappender Primer glich einer PCR-Reaktion mit nur drei Zyklen und wurde für die Synthese der mRFP-Sequenz benötigt. Im Folgenden sind der PCR-Ansatz und das Programm beschrieben, es wurde ebenso das Expand High Fidelity PCR System verwendet.

Ansatz:        125  $\mu$ M dNTPs (10 mM Stocklösung)  
                  2 mM MgCl<sub>2</sub> (50 mM Stocklösung)  
                  3  $\mu$ M 5' Primer (20  $\mu$ M Stocklösung)  
                  3  $\mu$ M 3' Primer (20  $\mu$ M Stocklösung)  
                  PCR-Puffer (10x Stocklösung)  
                  2 u Polymerase  
                  ad 100  $\mu$ l *aqua dest.*

Programm:

94°C	5 Minuten	Denaturierung der DNA-Matrize	3 Zyklen
94°C	45 Sekunden	Denaturierung	
60°C	2 Minuten	Bindung der Primer (Annealing)	
72°C	15 Minuten	Elongation	
72°C	10 Minuten	Vervollständigung der Elongation	
4°C	unbegrenzt	Lagerung	

### **Aufreinigung der PCR-Fragmente**

War das gewünschte Fragment amplifiziert und wurde für eine weitere Klonierung oder nachfolgende Reaktion benötigt, wurde das DNA-Fragment entweder über ein Säulchen oder aus dem Agarosegel zuvor von Nukleotiden, Enzymen und Primern gereinigt. Dazu wurde den Herstellerangaben entsprechend der NucleoSpin Extract II, der Qiaquick PCR purification Kit oder Qiaquick Gel Extraction Kit verwendet.

### **Zwischenklonierung der PCR-Produkte**

Die Zwischenklonierung eines PCR-Produkts in den Vektor pCR2.1-Topo erlaubt vor der Klonierung in den Zielvektor die Überprüfung der Sequenz des Amplifikats auf Fehler bei der PCR oder der Primersynthese. Die Klonierung von 1  $\mu$ l des PCR-Ansatzes in den Zwischenklonierungsvektor pCR2.1-Topo erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers des TOPO TA Cloning Kits.



### **Gerichtete Mutagenese von *DsRed*<sub>quick</sub>**

Die Sequenz von *DsRed*<sub>quick</sub> unterscheidet sich in sechs Aminosäuren von der *DsRed*-Sequenz. Die Mutagenese erfolgte mit dem Multi-Site directed Mutagenesis Kit. Die Aminosäureaustausche konnten über vier Mutageneseprimer (*Muta-DsRed*<sub>quick</sub>1-4) eingebaut werden. Diese wurden nach den Hilfestellungen des Herstellers zum Primer-Design entworfen und sind ebenfalls bei der Primer-Auflistung im Anhang zu finden (8.2). Ebenso wurde die Sequenz für Tat(K41A) mit einem Mutageneseprimer verändert. Zur erfolgreichen Mutagenese wurde strikt dem Protokoll gefolgt, das der Hersteller mitlieferte.

### **Neusynthese von mRFP**

33 Aminosäuren-Austausche unterscheiden die mRFP-Sequenz von der *DsRed*-Sequenz. Diese wurden durch eine PCR und PCR-strategische Neusynthese mutagenisiert. Die Sequenz von mRFP wurde an Aminosäure-Position 126 durch eine stille Mutation und dadurch entstehende KpnI-Schnittstelle geteilt. Der N-terminale Teil der Sequenz wurde durch zwei PCRs auf pLRed<sub>quick</sub>NES amplifiziert. Folgende Primer wurden benutzt: 5'-mRFP-1st-1 und mRFP-1st-1-3' für die erste PCR und mRFP-1st-2-3' und das PCR-Produkt der ersten PCR als 5'-Primer für die zweite PCR. Der C-terminale Teil der Sequenz wurde durch eine anfängliche Auffüllreaktion von zwei überlappenden Primern und zwei nachfolgenden PCRs mit überhängenden Primern erhalten. Die verwendeten Primer waren: 5'-mRFP-2nd-1 und mRFP-2nd-1-3'; 5'-mRFP-2nd-2 und mRFP-2nd-2-3'; 5'-mRFP-2nd-3 und mRFP-2nd-3-3'. Die Sequenzen sämtlicher Primer sind im Anhang 8.2 zu finden. Beide Fragmente wurden anschließend in den Zwischenklonierungsvektor pCR2.1-Topo kloniert und durch einen KpnI-Verdau und Ligation des N-terminalen Fragments in den ebenso geöffneten Vektor des C-terminalen Fragments zur Komplettssequenz vervollständigt.

### **Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente aus Restriktionsverdau oder PCR-Reaktionen wurden in Agarosegelen der Größe nach getrennt. Die Laufstrecke der DNA-Fragmente ist proportional zum Logarithmus ihrer Größe. Die Konzentration der Agarose wurde in Abhängigkeit der erwarteten Fragmentgröße gewählt. Für Fragmente der Größe 150-500 bp wurde ein 3% Agarosegel verwendet, für größere Fragmente weniger konzentrierte Gele (2,0- 0,8%). Um die DNA später sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid zugegeben (1 µl pro 100 ml Gel). Vor dem Auftragen der Proben wurde diesen Auftragspuffer zugegeben. Die Gele wurden in TAE-Laufpuffer einer Spannung von 80-100 V ausgesetzt.

Das Gel wurde dann in der ChemiDoc Geldokumentationsanlage kurz mit UV-Licht bestrahlt und das Bandenmuster dokumentiert.

### **Transformation kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA muss diese nach einer Ligation in Bakterien transformiert werden. Dafür wurde die chemische Transformation in *E. coli* Epicurian Coli SoloPack Gold kompetente Zellen benutzt. Für Plasmide, die die Operator-Sequenzen trugen, wurden die *E. coli* Zellen MAX EFFICIENCY STBL 2<sup>®</sup> Competent Cells<sup>™</sup> verwendet. Generell geschieht eine chemische Transformation über Permeabilisierung der Zellwand mit  $\beta$ -Mercaptoethanol, Anlagerung der Plasmid-DNA (2  $\mu$ l eines Ligationsansatzes bzw, 10 ng bei einer Retransformation), Hitzeschock und anschließender Kultivierung auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Resistenz-Antibiotikum zur Selektion Plasmid-tragender Bakterien. Die Transformationsprotokolle der verschiedenen Bakterien unterscheiden sich durch die Länge und Temperatur des Hitzeschocks, der zuzugebenden Menge SOC-Medium und die Inkubationstemperatur der Agar-Platten über Nacht. Es wurden hierbei die Angaben der Herstellerprotokolle berücksichtigt.

### **Langzeitkonservierung von Bakterien**

Von Bakterien, die ein richtiges kloniertes Plasmid tragen, wurden Glycerolkulturen angelegt, die über lange Zeit bei -80°C aufbewahrt werden können. Dazu wurden 10 ml einer großen Bakterien-Kultur pelletiert und in 1 ml Einfriermedium für prokaryotische Zellen resuspendiert. Nach mehrstündiger Inkubation bei 4°C wurden die Cryo Tubes<sup>™</sup> Vial in -80°C transferiert.

### **Sequenzierung**

Die Überprüfung von amplifizierten DNA-Sequenzen auf ihre Richtigkeit oder die Bestimmung unbekannter Sequenzen geschah entweder im Topo-Vektor, im Endvektor oder direkt am PCR-Produkt. Es wurden sämtliche Sequenzen, die für eine Klonierung verwendet wurden, nach ihrer Amplifikation sequenziert. Dies erfolgte ausnahmslos durch die Firma Sequiserve, Vaterstetten.

## **2.2.2 Zellkulturtechniken und Immunfärbung**

### **Kultivierung und Aussaat humaner Zellen**

Die Zelllinie HeLa BF und daraus entstandenen Zelllinien HeLa-Indi wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden in Flaschen (Nunc Solo Flask 75 cm<sup>2</sup>) mit 12 ml des entsprechenden Zellkulturmediums kultiviert. Waren die Zellen zu 80-90% konfluent, wurden diese passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA vom Boden gelöst. Die Zellen wurden in

Medium resuspendiert und 1:20 in frisches Zellkulturmedium überführt. Auf diese Weise wurden die Zellen maximal 30 Mal passagiert, um Veränderungen in der Population zu vermeiden und konstante Bedingungen beizubehalten.

Sollten Zellen ausgesät und anschließend transfiziert werden, wurde nach der Resuspendierung der Zellen in frischem Medium über eine Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 6-well-Platten bzw. 35 mm Schälchen ausgesät, für 60 mm Schälchen wurden  $3 \times 10^5$  und für 15 cm Schälchen  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet. Wurden die Zellen für Präparate zum Mikroskopieren benötigt, wurden mit Ethanol gereinigte Deckgläschen in 35 mm Schälchen gelegt und die Zellen darauf ausgesät. Die Transfektion erfolgte am darauf folgenden Tag.

### **Gewinnung von PBMCs aus frischem humanem Blut und deren Transfektion**

Die Blutabnahme erfolgte direkt in die BD CPT Vacutainer Röhrrchen. Diese wurden im Anschluss bei 1500g 15 Min. abzentrifugiert. Der PBMCs-enhaltende Überstand wurde in ein Falcon Röhrrchen umgeschüttet und mit RPMI-Medium auf 15 ml aufgefüllt. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit RPMI-Medium. Der Gehalt eines Vacutainer Röhrrchens wurde final in 5 ml RPMI-Medium aufgenommen. Zur Transfektion von frischen PBMCs wurde der Nukleofector von Amaxa mit dem entsprechenden Primary human T-Cell Kit und dem Programm U14 benutzt. Direkt im Anschluss an die Isolierung der Zellen wurde die Zellzahl über eine Zählkammer bestimmt und  $1,5 \times 10^6$  Zellen und 5  $\mu\text{g}$  DNA pro Nukleofektion eingesetzt. Zur Indikatorgenexpression wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{g}$  plndi und entweder 4  $\mu\text{g}$  pFRED/oligomaster oder pCTatsg25 transfiziert. Die Zellen wurden in 6-well-Platten mit RPMI-Medium überführt und 15 Std. bei 37°C und hoher Luftfeuchte inkubiert.

### **Transfektion von HeLa-Zellen**

Um Fremd-DNA in HeLa-Zellen zu bringen, wurde das FuGENE™6-Transfektionsreagenz dem Herstellerprotokoll folgend verwendet. In folgender Tabelle sind die transfizierten Plasmid-DNA-Mengen der einzelnen Versuche aufgelistet.

<b>Experiment</b>	<b>Menge Plasmid</b>	<b>Anzahl ausgesäter Zellen</b>	<b>Zellkulturgefäß</b>
Referenzpunkte	je 500 ng	$1 \times 10^5$	35 mm + Deckglas
Episomale Indikatorgenexpression	250 ng plndi +/- 500 ng pL3Tat	$1 \times 10^5$	35 mm + Deckglas, 6-well-Platte
Trunkierte LTRs	je 250 ng plndi 100 ng pFRED143/ Oligomaster +/- 500 ng pL3Tat	$1 \times 10^5$	6-well-Platte

Zelllinien Indikatorgenexpression	+/- 500 ng pL3Tat	$1 \times 10^5$	35 mm + Deckglas, 6-well-Platte
Visualisierung „Gene Tag“ Zelllinien	500 ng „Gene Tag“ +/- 500 ng pL3Tat	$1 \times 10^5$	35 mm + Deckglas
Visualisierung „Gene Tag“ episomal	250 ng pIndi 500 ng „Gene Tag“ +/- 500 ng pL3Tat	$1 \times 10^5$	35 mm + Deckglas
RNA-Isolierung Zelllinien	+/- 1,5 µg pL3Tat	$3 \times 10^5$	60 mm
RNA-Isolierung episomal	750 ng pIndi +/- 1,5 µg pL3Tat	$3 \times 10^5$	60 mm
Colokalisation	250 ng pIndi 500 ng mRFP-LacI +/- 500 ng pL3Tat	$1 \times 10^5$	35 mm + Deckglas
ChIP Zelllinie	+/- 2,5 µg pCTat	$5 \times 10^6$	15 cm
ChIP episomal	2,5 µg pIndi +/- 2,5 µg pCTat	$5 \times 10^6$	15 cm
Tat(K41A) Mikroskopie	+/- 500 ng pCTat bzw. pCTat(K41A)	$1 \times 10^5$	35 mm + Deckglas
Tat(K41A) RNA-Isolierung	+/- 1,5 µg pCTat bzw. pCTat(K41A)	$3 \times 10^5$	60 mm
Tat und Rev RNA-Isolierung	1,5 µg pCTat 750 ng pC-sRev- GFPsg143	$3 \times 10^5$	60 mm

### Herstellung der stabilen Zelllinien HeLa-Indi

Zur Herstellung der stabilen HeLa-Indi-Zelllinien wurden HeLa-Zellen in kleine Zellkulturflaschen (Nunc Solo Flask 25 cm<sup>2</sup>) ausgesät und mit 2 µg des Indikatorgen-Plasmids mit dem FuGENE™6-Transfektionsreagenz transfiziert. Waren die Zellen zwei Tage gewachsen und 80% konfluent, wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst, in Selektionsmedium (Zellkulturmedium + 0,5 mg/ml Geneticin) aufgenommen und in kleinen Zellkulturflaschen weiterkultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Waren die Zellen einige Zeit in Kultur, sollten nur noch die Zellen leben, die das Plasmid ins Genom integriert hatten.

Eine klonale Zelllinie wurde durch Vereinzeln der Zellen erhalten, indem die Zellen so verdünnt wurden, dass rechnerisch eine Zelle in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und vermehrt wurde.

### **Langzeitkonservierung von humanen Zellen**

Damit eukaryotische Zellen längere Zeit gelagert werden können, werden sie in speziellem Medium in flüssigem Stickstoff eingefroren. Jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen wurden abzentrifugiert und in 1 ml Einfrier-Medium aufgenommen. Die Suspension wurde in ein Cryo Tubes™ Vial überführt und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

### **Fixierung, Immunfärbungen und Versiegelung der Präparate**

Adhärenz wachsende HeLa-Zellen wurden direkt im Zellkulturgefäß mit Deckgläschen fixiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 3,7% Formaldehyd in PBS überschichtet und 10 Min. bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit 0,01% PBS-Tween gewaschen. Folgte eine intrazelluläre Immunfärbung wurden die Zellen durch Inkubation für 2 Min. in 0,2% PBS-Triton für die Antikörper zugänglich gemacht. Es folgte wieder ein Waschschrift mit PBS und anschließende Gegenfärbung der DNA mit Hoechst 33342 oder DAPI für 2-5 Min. Wiederum wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen. Es wurde stets eine Negativ-Kontrolle mit nur dem Sekundär-Antikörper mitgeführt.

Die Immunfärbungen erfolgten durch Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen in PBS verdünnten primären Antikörper für 1 Std. bei Raumtemperatur. Zwischen der Inkubation mit dem sekundären Antikörper, die identisch zur Primäantikörper-Inkubation erfolgte, wurde ausgiebig mit PBS gewaschen. Waren die Zellen auf Deckgläschen ausgesät, wurden diese nach dem finalen Waschen mit PBS mit 10  $\mu\text{l}$  Vectashield und Nagellack auf Objektträgern fixiert und versiegelt. Diese Präparate wurden bei  $4^\circ\text{C}$  kurzzeitig oder bei  $-20^\circ\text{C}$  längerfristig aufbewahrt.

Die Immunfärbung der frisch isolierten PBMCs erfolgte durch Abzentrifugieren der Zellen, Resuspendierung in 3,7% Formaldehyd und Inkubation für 20 Min. bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden schließlich wieder abzentrifugiert und 1 x in PBS gewaschen und das Oberflächenprotein CD4 durch Antikörperzugabe und Inkubation für 2 Std. bei  $4^\circ\text{C}$  gefärbt. Nach der Immunfärbung wurden die Zellen nochmals in PBS gewaschen und waren somit fertig für die FACS-Analyse.

### **2.2.3 FISH**

#### **Fixierung von HeLa-Zellen für eine 3D FISH**

Die Zellen wurden auf Deckgläschen dünn ausgesät und am nächsten Tag 10 Min. in 4% Paraformaldehyd fixiert. Für 2 Min. wurde 0,5% Triton X in PBS zugegeben, anschließend wurden die Zellen 3 x 5 Min. mit 0,05% Triton X in PBS gewaschen. Es folgte eine 20

minütige Inkubation bei Raumtemperatur in 0,5% Triton X in PBS zur Permeabilisierung der Zellen. Die Deckgläschen wurden in 20% Glycerol in PBS überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte eine 4-malige Wiederholung des Gefrierens der Präparate durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff und kurzes Auftauen zwischen den Schritten. Wiederum wurde ausgiebig 3 x 5 Min. in 0,05% Triton X in PBS gewaschen. Die Inkubation in 0,1N HCL erfolgte exakt 10 Min., anschließend wurde das Präparat durch Inkubation für 2 x 1 Min. in 2xSSC äquilibriert. Mindestens 30 Min. (besser mehrere Tage) wurde das Präparat in 50% Formamid/2xSSC bei 4°C gelagert. Die Pepsinierung des Präparates erfolgte erst nach der Lagerung in 50% Formamid/2xSSC und geschah durch Inkubation der Deckgläschen für 5 Min. in 2xSSC, Überführung in PBS und 4-6 minütige Inkubation in der Pepsinlösung. Anschließend wurde das Präparat 2 x 5 Min. in PBS/MgCl<sub>2</sub> inkubiert und 10 Min. in 1% Paraformaldehyd postfixiert. Es wurde 1 x 5 Min. in PBS und 2 x 5 Min. in 2xSSC gewaschen und für mindestens 30 Min. in 50% Formamid inkubiert und gelagert. Die Deckgläschen mit den Zellen waren somit bereit für die Hybridisierung.

### **Metaphasenspreitung für eine 2D FISH**

Für eine 2D FISH wurden die Zellen ausgesät und am Folgetag auf die Metaphasenspreitung vorbereitet. Dazu wurde 1 Std. vor der Ernte der Zellen eine 1:80 Verdünnung Colcemid (10 µg/ml Stocklösung) ins Medium zugegeben und die Zellen weiter bei 37°C kultiviert. Zur Ernte der Zellen wurden diese trypsiniert und in Medium aufgenommen abzentrifugiert (10 Min. 1000 U/Min.). Der Überstand wurde bis auf 5 ml abgenommen und die Zellen darin resuspendiert. Die Suspension wurde vorsichtig gevortext und dabei mit 37°C warmem 0,56% KCl auf 40 ml tropfenweise aufgefüllt. Es folgte ein Inkubationsschritt im 37°C Wasserbad für 15 Min. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 U/Min. wurde der Überstand wiederum bis auf 5 ml verworfen und die Zellen darin resuspendiert. Diese Suspension wurde mit Fixativ unter vorsichtigem Vortexen auf 40 ml aufgefüllt und daraufhin mindestens 30 Min. bei -20°C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt wie oben, der Überstand wurde bis auf 2 ml verworfen und das Zellpellet darin resuspendiert. Ausgiebiges Waschen erfolgte nun durch mehrmaliges Abzentrifugieren, mit Fixativ auf 10 ml auffüllen und Einfrieren bei -20°C. In der Zwischenzeit wurden gesäuberte Objektträger in einer Box im Wasserbad auf 55°C äquilibriert, auf die die Zellen aufgetropft wurden. Diese wurden für einige Sekunden inkubiert und anschließend durch eine aufsteigende Ethanolreihe (je 5 Min. in 70%, 90% und 100% Ethanol) und 2-stündiges Backen bei 60°C gealtert. Die Pepsinierung erfolgte für 5 Min. in 37°C Pepsinlösung und wurde mit 3 x 5 Min. Waschen in PBS beendet. Das Präparat wurde zuletzt einer aufsteigender Ethanolreihe (je 5 Min. in 70%, 90% und 100% Ethanol) unterzogen und nach dem Lufttrocknen mit Silikagel-Kügelchen bei -20°C gelagert.

### Sonden-Markierung

Die Sonden wurden durch eine modifizierte „degenerate oligonucleotide primers PCR“ DOP2/3-PCR oder Nicktranslation amplifiziert und/oder markiert. Im Folgenden sind die Ansätze und PCR-Programme aufgelistet. Die Sonde für #1q wurde über Nicktranslation Biotin-markiert, der BAC wurde über DOP2/3-PCR TAMRA markiert.

#### Primäre DOP2- bzw. 3-PCR:

50-200 ng Ausgangs-DNA  
 10 µl Puffer D (5x Stocklösung), (Amersham)  
 2 µM DOP2- bzw. DOP3-Primer (MWG-Biotech)  
 0,1% Detergenz W1 (GIBCO)  
 200 µM dNTPs (Roche)  
 2 u Polymerase (Amersham)  
 ad 50 µl *aqua dest.*

#### Markierungs-DOP2- bzw. 3-PCR:

2 µl PCR-Produkt der primären PCR  
 10 µl CetusII-Puffer (Amersham)  
 1,7 µM DOP2- bzw. DOP3-Primer  
 100 µM ACG-Mix (Roche)  
 80 µM dTTP (Roche)  
 20 µM Bio-dUTP (Molecular Probes)  
 2 u Polymerase (Amersham)  
 ad 50 µl *aqua dest.*

#### Programm primäre DOP2/3-PCR:

96°C	3 Minuten	Denaturierung der DNA-Matrize	
94°C	90 Sekunden	Denaturierung	
30°C	2,5 Minuten	Bindung der Primer (Annealing)	10 Zyklen
72°C	3 Minuten	Elongation	
94°C	60 Sekunden	Denaturierung	
62°C	90 Sekunden	Bindung der Primer (Annealing)	30 Zyklen
72°C	2 Minuten	Elongation	
72°C	10 Minuten	Vervollständigung der Elongation	

#### Programm für Markierungs-DOP2/3-PCR:

40°C	2 Minuten		
94°C	3 Minuten	Denaturierung der DNA-Matrize	
94°C	60 Sekunden	Denaturierung	
56°C	60 Sekunden	Bindung der Primer (Annealing)	25 Zyklen
72°C	30 Sekunden	Elongation	
72°C	5 Minuten	Vervollständigung der Elongation	
4°C	unbegrenzt	Lagerung	

Ansatz für die Nicktranslation:

2 µg DNA  
10 µl NT-Puffer (Sigma)  
10 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol (Sigma)  
10 µl dNTPs (Roche)  
4 µl TAMRA-dUTP (Molecular Probes)  
2 µl DNaseI (1:250 Stocklösung), (Roche)  
2 µl Polymerase I (Roche)  
ad 100 µl *aqua dest.*

Der Nicktranslations-Ansatz wurde für 90 Min. bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion konnte vorläufig durch Einfrieren gestoppt werden. Der Erfolg der Reaktion wurde auf einem Agarosegel überprüft und anschließend final durch Zugabe von EDTA gestoppt.

### **Hybridisierungsmixe, Hybridisierung und Detektion**

Die ideale DNA-Konzentration in einem Hybridisierungsmix liegt bei 20-30 ng/µl Sonde. Zugegeben wird ein 20-50facher Überschuss an Cot-1-DNA (1µg/µl), als Trägermaterial dient Heringsperma-DNA. Die DNA wird durch eine Ethanol gefällt und anschließend in Formamid und Dextran aufgenommen. Im Folgenden ist solch ein typischer Ansatz gezeigt:

100 µl der TAMRA-Nicktranslation  
10 µl Cot-1-DNA  
10 µl der Chromosom 1q-Biotin-DOP-PCR  
1 µl Heringsperma-DNA

Zugabe von 355 µl Ethanol (2,5fache Volumen), Inkubation für 30 Min. bei -20°C und Zentrifugation für 30 Min. bei 13000 U/Min. Das Pellet wurde getrocknet und in 1,5 µl Formamid (100%) und 1,5 µl Dextransulfat (20% in 2xSSC) resuspendiert.

Die Hybridisierung der Metaphasenspreitungen erfolgte als mit Fixogum eingedecktes Präparat durch Denaturierung der Präparate für genau 90 Sek. bei 75°C und anschließender Inkubation bei 37°C für 24 Std. Für die 3D-FISH wurden die Präparate 2 Min. bei 76°C denaturiert und für 48 Std. bei 37°C inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläschen der Präparate abgenommen und 2 x 3 Min. bei 37°C in 2xSSC und 3 x 5 Min. bei 60°C in 0,1xSSC gewaschen. Zuletzt wurde das Präparat kurz bei 37°C mit 4xSSC äquilibriert.



Im Anschluss erfolgte die Detektion des Biotin-markierten dUTP durch einen Nachweis mit markiertem Streptavidin. Dafür wurden die Präparate 20 Min. mit Blocklösung bei 37°C schüttelnd geblockt und für 40 Min. mit dem in Blocklösung verdünnten Streptavidin bei 37°C in einer dunklen feuchten Kammer inkubiert. Mit 4xSSC/Tween wurde 3 x 5 Min. gewaschen und anschließend mit DAPI in 4xSSC/Tween gefärbt. Die Deckgläschen wurden in Vectashield mit Nagellack auf Objektträgern versiegelt.

## **2.2.4 Genomische DNA-Methoden**

### **Isolierung genomischer DNA aus humanen Zellen**

Zur Gewinnung genomischer DNA aus HeLa-Zellen wurden diese kultiviert, die Zellzahl beim Passagieren bestimmt und  $5 \times 10^6$  Zellen für die Isolierung eingesetzt. Diese erfolgte strikt nach dem Herstellerprotokoll des Qiaamp DNA Mini Kit. Die genomische DNA wurde bei -20°C gelagert. Die Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bestimmt.

### **Southern Blot**

10 µg genomischer DNA der Zelllinien wurden durch einen präparativen Verdau mit EcoRV, KpnI oder DraI geschnitten. Die Fragmente wurden in einem 1%-Gel für 11 Std. bei 40V durch eine Gelelektrophorese in TBE-Puffer aufgetrennt. Nach Dokumentation des Gels wurde dieses 60 Min. in Transfer Puffer geschüttelt und anschließend über Nacht durch einen Blot-Aufbau mit Transfer Puffer auf eine Hybond N<sup>+</sup>-Membran gebracht. Die Membran wurde anschließend 5 Minuten in Neutralisierungslösung geschüttelt und in Whatman Papier 60 Min. bei 60°C getrocknet. Wurde mit einer radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert, wurde die Hybridisierungslösung für 10 Min. in einem Wasserbad gekocht und anschließend die Membran in der Glasröhre 24 Std. bei 65°C rotierend prähybridisiert. Die Prähybridisierung erfolgte bei einer Alkalischen-Phosphatase-markierten Sonde für 6 Std. bei 55°C im mitgelieferten Hybridisierungspuffer. Die Markierung der Sonden erfolgte laut Herstellerprotokoll für die radioaktive Sonde mit dem Megaprime DNA Labelling Kit, dCTP für <sup>32</sup>P-dCTP und folgender Aufreinigung über Bio-Spin 30 Säulchen und für die enzymatisch-markierte Sonde mit dem Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System, CDP-Star. Die markierten Sonden wurden in die Hybridisierungslösung der Prähybridisierung pipettiert und für weitere 24 Std. bei oben angegebenen Bedingungen inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen gewaschen. Die radioaktiv-hybridisierte Membran wurde 5 Min. bei Raumtemperatur in Waschlösung 1 und weitere 30 Min. bei 65°C in Waschlösung 2 gewaschen. Die enzymatisch-hybridisierte Membran wurde 2 x 15 Min. bei 55°C mit Waschpuffer 1 und 2 x 5 Min. bei Raumtemperatur mit Waschpuffer 2 gewaschen.

Die Detektion erfolgte für die radioaktive Membran durch Auflegen eines Hyperfilm ECL und Inkubation der Filmkassette für 72 Std. bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . die enzymatisch-markierte Membran wurde nach Zugabe des Substrates für 3 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit einem Agfa-Entwickler.

### **Ligation-vermittelte PCR (LM-PCR) zur Bestimmung von Integrationsorten**

Diese Methode basiert auf einer von einem biotinylierten Primer ausgehender Primer-Extension mit anschließender Anreicherung über Streptavidin-konjugierte magnetische Kugeln, der Ligation einer Linker-Kassette und zwei folgenden verschachtelten PCRs.

Zuerst musste die Linker-Kassette hybridisiert werden. Dazu wurden jeweils  $25\ \mu\text{l}$  Linker+ und Linker- ( $100\ \mu\text{M}$  Stocklösung) in einem  $50\ \mu\text{l}$  Ansatz vereint und 5 Min. bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Der Ansatz wurde dann zu  $70^{\circ}\text{C}$  transferiert und langsam abgekühlt. Es folgte eine 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur mit anschließender langsamen Abkühlung auf  $4^{\circ}\text{C}$  und Inkubation für 12 Std. bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Die hybridisierte Linker-Kassette wurde aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

$1\ \mu\text{g}$  der zu analysierenden genomischen DNA wurde mit 5 u MseI für 2 Std. in einem  $50\ \mu\text{l}$  Ansatz geschnitten und anschließend Hitze-inaktiviert. Es folgte eine Standard-Ethanol-Fällung der DNA, die in  $37\ \mu\text{l}$  *aqua dest.* aufgenommen wurde.  $35\ \mu\text{l}$  wurden in einer Primer-Extension-Reaktion mit  $50\ \mu\text{l}$  Endvolumen eingesetzt. Der Ansatz entsprach einem PCR-Ansatz mit nur dem einen Primer 5'-Bio-LMP-1 ( $2,5\ \mu\text{l}$  einer  $0,1\ \mu\text{M}$  Lösung). Der Ansatz wurde 5 Min. bei  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 Min.  $64^{\circ}\text{C}$  und 15 Min. bei  $72^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend mit dem Qiaquick PCR purification Kit gereinigt und mit  $42\ \mu\text{l}$  *aqua dest.* eluiert. Es folgte die Anreicherung über Dynabeads, wozu  $20\ \mu\text{l}$  der magnetischen Kügelchen wie im Herstellerprotokoll immobilisiert und in  $40\ \mu\text{l}$  Binding Solution aufgenommen wurden.  $30\ \mu\text{l}$  der Primer-Extension wurden dazugegeben und 3 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Waschen erfolgte nach Protokoll, die Kügelchen wurden final in  $7\ \mu\text{l}$  *aqua dest.* aufgenommen.  $1\ \mu\text{l}$  Linker-Kassette wurden an  $7\ \mu\text{l}$  DNA-Kügelchen mit dem Rapid DNA Ligation Kit 1 Std. bei Raumtemperatur schüttelnd ligiert. Der Ligationsansatz wurde mit  $100\ \mu\text{l}$  *aqua dest.* über den Magneten gewaschen und in  $10\ \mu\text{l}$  *aqua dest.* aufgenommen.  $2\ \mu\text{l}$  davon wurden in die PCR eingesetzt, die einem Standard- $50\ \mu\text{l}$ -PCR-Ansatz entsprach, wobei jeweils  $2,5\ \mu\text{l}$  der Primer LMP-2 ( $10\ \mu\text{M}$  Lösung) und LSP-1 ( $10\ \mu\text{M}$  Lösung) verwendet wurden. Die Amplifikation erfolgte über 30 Zyklen mit 1 Min.  $95^{\circ}\text{C}$ , 45 Sek.  $58^{\circ}\text{C}$  und 90 Sek.  $72^{\circ}\text{C}$ . Die zweite PCR entsprach der vorangegangenen unter der Verwendung der Primer LMP-3 und LSP-2, es wurde  $1\ \mu\text{l}$  der ersten PCR als Template eingesetzt. Das Amplifikat wurde in einem 1,5%-Gel durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt, die entsprechende Bande mit dem Qiaquick Gel extraction Kit aus dem Gel extrahiert und direkt

sequenziert. Durch eine Sequenzabgleich mit der Datenbank wurde die genomische Sequenz der umliegenden DNA identifiziert.

## 2.2.5 RNA-Methoden

### RNA-Isolierung aus humanen Zellen

Die Gesamt-RNA aus Zelllinien und transfizierten Zellen wurde mit dem Qiaquick RNeasy Kit gewonnen. Dabei wurden  $5 \times 10^6$  Zellen entsprechend dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Der optionale DNase-Verdau wurde immer für 30 Min. bei Raumtemperatur auf dem Säulchen inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration bestimmt und nach Zugabe von  $1 \mu\text{l}$  RNAsin die gewonnene RNA bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Reinheit der RNA wurde grundsätzlich durch eine PCR auf  $1 \mu\text{g}$  RNA auf DNA-Kontamination mit RPII-Primern getestet. Konnte ein PCR-Amplifikat detektiert werden, wurde die RNA mit dem Qiaquick RNeasy Mini Kit und dem darin enthaltenen Aufreinigungsprotokoll gereinigt.

### Reverse Transkription

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte entweder mit dem SuperScript First Strand Synthesis System für RT-PCR oder der M-MLV Reverse Transcriptase RNaseH Minus, Point Mutant. Es wurden grundsätzlich  $2 \mu\text{g}$  RNA in einem finalen Endvolumen von  $20 \mu\text{l}$  durch Random-Hexamer-Primer umgeschrieben und sämtliche Kontrollen ohne Enzym mitgemacht (No-RT-Kontrollen). Der optionale Schritt zum Verdau der RNA mit RNaseH erfolgte ausnahmslos.

Auch nach diesem Schritt wurde die Reinheit der cDNA auf Kontamination mit genomischer DNA getestet. Dies geschah durch eine PCR auf  $2 \mu\text{l}$  der No-RT-Kontrollen mit RPII-Primern. Konnte hierbei noch genomische DNA detektiert werden, wurde die Ausgangs-RNA mit dem Qiaquick RNeasy Mini Kit und dem darin enthaltenen Aufreinigungsprotokoll gereinigt.

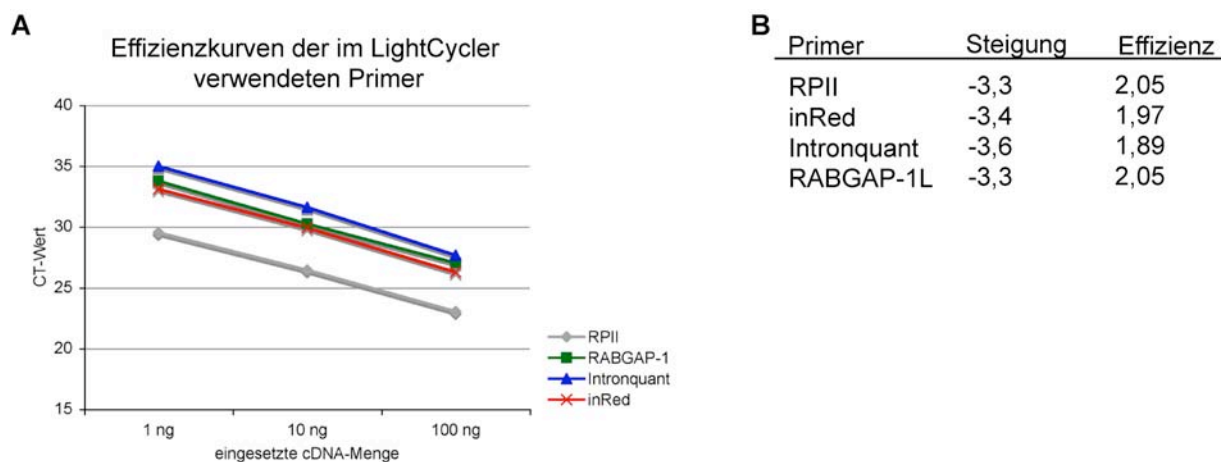
## 2.2.6 Real-Time PCR

Eine Möglichkeit um die Mengen von einem DNA- oder RNA-Ausgangsmaterial quantitativ zu bestimmen ist die Real-Time-PCR. Bei dieser Methode wird der Amplifikationsverlauf eines Templates über die Zeit verfolgt, indem die Fluoreszenz gemessen wird, die von dem Farbstoff SYBR Green abgegeben wird, nachdem er sich an die kleine Furche doppelsträngiger DNA angelagert hat. Anschließend wird der CT-Wert errechnet und es

kann auf die Menge des Ausgangsmaterials zurück geschlossen werden. Der CT-Wert gibt den „*crossing point*“ an, den Zyklus, an dem ein festgelegter Schwellenwert an Amplifikat erreicht wurde. Je höher der CT-Wert, desto weniger Template war im Ausgangsmaterial.

### Primertests

Um eine verlässliche und vergleichbare Quantifizierung zu bekommen, müssen sämtliche verwendeten Primer auf den Ausgangsproben auf ihre Amplifikation und deren Effizienz getestet werden. Die zur Berechnung benötigte Steigung wurde durch drei Verdünnungen von cDNA aus HeLa-Indi.II9-Zellen erhalten. Im folgenden Graphen ist der Primertest für die Primerpaare RPII, RABGAP-1L, Intronquant und inRed (Abb. 8A) und die daraus erhaltene Steigung und errechnete Effizienz tabellarisch (Abb. 8B) gezeigt. Eine optimale Steigung von -3,3 würde in einer optimalen Effizienz von 2 resultieren, weshalb gilt:  $-3,6 > \text{Steigung} > -3,1$ . Die Effizienz wird nach der Formel  $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$  berechnet. Nach diesen Läufen wurde überprüft, ob die Primer auch spezifisch nur ein Produkt amplifizieren. Dies geschah zum einen durch Analyse der Schmelzkurve und durch Auftragen der Proben auf ein Agarosegel. Es konnte sichergestellt werden, dass alle verwendeten Primer ein spezifisches Produkt mit vergleichbarer Länge gleich effizient amplifizierten.



### Abbildung 8

**Effizienzen der im LightCycler verwendeten Primerpaare.** **A)** Darstellung der Steigung der Effizienzkurve bei drei verschiedenen Verdünnungen von HeLa-Indi.II9-cDNA. **B)** Tabellarisch gelistet die Steigung und die Effizienz der Primerpaare.

### Standardisierung auf RNA Polymerase II

Basierend auf der Veröffentlichung von Radonic *et al.* wurde das House-Keeping-Gen RNA Polymerase II (RPII) als Standard gewählt (Radonic, Thulke et al. 2004). Ein Fragment der RNA Polymerase II wird über die Primer RPIIs und RPIIs amplifiziert. Das heißt, dieses

Primerpaar wurde immer mit in die Analyse aufgenommen und später die CT-Werte der Proben auf den CT-Wert von RPII standardisiert, indem der  $\Delta$ CT-Wert errechnet wurde.

### Vergleichende Expressionslevel

Bei der Auswertung der erhaltenen Daten gibt es zwei Möglichkeiten: die relative und die absolute Quantifizierung. Hierbei wird zum einen die Berechnung des vergleichenden Expressionslevel, zum anderen die Molekülanzahl des Ausgangsmaterials unter Einbeziehung einer erstellten Standardkurve für das zu quantifizierende Primerpaar herangezogen. Für die Berechnung der Induktion des Reportergens und der Intron-Quantifizierung wurden hier die vergleichenden Expressionslevel herangezogen. Bei dieser Methode ist es wichtig, dass die verwendeten Primerpaare bei der Amplifikation die gleiche Effizienz besitzen. Die vergleichenden Expressionslevel werden nach der Formel  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  berechnet, wobei sich  $\Delta$ CT aus der Differenz des CT-Werts der Probe und des CT-Werts des Standards (RPII) ergibt. Der  $\Delta\Delta$ CT-Wert errechnet sich aus der Differenz der beiden  $\Delta$ CT-Werte der zwei zu vergleichenden Proben, wie z.B. Tat-induziert und nicht-induziert oder Transkripte gesamt und Transkripte intron-haltig (Livak and Schmittgen 2001).

### LightCycler-Ansatz und Amplifikations-Programm

Es wurde für alle Ansätze der LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit verwendet und 18  $\mu$ l des folgenden Master-Mixes in die Glaskapillaren vorgelegt und 2  $\mu$ l der revers transkribierten RNA (cDNA) zupipettiert.

Ansatz: 1  $\mu$ l 5'-Primer (10  $\mu$ M Stocklösung)  
 1  $\mu$ l 3'-Primer (10  $\mu$ M Stocklösung)  
 2  $\mu$ l Puffer  
 1,6  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>  
 12,4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Die Amplifikation und Quantifizierung erfolgte mit folgendem experimentellen Programm:

	Temperatur	Zeit	Steigung Temperatur	Zyklusanzahl	Aquisitions- Modus
<b>Denaturierung</b>	95°C	600 Sek.	20°C/Sek.	1	keiner
<b>Amplifikation</b>	95°C	10 Sek.	20°C/Sek.	45	keiner
	60°C	5 Sek.	20°C/Sek.	45	keiner
	72°C	10 Sek.	20°C/Sek.	45	single
<b>Schmelzkurve</b>	95°C	0 Sek.	20°C/Sek.	1	keiner

	65°C	15 Sek.	20°C/Sek.	1	keiner
	95°C	0 Sek.	0,1°C/Sek.	1	kontinuierlich
<b>Kühlung</b>	40°C	30 Sek.	20°C/Sek.	1	keiner

## 2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

### Bildaufnahmen

Die Bildaufnahmen der Referenzstrukturen wurden am LSM 510 mit folgenden Einstellungen vorgenommen: Bildgröße: 512 x 512; Scan Mode: 8 Bit Scan; Zoomfaktor: 2-5, Z-Stack.

Alle anderen Aufnahmen wurden mit dem Cell Observer unter folgenden Einstellungen aufgenommen: Bildgröße: 1024 x 1024, 12 Bit, Auto-Expositionszeiten, auf 6% gedämpfte Fluoreszenz. Der Nachweis der „Gene Tag“ markierten Indikatorgene erfolgte mit 2 x 2 Binning.

Für die Colokalisations-Untersuchungen wurden Zellen mit einem Signal des episomalen Clusters gesucht, auf dieses Cluster fokussiert und die gewünschten Kanäle aufgenommen.

### Bildbearbeitung

Die exportierten Tif-Bilder wurden, wenn nötig, in 8 Bit-Bilder umgewandelt und zu Darstellungszwecken in Photoshop oder ImageJ bearbeitet. Die 3D-Rekonstruktion der Referenzstrukturen erfolgte mit Amira-Software.

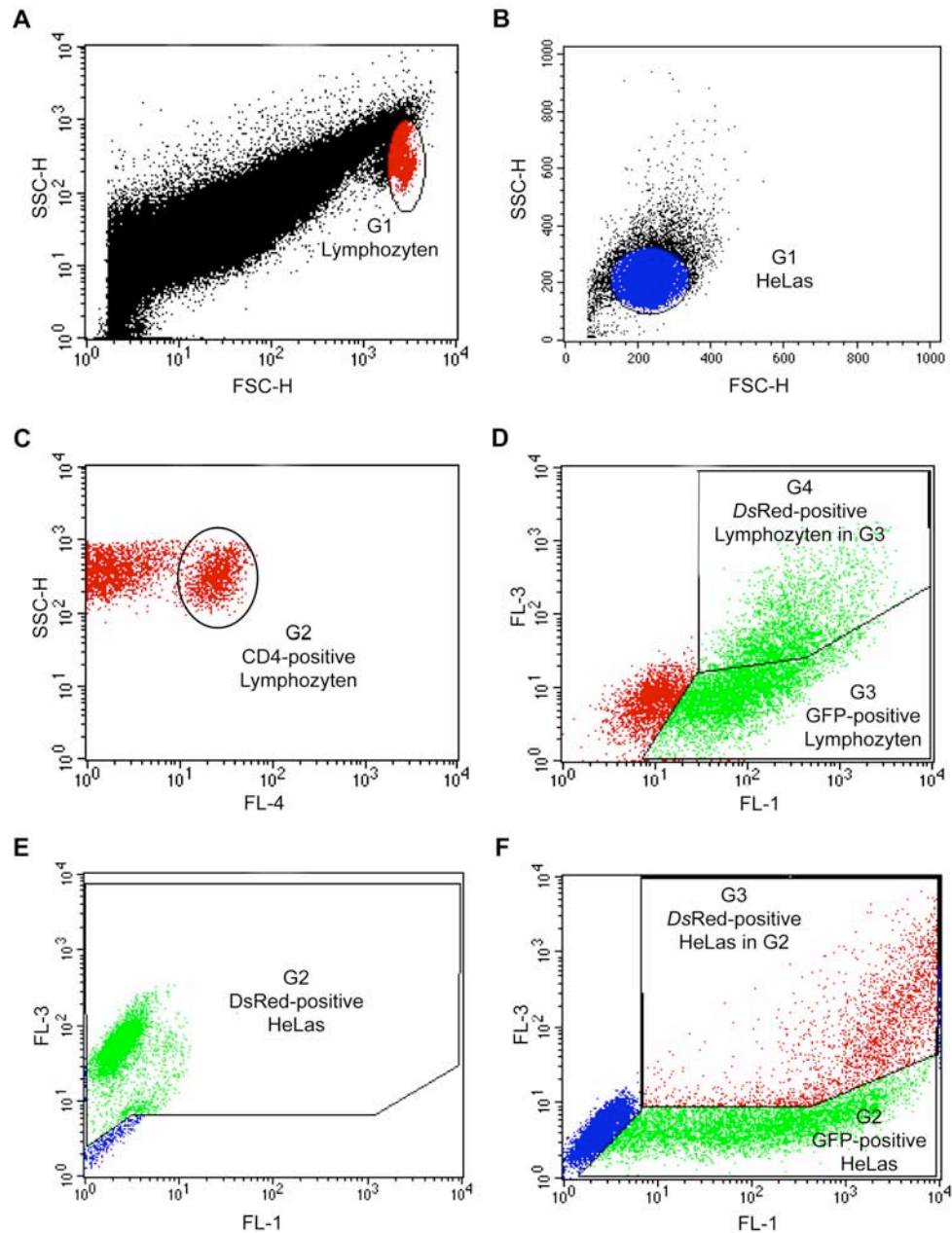
### Messungen der episomalen Cluster mit ImageJ

Die Tif-Bilder des visualisierten episomalen Clusters wurden mit Hilfe der Software ImageJ skaliert und vermessen. Dazu wurde ein Schwellenwert angewendet, der ausschließlich das Signal als Grauwerte wiedergab. Durch das Linienwerkzeug und das Plugin Analyze/Measure wurde das Signal vermessen. Ein subjektiver Einfluss auf die Ergebnisse kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die Schwellenwerte für die Grauwerte und die Messlinie manuell gesetzt wurden.

## 2.2.8 FACS-Analysen

Die FACS-Analyse wurde verwendet, um eine große Anzahl an Zellen auf ihre Fluoreszenzeigenschaften nach der Transfektion des Indikatorgens zu untersuchen. Die Analyse der episomalen Expression des Indikatorgens wurde 24 Std. nach der Transfektion, die der stabilen HeLa-Indi-Zellen 48 Std. nach der Transfektion und die der PBMCs 15 Std.

nach der Transfektion durchgeführt. Es wurden soweit es möglich war  $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  Zellen analysiert. Die zu untersuchende Population wurde als G1 durch die Größe und Granularität der Zellen festgelegt (vgl. Abb. 9A für Lymphozyten und 9B für HeLas).



**Abbildung 9**

**Beschreibung der Dot-Plots der verschiedenen FACS-Auswertungen.** Die verschiedenen Populationen, die bei einer FACS-Analyse ausgewertet wurden, sind dargestellt. Die Zellen einer Region G geben die Zellen an, die in der nachfolgenden Region mit in die Auswertung einbezogen wurden. So wurden z.B. nur Zellen der Region G2 ausgewertet, die sich in Region G1 befanden, usw. **A)** und **B)** G1 gibt die Population der untersuchten Lymphozyten bzw. HeLas an. **C)** Region G2 gibt die weiteruntersuchten CD4-positiven Lymphozyten aus G1 an. **D)** Die Region G3 gibt GFP-positiven Lymphozyten an, G4 die DsRed-positiven Lymphozyten aus G3. **E)** Region G2 zeigt die weiteruntersuchten HeLas aus G1 an. **F)** Die Region G2 gibt hier GFP-positive HeLas an, G3 die DsRed-positiven HeLas aus G2.

### **Auswertung der Transkriptionsaktivierung in PBMCs**

Im Falle der PBMCs wurde die Population der Lymphozyten durch G1 (Abb. 9A) bestimmt, anschließend die Population der CD4-positiven Zellen durch G2 (Abb. 9C) und die GFP-positiven (Transfektionskontrolle) als G3 (Abb. 9D) festgelegt. In dieser eingegrenzten Population wurde die Prozent-Zahl an *DsRed*-positiven Zellen (Expression des Indikators, G4, Abb. 9D) bestimmt. Dies geschah sowohl für Tat-GFP-induzierte Zellen, als auch GFP-mock-transfizierte Zellen.

### **Auswertung der Transkriptionsaktivierung in HeLa-Indi-Zellen**

Die Zelllinien HeLa-Indi wurden auf die Präsenz von *DsRed*-positiven Zellen (G2, vgl. Abb. 9E) hin untersucht, in Bezug auf die Gesamtpopulation G1 (vgl. Abb. 9B). Als Vergleichspopulation dienten parentale HeLa-Zellen, die kein Indikatorgen stabil integriert tragen.

### **Auswertung der Transkriptionsaktivierung des episomalen Indikators**

Die Expression des transient transfizierten Indikators wurden auch durch die *DsRed*-positiven Zellen (G2) innerhalb der Gesamtpopulation ausgewertet. Auch hier dienten parentale mock-transfizierte HeLa-Zellen als Bezug (vgl. Abb. 9B und 9E).

Für die Expressions-Analyse der verkürzten LTRs wurde ein GFP-exprimierendes Konstrukt co-transfiziert. Die Anzahl *DsRed*-positiver Zellen (G3) wurde innerhalb der GFP-positiven Zellen (G2) ermittelt (vgl. Abb. 9F).

## **2.2.9 ChIP-Prozedur**

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) wurde mit dem ChIP-IT Enzymatic Kit durchgeführt und stellt eine Methode dar, die Bindung von Proteinen an Chromatin zu zeigen. Die zellulären Proteine werden durch eine Formaldehyd-Fixierung kreuzvernetzt und nach einer Zellyse und enzymatischem Schneiden der DNA durch einen Antikörper, der das gewünschte Protein bindet, präzipitiert. Dies geschieht durch die Bindung von Protein G Agarose-Kügelchen an die Antikörper-DNA-Komplexe. Durch Aufheben der Kreuzvernetzung, Proteinase K-Behandlung und Aufreinigung der DNA kann diese, wenn das Protein dort gebunden war, spezifisch durch eine PCR nachgewiesen werden.

Es wurde strikt dem Herstellerprotokoll gefolgt, wobei folgende Möglichkeiten gewählt wurden: die Inkubation der Zellen nach der Transfektion erfolgte 48 Std. für die Zelllinie bzw.



42 Std. für die transient transfizierten Zellen; das enzymatische Schneiden der DNA inkubierte 15 Min. bei 37°C und erfolgte nur bei der Zelllinie, die episomale DNA wurde nicht geschnitten; jeweils 2 µg Antikörper wurden eingesetzt; es wurde stets eine IgG-Antikörper- und eine Kontrolle ohne Antikörper (noAB) mitgeführt; die Antikörper-Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C; die Kreuzvernetzung wurde bei 65°C im Wasserbad in 4 Std. aufgehoben und die Proben bei -20°C gelagert. Für die PCR wurde der PCR Master Mix verwendet, die Zyklenzahl variierte zwischen 30 (für episomale DNA) und 36 (für DNA der Zelllinie).

### **HIRT-Extraktion**

Die Trennung von genomischer und nicht-chromosomaler DNA für die ChIP-Prozedur des episomalen Indikators erfolgte durch eine HIRT-Extraktion. Die transient transfizierten Zellen wurden nach dem ChIP-IT-Protokoll ausgesät, fixiert, gewaschen und mit einem Cell Scraper von den Zellkulturschälchen geschabt. Die Zellen wurden pelletiert und in 250 µl TE resuspendiert. Es wurden 250 µl 1,2% SDS-Lösung (inkl. 1 µl PIC und 1 µl PMSF) zugegeben und bei Raumtemperatur 5 Min. lysiert. Anschließend wurden 350 µl HIRT-Gradientenpuffer zugegeben und für 15 Min. auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 14.000g für 15 Min. wurde der Gradient gebildet, der im Überstand die episomale DNA enthielt. Der in 100 µl aliquotierte Überstand wurde bei -80°C aufbewahrt und jeweils ein Aliquot für eine ChIP-Prozedur verwendet. Es wurde mit dem Pre-Clearing des Chromatins fortgefahren, bei dem ein 100 µl-Aliquot mit 100 µl *aqua dest.* verdünnt wurde und so für 4 ChIP-Reaktionen eingesetzt werden konnte. Bei 25 µl des Überstandes wurde jedoch gleich der Cross-Link aufgehoben, die Proteine mit Proteinase K verdaut und die DNA über die mitgelieferten Säulchen gereinigt. Durch eine anschließende PCR mit RPII- und inRed-Primern wurde getestet, ob noch genomische DNA und genügend episomale DNA im Überstand vorhanden waren (vgl. ChIP-IT-Protokoll).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Das „Gene Positioning System“ und dessen molekulare Bausteine

Das in dieser Arbeit entwickelte, auf der HIV-LTR basierende „Gene Positioning System“ (GePS) besteht grundsätzlich aus vier Komponenten, die für die Beobachtungen und Untersuchungen des integrierten wie auch nicht integrierten Transgens notwendig sind: das induzierbare Indikatorgenkonstrukt pIndi (vgl. 3.1.2), der „Gene tag“ zur Visualisierung des Indikatorgens auf DNA-Ebene (vgl. 3.1.3), ein Tat-Expressionsplasmid zur Transaktivierung der Transkription und Expressionsplasmide für die Visualisierung von Referenzstrukturen im Kern (vgl. 3.1.4). Da dieses System in lebenden Zellen funktionieren soll, werden fluoreszierende Proteine sowohl als Reporter-Protein als auch als Komponenten zur Visualisierung von Strukturen verwendet. Durch Klonierung von Genen für verschiedene Farbvarianten verschiedener fluoreszierender Proteine konnte eine Auswahl an „Bausteinen“ etabliert werden, die im Baukastenprinzip unterschiedlich kombiniert verwendet werden können.

#### 3.1.1 Die fluoreszierenden Proteine als Markierung

##### Mutagenese von *DsRed*<sub>quick</sub>

Das fluoreszierende Protein *DsRed* aus der Koralle *Discosoma spec.* (Matz, Fradkov et al. 1999) kann durch Licht der Wellenlänge 563 nm ( $Ex_{max}$ ) angeregt werden und emittiert Licht der Wellenlänge 582 nm ( $Em_{max}$ ). Das Protein besitzt eine Reifungsdauer von ca. 24 Stunden bis zur Detektierbarkeit und bildet Tetramere, um das fluoreszierende Zentrum ausbilden zu können. Darüber hinaus neigt es dazu, weiter zu aggregieren. Eine schnell reifende Variante von *DsRed* stellt *DsRed-Express* dar, das eine Reifungsdauer von ca. 8-12 Stunden besitzt (Invitrogen, Living Colors).

Um diese schnell reifende Variante für das Reporterprotein, das möglichst schnell nach Transkriptionsinitiation sichtbar sein soll, nutzen zu können, wurde *DsRed* durch gerichtete Mutagenese so verändert, dass es die Eigenschaften erhält, die für die schnelle Reifung von *DsRed-Express* verantwortlich sind. Dafür wurden die Aminosäureaustausche T21S, H41T, N42Q, V44A, C117S und T217A über vier Oligonukleotide bei einer gerichteten Mutagenese in *DsRed* eingeführt (Abb. 10). *DsRed-Express* besitzt darüber hinaus noch weitere

Mutationen, die zur verminderten Aggregat-Bildung führen, die aber hier nicht berücksichtigt wurden, weswegen das entstandene Protein weiterhin *DsRed<sub>quick</sub>* genannt wird.

Es wurde die Sequenz des Vektors pL-RedNES mutagenisiert, da dieser den Ausgangsvektor für das Indikatorgen des GePS darstellt (vgl. 3.1.2). In diesem Plasmid steht die Expression von *DsRed* unter der Kontrolle der HIV-LTR und beinhaltet ein Kernexportsignal (*DsRedNES*), damit der Kanal für die rote Fluoreszenz auch noch für Strukturen im Kern verwendet werden kann. Durch Mikroskopie und eine FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass 18 Stunden nach Transfektion von pL-RedNES oder der neuen Variante pL-RedNES<sub>quick</sub> in HeLa-Tat-Zellen, ca. 6% Zellen RedNES positiv bzw. ca. 30% Zellen RedNES<sub>quick</sub> positiv waren.

### **Mutagenese von mRFP**

Lange Zeit war *DsRed* das einzig verfügbare rot fluoreszierende Protein, dessen notwendige Tetramerisierung sich in manchen Anwendungen als Nachteil erwiesen hat, da es bei manchen Fusionen als fluoreszierende Markierung zu Lokalisationsunterschieden der visualisierten Proteine gekommen ist und sich durch eine sehr langsame Reifung auszeichnet (Baird, Zacharias et al. 2000). Campbell *et al.* beschrieben 2002 eine neu mutierte Variante des *DsRed*, das nur noch als Monomer in der Zelle vorliegt und somit die genannten Nachteile nicht mehr aufweist (Campbell, Tour et al. 2002). Dieses mRFP (monomere rot fluoreszierende Protein) unterscheidet sich in 33 Aminosäuren von *DsRed* (R2A, K5E, N6D, T21S, H41T, N42Q, V44A, V71A, K83L, C117E, F124L, I125R, V127T, L150M, R153E, V156A, H162K, K163M, A164R, L174D, V175A, F177V, S179T, I180T, Y192A, Y194A, V195T, S197I, T217A, H222S, L223T, F224G, L225A), (Abb. 10), zeigt ein leicht verschobenes Fluoreszenzspektrum ( $Ex_{max}$ : 584 nm,  $Em_{max}$ : 607 nm), reift ca. 10 mal schneller und fluoresziert im Vergleich zu *DsRed* etwas schwächer (Campbell, Tour et al. 2002).

Da nur die AS-Sequenz und nicht die Nukleotidsequenz für mRFP veröffentlicht war, wurde die Sequenz basierend auf den optimalen Codons für die menschliche Translation und den benutzten Codons in der *DsRed*-Sequenz selbst erstellt. Die Nukleotid-Sequenz befindet sich im Anhang unter 8.3. Durch eine Kombination aus gerichteter Mutagenese und Neusynthese konnte die codierende Sequenz für mRFP kloniert werden. An AS-Position 126 wurde durch eine stille Mutation (GGC zu GGT) eine KpnI-Schnittstelle eingefügt, und dadurch die Sequenz in zwei Teile unterteilt. Die Sequenz für die ersten 126 AS wurde durch eine PCR-Strategie auf Basis von pL-RedNES<sub>quick</sub> mutiert. Der zweite Teil der codierenden

Sequenz wurde durch eine Neusynthese mit überlappenden Primern und anschließender Amplifikation mit überhängenden Primern erhalten.

Nach Ligation in einen Expressionsvektor mit SV40-Promotor (vgl. 3.1.4) konnte durch Transfektion von pSV40-mRFP dessen Expression in HeLa-Zellen getestet werden. Die Zellen zeigten eine einheitlich verteilte rote Fluoreszenz.



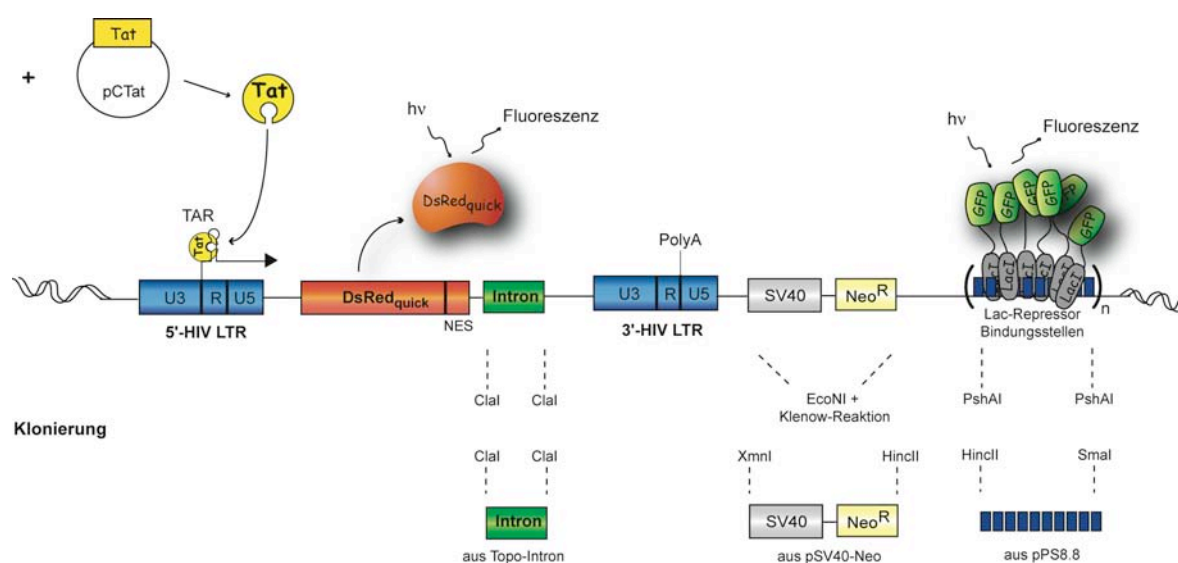
**Abbildung 10**

**Protein-Sequenz-Alignment von DsRedNES, DsRedNES<sub>quick</sub> und mRFP1.** Die eingeführten Mutationen gegenüber der DsRed-Sequenz sind hervorgehoben. Die AS-Positionen sind oberhalb, der Linker zur NES und die NES-Sequenz selbst sind unterhalb der Protein-Sequenz gekennzeichnet.

### 3.1.2 Das Indikatorgen und seine Klonierung

Das klonierte Indikatorkonstrukt plndi besitzt die Eigenschaften einer induzierbaren Expression durch die HIV-LTR als Promotor, da diese durch das virale Protein Tat spezifisch

aktiviert werden kann. Die enthaltene 5'- und 3'-HIV-LTR entsprechen den LTRs nach der Integration des Provirus in das Genom der Wirtszelle. Damit besitzen beide LTRs eine U3-, R- und U5-Region. Die Primer Bindungsstelle nahe der 5'-LTR, sowie der Purin-reiche Trakt nahe der 3'-LTR sind vorhanden. Von der „leader region“ sind jedoch nur noch die ersten 120 bp erhalten, wodurch das klonierte Indikatorkonstrukt keinen Haupt-Spleißdonor und keine  $\psi$ -Stelle als Verpackungssignal der ungespleißten genomischen RNA mehr besitzt. Die transkriptionelle Aktivität des Indikatorgens wird durch die schnell reifende Variante von *DsRed*, *DsRed<sub>quick</sub>*, schnell durch rote Fluoreszenz im Zytoplasma detektierbar. Das Kernexportsignal (NES) stellt den Export des Reporterproteins *DsRed* ins Zytoplasma sicher. Das Konstrukt besitzt ein Intron, wodurch die Interaktion mit endogenen Spleißfaktoren sichergestellt werden soll. Auf DNA-Ebene soll das Transgen durch Bindung des „Gene Tags“ an die 64 Lac-Operatoren visualisiert werden. Der „Gene Tag“ ist ein Fusionsprotein aus dem Lac-Repressor (LacI) und einem fluoreszierenden Protein, das über die Bindung von LacI an die Lac-Operatoren spezifisch die DNA des Transgens zeigen sollte. Eine Neomycin-Resistenzkassette soll die Herstellung und dauerhafte Selektion stabiler Zelllinien mit dem Indikatoren erleichtern. Einen schematischen Überblick über die Komponenten und die Klonierung gibt Abb. 11.



**Abbildung 11**

**Schematische Darstellung des Indikatorgens pIndi, dessen Transaktivierung durch das virale Protein Tat, dessen Visualisierung durch spezifische Bindung eines fluoreszenzmarkierten Lac-Repressors (LacI) und die Klonierungsstrategie.** Als farbige Rechtecke sind die einzelnen Komponenten von links nach rechts dargestellt: 5'-LTR als induzierbarer Promotor, *DsRed<sub>quick</sub>* als Reportergen mit einem Kernexportsignal (NES), ein Intron, die 3'-LTR mit PolyA-Signal, der SV40-Promotor unter dessen Kontrolle das Neomycingen steht und die 64 Lac-Repressorbindungsstellen. Durch Transfektion und Expression eines Tat-Expressionsplasmids kann die Transkription des Indikatorgens aktiviert werden, die durch das Protein *DsRed* sichtbar wird. Auf DNA-Ebene ist das Plasmid nach Expression eines fluoreszenzmarkierten Lac-Repressors dauerhaft sichtbar. Die Schnittstellen, über die die entsprechenden Komponenten kloniert wurden sind unterhalb angegeben.

### 3.1.3 Klonierung der „Gene Tags“ zur Visualisierung des Indikatorgens auf DNA-Ebene

Die Fluoreszenz-Markierung des Lac-Repressors muss ein starkes Signal geben, da dieses auf Grund der beschränkten Anzahl von 64 Lac-Operatoren relativ klein sein wird. Da das Ausgangsplasmid p3'SS-EGFPLacl noch das ursprüngliche EGFP als fluoreszierendes Protein trägt, das sein Fluoreszenzoptimum bei 21°C erreicht und deutlich schwächer ist, wurde dieses durch die GFPsg143-Variante ersetzt. Für eine neu mutierte Variante des gelb fluoreszierenden Proteins eYFP(F46L) wird eine hellere Emission beschrieben als für die bisherig verwendeten fluoreszierenden Proteine eYFP oder eGFP (Nagai, Ibata et al. 2002). Da die meisten Fusionsproteine an GFP gekoppelt vorliegen, bietet das fluoreszierende Protein eYFP(F46L) außerdem weitere Möglichkeiten der Kombination mit anderen fluoreszierenden Farbvarianten. Aus diesem Grund wurde weiterhin die monomere Variante von *DsRed*, das mRFP, als fluoreszierende Markierung kloniert. Abbildung 12 gibt eine schematische Übersicht über die Klonierung und Expression der „Gene Tags“.

Die Bindung der „Gene Tags“ an die Operatorsequenzen wurde durch eine Co-Transfektion von HeLa-Zellen mit dem Indikatorgen pIndi und einem „Gene Tag“ bestätigt. Die Kerne, respektive die DNA wurde DAPI gefärbt und ein 3D Z-Stack am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) für DAPI und den jeweiligen Fluoreszenzkanal aufgenommen. Die Bindung des „Gene Tags“ an die Operatorsequenzen des Indikatorgens kann für alle vier Farbvarianten des „Gene Tags“ gezeigt werden (Abb. 12B).

Als „Bausteine“ im GePS stehen somit nun vier verschiedene „Gene Tags“ zu Verfügung. Alle codieren für ein Fusionsprotein aus dem Dimer-bildenden Lac-Repressor (dimer Lacl), der spezifisch die DNA-Bindesequenzen Lac-Operatoren bindet, und einer fluoreszierenden Markierung: p3'SS-eGFPLacl, p3'SS-GFPsg143Lacl, p3'SS-eYFP(F46L)Lacl und p3'SS-mRFPLacl (Abb. 12).

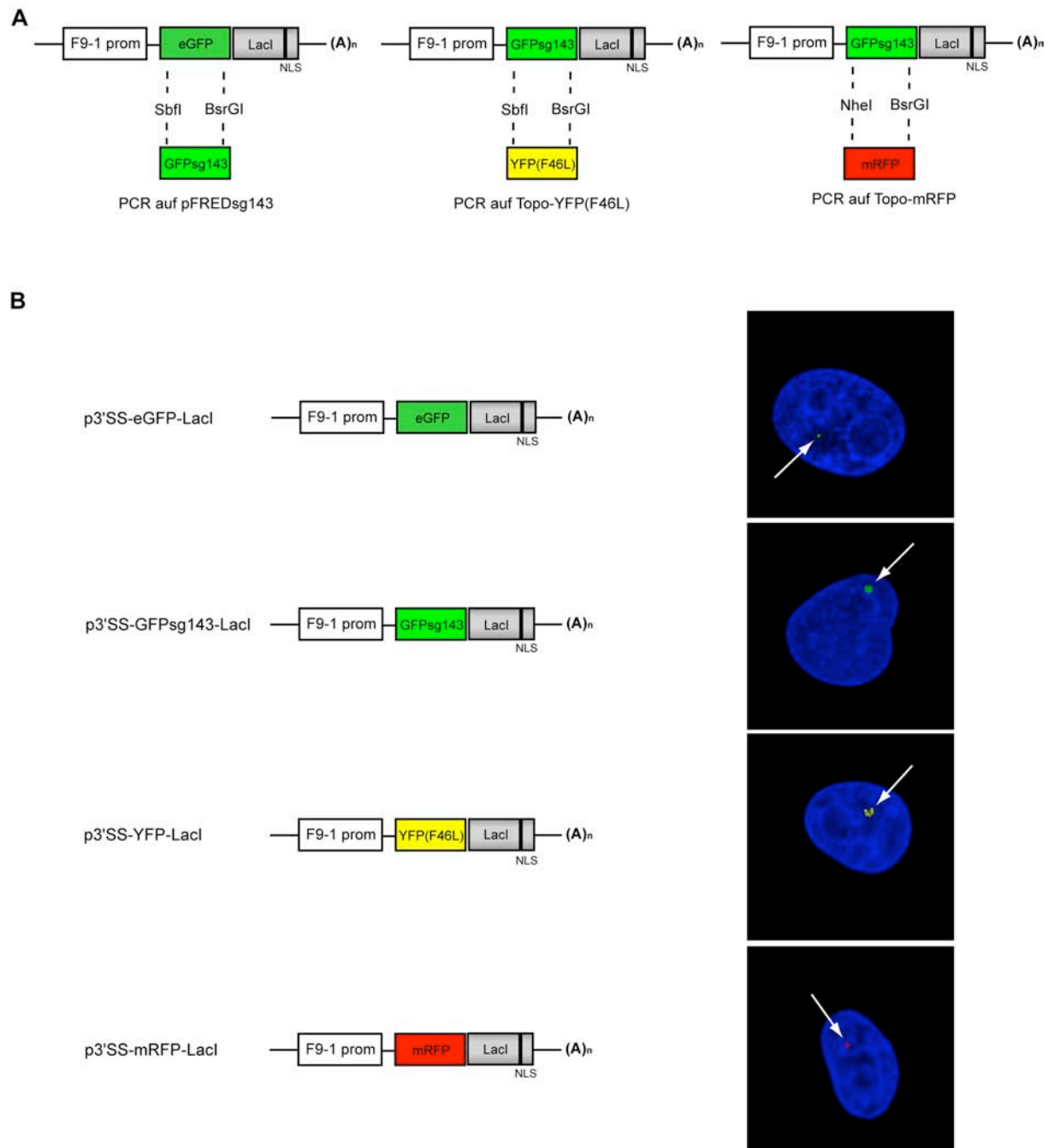


Abbildung 12

Schematische Darstellung der Klonierung und dadurch verfügbaren „Gene Tags“, die als Fusionsproteine aus eGFP, GFPsg143, YFP(F46L) oder mRFP und dem Lac-Repressor vorliegen. Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Kernen, die mit pIndi und einem Expressionsplasmid für den entsprechenden „Gene Tag“ transfiziert wurden. **A**) Klonierungsübersicht. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind gezeigt. **B**) Die LSM-Bilder sind als Projektionen gezeigt. Überlagerung einer DAPI-Gegenfärbung und dem entsprechenden Fluoreszenzkanal (pseudo-coloriert). Die Pfeile deuten auf die Cluster von pIndi, sichtbar durch den gebundenen „Gene Tag“.

### 3.1.4 Visualisierung von Referenzstrukturen

In einem Lebezdzell-System ist davon auszugehen, dass eine aktive Zelle sowohl in der Mitose als auch der Interphase Eigenbewegungen aufweist. Bei Beobachtungen von Bewegungen von Strukturen in der Zelle ist daher immer zu bedenken, dass solche Bewegungen durch Veränderungen der Struktur aber auch durch Eigenbewegung der lebenden Zelle entstehen können. Um diese Eigenbewegungen berücksichtigen zu können, stellt man Bewegungen einer Struktur in Verhältnis zu einer Referenzstruktur dar. Um solche Referenzstrukturen im GePS in lebenden Zellen zu visualisieren, wurden Expressionsvektoren kloniert, die für verschiedene fluoreszierende Proteine fusioniert an die Sequenz eines Strukturproteins codieren. Als Strukturproteine wurden solche gewählt, die eindeutig in der zu visualisierenden Kernstruktur lokalisieren. Eine Klonierungsübersicht gibt Abbildung 13, eine beispielhafte Expression der verschiedenen Referenzstrukturen ist in Abbildung 14 gezeigt.

#### Mikroskopie der visualisierten Kernkomponenten

Die Expression und die Kontrolle, ob die Proteine trotz fluoreszierender Markierung in den erwarteten Strukturen des Kerns lokalisieren und als Referenzpunkte im GePS verwendet werden können, wurde durch Transfektion in HeLa-Zellen getestet.

Abbildung 14 zeigt die klonierten und die andersweitig verfügbaren Expressionsplasmide als Tabelle und eine beispielhafte Expression und Lokalisation. Für alle aufgelisteten Expressionsplasmide konnte die Expression und korrespondierende Lokalisation der Proteine bestätigt werden.

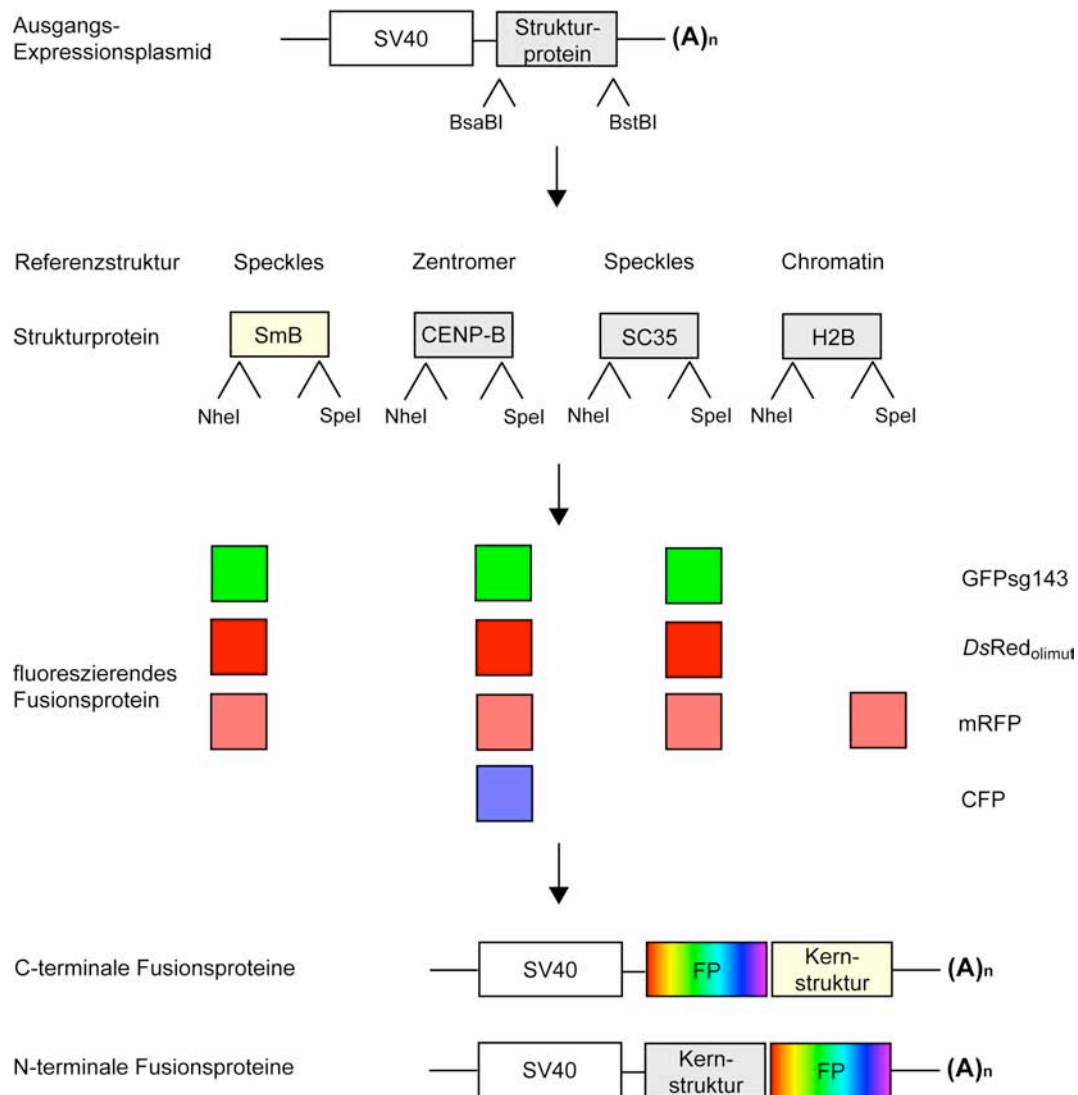
CENP-B, das menschliche Zentromer Protein B, visualisiert die Zentromere einer Zelle durch Bindung von CENP-B an die 17 bp lange CENP-B Box, die in jedem  $\alpha$ -Satelliten-Repeat vorkommt (Earnshaw, Ratrie et al. 1989; Masumoto, Masukata et al. 1989). CENP-B zeigt hier deutliche punktförmige Signale, die Zentromerregionen der Chromosomen darstellen und gleichmäßig im Zellkern verteilt vorkommen.

H2B färbt über das Histon das Chromatin des Zellkerns an. Die Färbung ist nicht so kontrastreich wie die der DNA-Gegenfärbung (Hoechst 33342), zeigt aber auch die kondensierteren Chromatinbereiche, z.B. um die Nukleoli, als stärkere Färbung. In der mitotischen Zelle sieht man eindeutig die Lokalisierung an der DNA, da einzelne Chromosomen in ihrer typischen X-Form der Mitose zu erkennen sind. H2B-mRFP colokalisierte in dieser mitotischen Zelle mit H2B-GFP und der DNA-Gegenfärbung (nicht gezeigt).



## Expressionsplasmide für die Visualisierung von Referenzstrukturen im Zellkern

### - Klonierungsübersicht -



**Abbildung 13**

**Klonierungsstrategie für die Expressionsplasmide der Referenzstrukturen.** Die rechteckigen Kästen repräsentieren die Komponenten der Expressionsplasmide: der SV-40 Promotor, das zu visualisierende Protein (Kernstruktur) und die fluoreszierende Markierung (fluoreszierende Fusionsprotein). Die Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung verwendet wurden, sind dargestellt. Die farbigen Quadrate zeigen an, in welchen Farbvarianten die Referenzstrukturen durch Expressionsplasmide visualisiert werden können und ob sie als C-terminal oder N-terminal fusioniertes Protein vorliegen.

POM121 ist ein Protein des Kernporenkomplexes und visualisiert dadurch die Kernmembran. Bei einer größeren Auflösung kann man in konfokalen Schnitten erkennen, dass nicht die gesamte Kernmembran gefärbt ist, sondern Unterbrechungen zu erkennen sind. Dadurch wird deutlich, dass POM121 einzelne Kernporenkomplexe visualisiert.

Der Lamin B-Rezeptor dagegen färbt die Kernmembran als einheitliche Struktur an.

Das virale HIV-Protein Rev lokalisiert in HeLa-Zellen zum größten Teil in den Nukleoli, mit geringem Hintergrund im Nukleoplasma und eignet sich daher gut, die Nukleoli als Struktur zu visualisieren.

SC35 ist ein SR-Spleißfaktor, der ein typisches gesprenkeltes Muster im Kern zeigt und in Speckles lokalisiert (Sleeman und Lamond 1999). SC35 zeigt eine sehr betonte Speckles-Färbung mit geringem Hintergrund im Nukleoplasma. Bei der Überlagerung mit der DNA-Gegenfärbung sieht man, dass die Speckles, respektive SC35 in den schwach gefärbten DNA-Bereichen des Interchromatinkompartiments liegen.

Auch SmB ist ein Spleißfaktor (Sm-Protein), der in Speckles lokalisiert (Sleeman and Lamond 1999). Im Gegensatz zu SC35 zeigt er jedoch eine weniger betonte Speckles-Färbung mit einem etwas höheren Hintergrund im Nukleoplasma. Aber auch das SmB-Protein liegt bei Überlagerung mit der DNA-Gegenfärbung in den DNA-armen Interchromatinbereichen. Einzelne prominent sichtbare Färbungen stellen laut Literatur Coiled Bodies dar, in denen Sm-Proteine und snRNPs im Gegensatz zu SR-Proteinen lokalisieren (Sleeman and Lamond 1999).

#### **Abbildung 14 (nächste Seite)**

**Verfügbare Expressionsplasmide für Referenzstrukturen im Kern und Beispielbilder von deren Expression und Lokalisation im Kern.** Die linke Spalte gibt die Referenzstruktur an, die visualisiert wird. Die mittlere Spalte die verfügbaren Plasmide. Die rechte Bilderreihe zeigt die konfokalen Schnitte einer beispielhaften Expression eines der Plasmide in HeLa-Zellen (links: DNA-Färbung mit Hoechst 33342, Mitte: fluoreszierende Struktur, rechts: Amira 3D-Rekonstruktion, bzw für H2B-mRFP eine 3D-Projektion einer anderen mitotischen Zelle). Scale Bar: 20 µm. Nicht selbst klonierte Plasmide sind durch die Referenzen gekennzeichnet.

## Expressionsplasmide für die Visualisierung von Referenzstrukturen im Zellkern

### - Expressionsübersicht -

Kernstruktur	Expressionsplasmid	DNA (Hoechst 33342)	3D-Rekonstruktion
Centromere	pSV40-CENP-B-GFPsg143 pSV40-CENP-B-Red <sub>olimut</sub> pSV40-CENP-B-mRFP pSV40-CENP-B-CFP		CENP-B-GFPsg143 
Chromatin	pSV40-H2B-mRFP pSV40-H2B-mRFP/HygB <sup>R</sup> pH2B-GFP (Kanda et al. 1998)		H2B-mRFP 
Kernporenkomplex	POM121-(GFP) <sub>3</sub> (Daigle et al. 2001)		POM121-GFP 
Lamina	pLBR-YFP (Ellenberg und Lippincott-Schwartz 1999)		LBR-YFP 
Nukleoli	pC-sRev-GFPsg143 (Ludwig et al. 1999)		Rev-GFP 
Speckles	pSV40-SC35-GFPsg143 pSV40-SC35-Red <sub>olimut</sub> pSV40-SC35-mRFP		SC35-GFPsg143 
	pSV40-GFPsg143-SmB pSV40-Red <sub>olimut</sub> -SmB pSV40-mRFP-SmB pSmB-CFP (Sleeman und Lamond 1999)		GFPsg143-SmB 

### **3.2 Die Synthese des Indikatorproteins des episomalen Indikatorgens ist nur in Anwesenheit von Tat sichtbar**

Die primären Zielzellen bei einer Infektion durch HIV sind CD4-positive-T-Helferzellen, deren Anzahl infolge einer Infektion stetig abnimmt (Modrow, Falke et al. 2003). Daher wurde die Funktionalität des Indikatorgens bzw. die Expression des Indikatorgens durch Tat - den viralen Transaktivator der Transkription - in Lymphozyten getestet. Dazu wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) isoliert und mit dem Indikatorgen des GePS plndi und einem Expressionsplasmid für Tat-GFP bzw. GFP als Kontrolle transfiziert. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes sind überwiegend Lymphozyten und einige Monozyten, wobei verschiedene Subpopulationen der Lymphozyten unterschieden werden können und sich ca. 3/4 auf T-Zellen und 1/4 auf natürliche Killer-Zellen und B-Zellen verteilen. CD4-positive Zellen stellen die Hälfte, CD8-positive Zellen und eine geringe Zahl an CD4-negativen/CD8-negativen-Zellen stellen die andere Hälfte der T-Zellen dar (Janeway and Travers 1997). Um zusätzlich eine Aussage über CD4-positive T-Zellen machen zu können, wurden die PBMCs in einem Teil der Versuchsansätze durch einen anti-CD4-Antikörper markiert.

Neuere Studien zeigen darüber hinaus, dass auch eine zirkuläre, nicht integrierte Form der HIV-1 DNA in infizierten CD4-positiven T-Zellen und auch HeLa-Zellen nachgewiesen wurde (Engelman, Englund et al. 1995; Wiskerchen and Muesing 1995; Teo, Veryard et al. 1997; Bell, Montaner et al. 2001; Wu and Marsh 2003). Diese DNA wird transkribiert, gespleißt und Proteine werden synthetisiert (Wu and Marsh 2001). Obwohl die Episomen nicht repliziert werden, scheinen sie eine gewisse Stabilität zu besitzen, sodass sie nicht sofort abgebaut werden und daher eine mögliche Funktion bei einer Infektion mit HIV ausüben können (Butler, Johnson et al. 2002; Pierson, Kieffer et al. 2002; Gillim-Ross, Cara et al. 2005), (vgl. 1.2.3). Im Folgenden untersuchen wir daher die Expression und Induzierbarkeit des HIV-basierten Indikatorgens auch unter diesem Aspekt in episomaler Form in Lymphozyten und HeLa-Zellen.

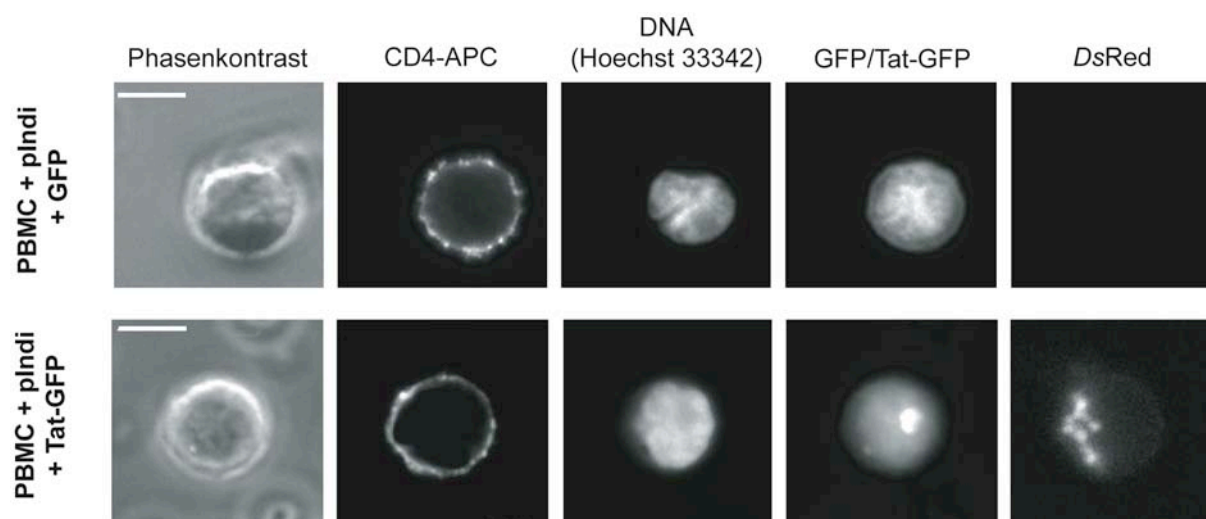
### 3.2.1 Die Expression des episomalen Indikatorgens lässt sich durch Tat in PBMCs induzieren

#### Mikroskopie

Frisch isolierte PBMCs wurden mit pIIndi und einem Expressionsplasmid für Tat-GFP bzw. GFP transfiziert, 15 Std. später die CD4-Rezeptoren durch Immunfärbung markiert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Tat-GFP lokalisiert wie erwartet im Zellkern, überwiegend im Nukleolus (Hauber, Perkins et al. 1987). Unfusioniertes GFP ist in der ganzen Zelle verteilt, kann aber alleine keine Expression des Indikatorgens induzieren.

Nur bei Co-Expression von Tat-GFP ist *DsRed* im Zytoplasma des Lymphozyten zu detektieren und somit die Expression des Indikatorgens induziert (Abb. 15).



**Abbildung 15**

**Fluoreszenzaufnahme eines CD4-positiven Lymphozyten nach Transfektion des Indikatorplasmids pIIndi und einem GFP- bzw. Tat-GFP-Expressionsplasmid. Obere Reihe:** GFP lokalisiert in der gesamten Zelle, es kommt zu keiner *DsRed*-Expression des Indikatorgens. Von links nach rechts dargestellt: Phasenkontrast, CD4-APC (Allophylocyanin), Hoechst 33342, GFP, *DsRed*. **Untere Reihe:** Tat-GFP lokalisiert im Zellkern und dem Nukleolus, *DsRed* wird exprimiert und akkumuliert im Zytoplasma. Von links nach rechts dargestellt: Phasenkontrast, CD4-APC (Allophylocyanin), Hoechst 33342, Tat-GFP, *DsRed*. Scale bar: 5  $\mu$ m.

### **FACS-Analyse zur Bestimmung der Induzierbarkeit durch Tat**

Um auch eine quantitative Aussage über die Expression und die Induzierbarkeit des Indikatorplasmids in PBMCs zu bekommen, wurden die fluoreszierenden Zellen in einer Durchflußzytometrie-Analyse untersucht und quantifiziert.

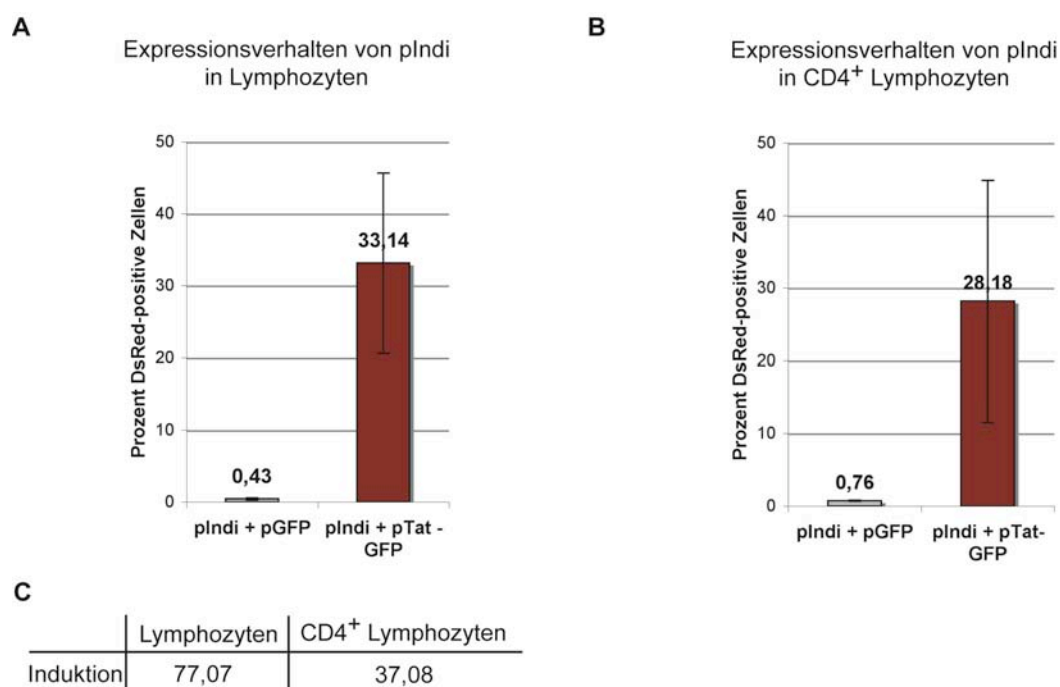
Nach Transfektion vom Indikatorgen *plndi* und einem Expressionsplasmid für Tat-GFP bzw. GFP wurden die Zellen fixiert und im *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) analysiert. Dabei wurde die Population der Lymphozyten festgelegt und auf die Anzahl GFP-positiver Zellen (GFP- bzw. Tat-GFP-exprimierende Zellen) normiert. Die Prozentzahlen *DsRed*-positiver Zellen innerhalb dieser Lymphozyten-Populationen wurden bestimmt und sind in Abbildung 16A dargestellt.

Die Transfektionseffizienz lag in allen Ansätzen zwischen 67 und 79% für pFRED als GFP-Expressionsplasmid, und zwischen 27 und 58% für pCTatsg25 als Tat-GFP-Expressionsplasmid. Es lässt sich nur eine Expression des Indikatorgens *DsRed* nach Co-Expression von Tat nachweisen (Abb. 16A).

In drei Versuchsansätzen wurde zusätzlich bei der Fixierung das Oberflächenprotein CD4 durch Antikörper angefärbt, um auch eine gesonderte Aussage über CD4-positive T-Zellen machen zu können. Alle drei Fluorochrome GFP, *DsRed* und APC (Markierung des Antikörpers) können im FACS ausgewertet werden. Analysiert wurde nur die CD4-positive T-Zell-Population. Nach Normalisierung auf GFP-exprimierende Zellen, wurde die Prozentzahl an *DsRed*-positiven Zellen ermittelt (Abb. 16B).

Ca. 46-52% der Lymphozyten sind CD4-positiv, was ungefähr der erwarteten Verteilung von Lymphozyten der mononukleären Zellen des peripheren Blutes entspricht. Innerhalb dieser Zellpopulation liegt die Transfektionseffizienz bei 15-42% (GFP-positive Zellen), diese ist also nur halb so hoch wie innerhalb der Gesamtpopulation an Lymphozyten, wobei das Verhältnis an *DsRed*-positiven Zellen zu Tat-GFP-positiven Zellen in der Gesamt- und Teilpopulation ungefähr gleich ist. Ein Drittel der Tat-GFP-positiven Zellen exprimieren *DsRed*.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Indikatorgen *plndi* des GePS durch die Co-Expression von Tat in Lymphozyten und speziell CD4-positiven Lymphozyten exprimiert wird und es ohne Tat zu keiner sichtbaren Expression des Reporterproteins kommt.

**Abbildung 16**

**FACS-Analyse zum Expressionsverhalten des Indikatorgens in Lymphozyten ohne und mit Induktion der Genexpression durch Tat.** Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden auf GFP-exprimierende Zellen normiert. **A)** Co-Transfektion von plndi und einem GFP-Expressionsplasmid führt zu keiner Genexpression des Indikatorgens (*DsRed*). Durch Co-Transfektion eines Tat-GFP-Expressionsplasmids kann *DsRed* in einem Teil der Zellen nachgewiesen werden. **B)** CD4 wurde über Immunfärbung markiert und nur diese positiven Zellen für die Auswertung herangezogen. Co-Transfektion von plndi und einem GFP-Expressionsplasmid führt zu keiner Genexpression des Indikatorgens (*DsRed*). Durch Co-Transfektion von einem Tat-GFP-Expressionsplasmid kann *DsRed* in einem Teil der Zellen nachgewiesen werden. **C)** Die Induktion wurde aus dem Quotienten von induzierten Zellen und nicht induzierten Zellen errechnet ( $=(\text{plndi} + \text{Tat-GFP})/(\text{plndi} + \text{GFP})$ ).

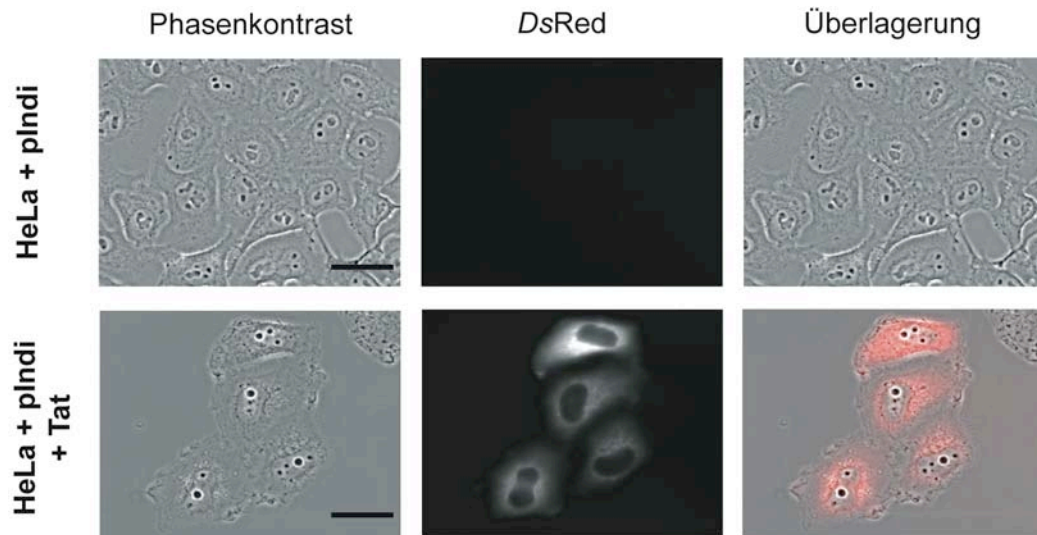
### 3.2.2 Die Expression des episomalen Indikatorgens lässt sich durch Tat in HeLa-Zellen induzieren

Der eigentliche Zellhintergrund, der für die weitere Etablierung des GePS verwendet werden soll, sind jedoch HeLa-Zellen. Die Expression und spezifische Induktion des Indikatorgens wurde daher auch in transienter, episomaler Form in diesen Zellen untersucht.

#### Mikroskopie

HeLa-Zellen wurden ausgesät und mit dem Indikatorgen plndi oder dem Indikatorgen und einem Expressionsplasmid für Tat transfiziert. 24 Std. später wurden Bilder der Zellen am Cell Observer aufgenommen.

Eine Expression des Reporterproteins *DsRed* kann man nur in Zellen erkennen, die mit dem Tat-Expressionsplasmid co-transfiziert wurden. Ohne Tat zeigt das Indikatorgen im transienten System keine Expression (Abb. 17).



**Abbildung 17**

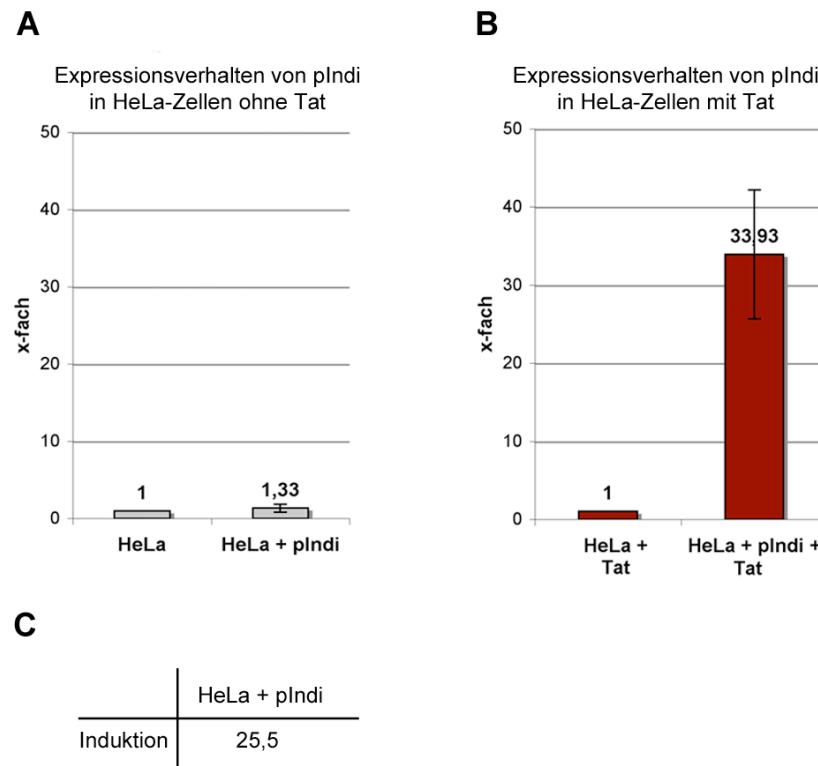
**Fluoreszenzaufnahme von HeLa-Zellen nach Transfektion von plndi oder plndi und einem Tat-Expressionsplasmid.** Links: Phasenkontrast, Mitte: Kanal für *DsRed*, rechts eine Überlagerung beider Kanäle. Scalebar: 20  $\mu\text{m}$ .

### **FACS-Analyse zur Bestimmung der Induzierbarkeit durch Tat**

Zur Bestimmung der Induktion des episomalen Indikatorgens wurden beide Plasmide plndi und das Tat-Expressionsplasmid in ausgesäte HeLa-Zellen co-transfiziert und nach 24 Std. im FACS analysiert. Es wurden die Prozentzahlen der *DsRed*-positiven Zellen von der Gesamtzellzahl ermittelt und auf parentale, mock-transfizierte HeLa-Zellen mit und ohne Tat normalisiert.

Zellen, die nur mit dem episomalen Indikatorgen transfiziert wurden, zeigen kaum/keine höhere Anzahl an positiven Zellen (1,33 x) als mock-behandelte HeLa-Zellen (1 x). Nach Expression von Tat zeigen 34 x mehr Zellen eine *DsRed*-Fluoreszenz, die mit dem Indikatorgen transfiziert wurden im Vergleich zu HeLa-Zellen, die nur mit einem Tat-Expressionsplasmid transfiziert wurden. Nach Berechnung der Induktion (HeLa + plndi + Tat/ HeLa + plndi) ergibt sich für das episomale Indikatorgen ein 25,5-facher Anstieg an *DsRed*-positiven Zellen nach Tat-Expression (Abb. 18). Dabei ist zu bedenken, dass sowohl das Indikatorgen als auch das Tat-Expressionsplasmid transfiziert werden müssen und die Ergebnisse stark von der Transfektionseffizienz abhängen.



**Abbildung 18**

**FACS-Analyse zur Induktion des episodalen Indikators pIndi durch Transfektion eines Expressionsplasmids für das virale Protein Tat in HeLa-Zellen.** Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. **A)** Anzahl positiver Zellen ohne Induktion im Verhältnis zu parentalen mock-transfizierten HeLa-Zellen. **B)** Anzahl positiver Zellen nach Tat-Induktion im Verhältnis zu parentalen mock-transfizierten HeLa-Zellen. **C)** Induktion errechnet durch den Quotienten von x-facher Anzahl induzierter positiver Zellen durch x-fache Anzahl nicht induzierter positiver Zellen ( $= (\text{HeLa} + \text{pIndi} + \text{Tat}) / (\text{HeLa} + \text{pIndi})$ ).

### 3.3 Charakterisierung der Zelllinien mit dem Indikators

Parallel zu den Untersuchungen am episodalen Indikators, soll das GePS in HeLa-Zellen stabil integriert werden, um die Aktivierbarkeit durch Tat und die Chromatinstruktur mit denen des episodalen Indikators zu vergleichen, wie auch die Auswirkungen von Tat auf die Expression von benachbarten Genen und etwaige Chromatinveränderungen und Lokalisation zu untersuchen.

#### 3.3.1 Herstellung der Indikatorzelllinien (HeLa-Indi)

Um klonale Zelllinien zu erhalten, die das Indikators stabil integriert tragen, wurden HeLa-Zellen in T25-Zellkulturflaschen ausgesät, am folgenden Tag mit 2  $\mu\text{g}$  pIndi/Neo transfiziert

und nach weiteren 48 Std. durch Neomycinhaltiges Medium (0,5 mg/ml G418) unter Selektion gesetzt. 15 Tage später wurden die selektionierten Zellen durch Verdünnung in zwei 96-Well-Platten vereinzelt. Am folgenden Tag wurde im Mikroskop überprüft in welchen Schälchen nur eine bzw. zwei Zellen (nach der ersten Teilung) vorhanden waren und somit eine klonale Zelllinie heranwachsen konnte. Es konnten 24 klonale Zellen sicher bestimmt werden, die weiter kultiviert wurden. Sobald ein dichter Zellrasen entstanden war, wurden die Zellen in ein nächst größeres Zellkulturgefäß umgesetzt. 13 Tage nach der Vereinzlung wurden die 24 Zelllinien zweimal in 24-Well-Platten ausgesät und eine Serie davon mit 100 ng pL3Tat induziert. In 7 Zellklonen war durch Tat die Indikatorgenexpression induzierbar. Diese Zellen und zusätzlich eine zufällig ausgewählte nicht induzierbare Zelllinie als Negativkontrolle wurden weiter kultiviert, eine Stockkultur davon eingefroren und weiterhin dazu verwendet, um genomische DNA zu präparieren und die Tat-Induzierbarkeit durch eine FACS-Analyse zu bestimmen.

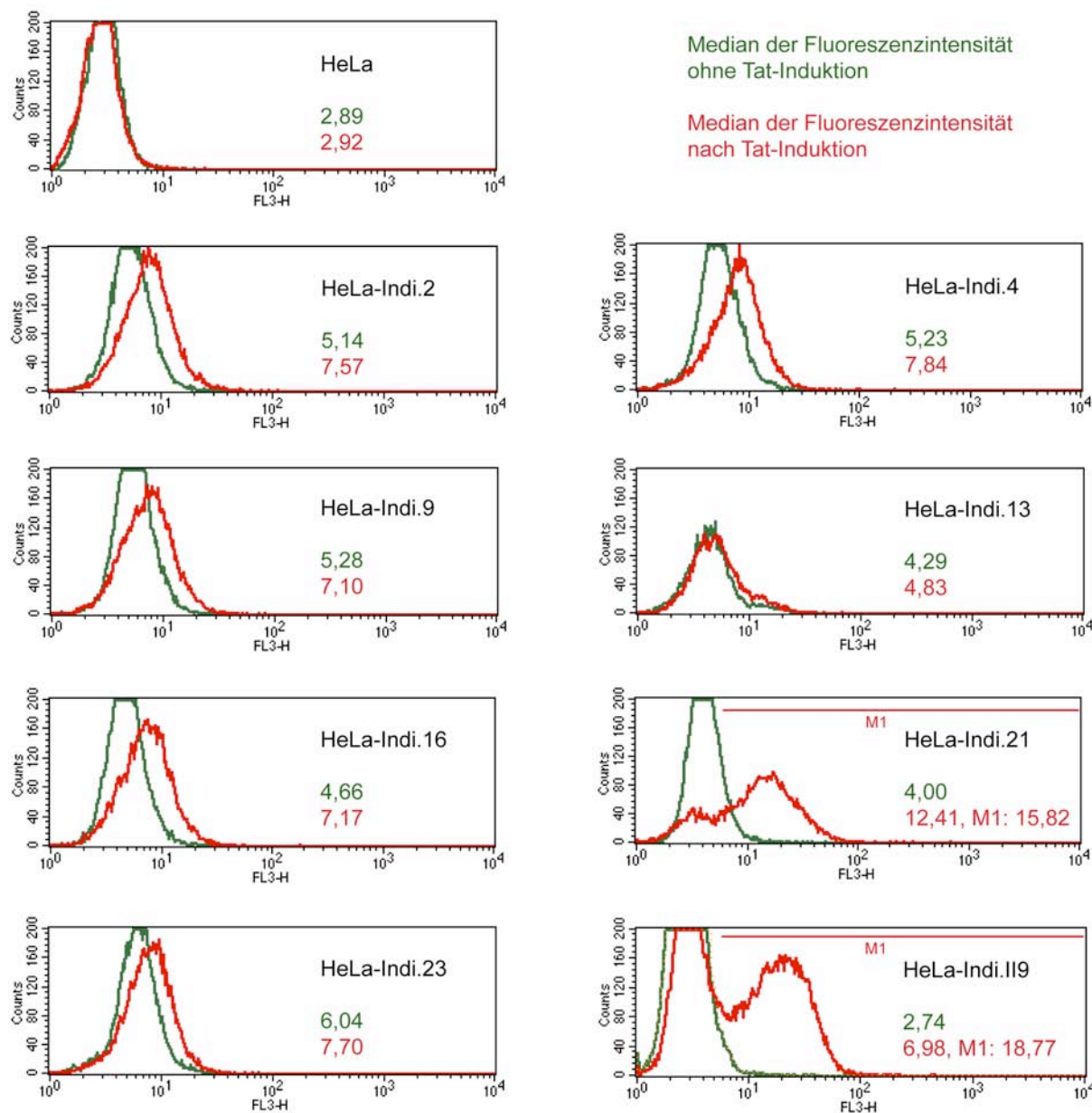
### **FACS-Analyse zeigt unterschiedliche Expressionslevel vor und nach Tat-Aktivierung**

Nach Vereinzlung der Zellen kann noch nicht sicher gesagt werden, ob das vollständige Indikatorplasmid integriert ist und in wie weit sich die entstandenen Zellklone durch Tat induzieren lassen. Um die Aktivierbarkeit durch das virale Protein Tat zu bestimmen, wurden Zellen der verschiedenen Zelllinien in 6-Well-Platten ausgesät und parallel ein Well mit 500 ng des Expressionsplasmids pL3Tat aktiviert und eins unbehandelt gelassen. 48 Std. nach Transfektion wurden die Zellen im FACS analysiert und die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten in folgenden Histogrammen dargestellt. Die Mediane der Fluoreszenzintensitäten sind angegeben und stellen ein Maß für die Grundaktivität und Induzierbarkeit dar (Abb. 19).

Die entstandenen Zelllinien lassen sich anhand ihrer Induzierbarkeit durch Tat in drei Klassen einteilen: HeLa-Indi.13 lässt sich nicht induzieren, HeLa-Indi.2, HeLa-Indi.4, HeLa-Indi.9, HeLa-Indi.16 und HeLa-Indi.23 lassen sich schwach induzieren, HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.119 lassen sich deutlich induzieren. HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.119 zeigen nach der Induktion durch Tat eine sich deutlich abhebende Population. Ein Teil der Zellen scheint nicht induziert, welcher wahrscheinlich die nicht Tat-transfizierte Population darstellt. Aus diesem Grund sind hier zusätzlich die Mediane der Fluoreszenzintensitäten der aktivierten Population angegeben (M1).

Der Median der roten Fluoreszenz in den nicht induzierten Zellen zeigt, dass die Zelllinien verschieden starke Hintergrundfluoreszenz bzw. Grundaktivität der HIV-LTR besitzen, wobei

die Zelllinie HeLa-Indi.II9 die schwächste und die Zelllinien HeLa-Indi.13 und HeLa-Indi.21 eine sehr geringe Grundfluoreszenz haben (Abb. 19).



**Abbildung 19**

**Fluoreszenzhistogramme der Zelllinien vor und nach Tat-Aktivierung.** Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten vor (grüne Linie) und nach Tat-Aktivierung (rote Linie). Die X-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität des FL-3 Kanals für das Reporterprotein *DsRed*, die Y-Achse die Anzahl der Zellen. Der Median gibt die mediane Fluoreszenzintensität der nicht induzierten (grün) und induzierten (rot) Zellen an.

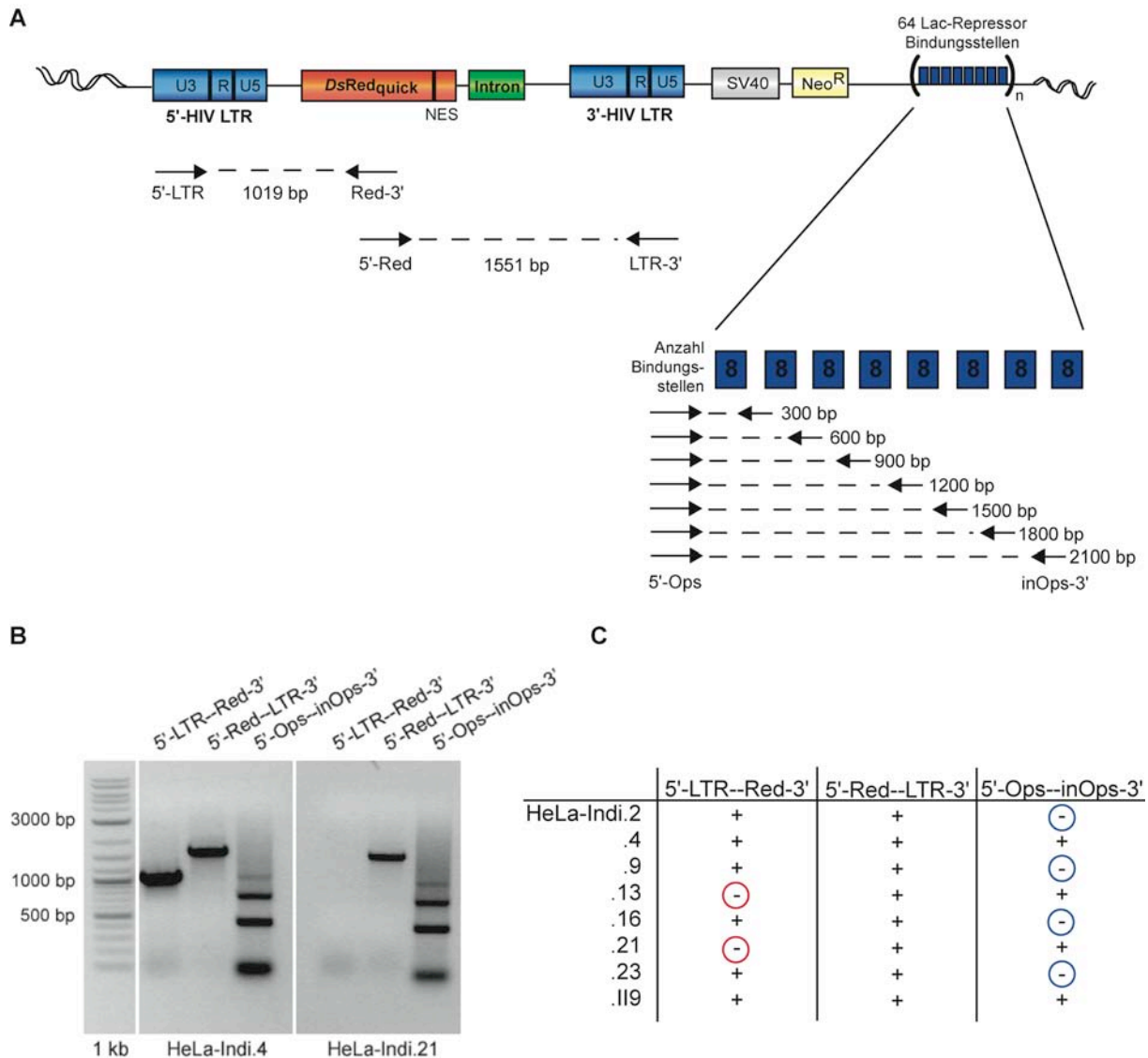
### **PCR-Analyse auf genomische DNA zeigt zum größten Teil vollständige Integration der Indikatorgenkassette**

Von der Expressionsanalyse und Induzierbarkeit der *DsRed*-Expression durch Transfektion eines Tat-Expressionsplasmids alleine kann man noch nicht auf die vollständige Integration des Plasmids in die genomische DNA der Zelllinien schließen, da es bei diesem Vorgang durchaus zu Verlust von Sequenzbereichen kommen kann. Da es aber von Bedeutung ist, dass die wichtigsten Bestandteile des Transgens integriert sind, wurde dies durch PCR überprüft. Einen wichtigen Bestandteil stellt zum einen die Genkassette dar, bestehend aus der 5'-LTR, der codierenden Sequenz für das Reportergen *DsRed*, dem Intron und der 3'-LTR. Zum anderen müssen für die Visualisierung des Transgens auf DNA-Ebene und die sich daraus ableitenden Lokalisationsuntersuchungen die Bindungsstellen für den Lac-Repressor integriert sein.

Die vollständige Integration des Plasmids bzw. der wichtigen Bestandteile davon wurde durch PCR auf die genomische DNA überprüft. Die genomische DNA wurde aus den acht verschiedenen Zelllinien präpariert und auf die Vollständigkeit der genannten Bereiche getestet. Dazu wurden drei verschiedene Primerpaare gewählt, die durch Amplifikation verschiedene Produkte ergeben: ein Produkt beginnend an der 5'-LTR bis in die Mitte der *DsRed*-Sequenz, ein zweites von hier beginnend bis zum Ende der 3'-LTR und als drittes die Operatorsequenz. In Vorversuchen zur Funktionalität der Primerpaare in der PCR zeigte sich schon, dass die Amplifikation der 2,4 kb langen Sequenz für die 64 repetitiven LacI-Bindungsstellen nicht möglich war. Deshalb wurde ein neuer Primer gewählt, der in einer Sequenz bindet, die jeweils zwischen acht der LacI-Bindungsstellen vorkommt und somit eine Leiter an Produkten ergibt, die ein Vielfaches von acht Bindungsstellen (300 bp) darstellen. Abbildung 20 zeigt die schematischen Bindungsstellen für die Primer, das Gel von zwei Zelllinien als Beispiel und eine Tabelle mit den aufgelisteten Ergebnissen.

Der Bereich von der 5'-LTR bis in die Mitte des Transgens konnte in allen Zelllinien bis auf HeLa-Indi.13 und HeLa-Indi.21 nachgewiesen werden. Der anschließende Bereich bis zur 3'-LTR ist in allen Zelllinien vorhanden. Die Operatorsequenzen sind in der Hälfte der Zellklone nicht nachzuweisen. Die Zelllinien HeLa-Indi.4 und HeLa-Indi.119 tragen die vollständige Expressionskassette und wahrscheinlich die komplette Anzahl an Operatoren. Ob die vollständige Anzahl an Operatoren enthalten ist, lässt sich nicht sicher sagen, da theoretisch durch die Amplifikation mit den genannten Primern das größtmögliche Produkt ca. 2100 bp sein sollte, die Intensität der Banden aber mit der Größe abnimmt und keine deutliche Bande von 2100 bp Länge sichtbar ist. HeLa-Indi.2, HeLa-Indi.9, HeLa-Indi.16 und HeLa-Indi.23

tragen zwar die Genkassette, jedoch keine Operatoren und die Zelllinien HeLa-Indi.13 und HeLa-Indi.21 tragen die Operatoren, zeigen aber eine Trunkierung im Bereich der 5'-LTR.



**Abbildung 20**

**Nachweis der Integration des vollständigen Indikatorgens in den verschiedenen Zelllinien durch PCR. A)** Schematische Darstellung des Indikatorgens und der Bereiche, die durch die drei verschiedenen Primerpaare amplifiziert werden. Pfeile stellen die Primer dar, bp-Angaben geben die Länge des erwarteten Produkts an. **B)** Beispiel zweier Gelfotos der aufgetrennten Fragmente der drei verschiedenen PCRs. **C)** Tabellarische Zusammenstellung der PCR-Ergebnisse für alle acht Zelllinien. „+“ deutet ein vorhandenes PCR-Produkt an, „-“ kein PCR-Produkt. Rote Kreise heben die trunkierten 5'-LTRs, blaue Kreise die fehlenden Operatoresequenzen hervor.

Durch weiterführende PCR-Analysen konnte mittels Primer-Walking die Bruchstelle im Klon HeLa-Indi.21 bestimmt werden. Bei der Integration in die genomische DNA der Wirtszelle ist bei diesem Klon der Bereich stromaufwärts von Nukleotid -240 der 5'-HIV-LTR verloren gegangen. Dieser Bereich beinhaltet einige Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen und die Position des Nucleosom-0. Eine schematische Darstellung und eine Funktionsanalyse für die Transaktivierung durch Tat wird in 3.3.3 und der Abbildung 26 näher erläutert.

### **Die Zelllinien HeLa-Indi.4, HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.II9**

Von der HIV-LTR ist bekannt, dass sie grundsätzlich eine Basisaktivität besitzen muss, um Tat-unabhängig RNAs für die frühen regulatorischen Proteine wie Tat und Rev zu transkribieren, wobei diese aufgrund des Integrationsortes des Provirus unterschiedlich hoch ausfallen kann (vgl. 1.2.2). Für die Untersuchung von Lokalisationsunterschieden im Kern bei der Aktivierung der Transkription, sollte die Grundaktivität möglichst gering, die Induktion aber möglichst hoch sein, um sicher zu sein, dass mögliche Lokalisationsveränderungen oder auch Modifikationsunterschiede der Nucleosomen mit der Transkriptionsaktivierung in Zusammenhang stehen. Die beiden Zelllinien HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.II9 zeigen diese Eigenschaften. Sie zeigen keine im FACS detektierbare Grundaktivität des Indikatorgens, lassen sich durch Expression von Tat aber deutlich zur Expression des Indikatorgens *DsRed* induzieren. Die Zelllinie HeLa-Indi.4 dagegen zeigt eine detektierbare *DsRed*-Fluoreszenz bereits ohne Induktion durch Tat (vgl. 3.3.3), trägt aber wie die beiden anderen genannten Zelllinien die Operatorsequenzen (s.o. PCR-Analyse) und eignet sich daher als Vergleichszelllinie zur Untersuchung von Aktivierungs-unabhängigen Lokalisationsunterschieden und der Chromatinorganisation. Im Folgenden muss noch getestet werden, inwiefern die Trunkierung der 5'-LTR vom Klon HeLa-Indi.21 Veränderungen beim Transkriptionsverhalten zeigt.

Die folgenden Untersuchungen werden aus den genannten Gründen mit diesen drei Zelllinien - HeLa-Indi.4, HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.II9 - weitergeführt.

### **3.3.2 Charakterisierung der drei Zelllinien auf DNA-Ebene**

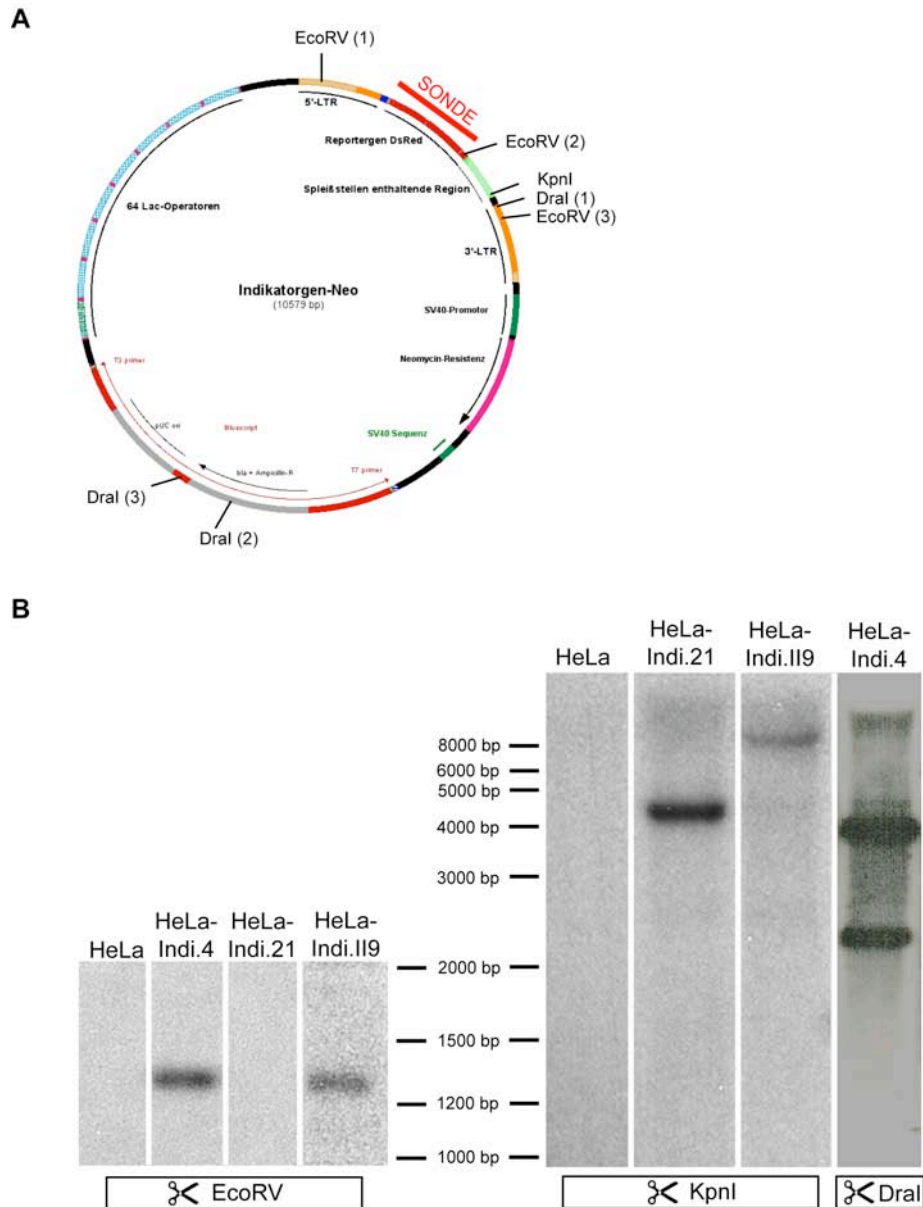
Einige Parameter der Zelllinien müssen bekannt sein, um die Ergebnisse vernünftig interpretieren zu können. So muss z.B. sichergestellt sein, dass das Indikatorgen nur an einem Ort ins Genom der Wirtszelle integriert ist, um auszuschließen, dass Beobachtung der Lokalisation oder Veränderungen der Chromatinstruktur auch wirklich durch Transkriptionsaktivierung an diesem Ort verursacht wurden. Und die Transkription nicht durch ein nicht

sichtbares Indikatorgen, das die Operatorsequenzen bei der Integration verloren hat, angezeigt wurde. Darüber hinaus ist es wichtig den Integrationsort des Indikatorgens zu kennen, um die Auswirkung der Tat-Aktivierung auf die linear benachbart liegenden Gene gezielt betrachten zu können. Außerdem erhält man so Auskunft über den generellen Chromatin- und Transkriptionsstatus der Integrationsgegend. Für diesen Aspekt ist es weiterhin wichtig zu wissen, wie viele Kopien des Chromosoms vorliegen, in das das Indikatorgen inseriert wurde, da bei einer multiplen Kopienzahl nicht mehr gesagt werden kann, wie die Expressionsregulation kontrolliert wird und welche Bereiche welcher Chromosomen aktiv sind. Diese Fragen werden im Folgenden behandelt, um die drei Zelllinien genauer zu charakterisieren.

### **Der Southern Blot zeigt einen bzw. zwei Integrationsorte**

Um die genaue Anzahl an Integrationsorten in den drei Zelllinien HeLa-Indi.4, HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.II9 zu bestimmen, wurde ein Southern Blot mit genomischer DNA der Zellen durchgeführt. Die DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, die entweder nur einmal/mehrmals im Indikatorplasmid schneiden oder als Kontrolle nur die kodierende Sequenz des Indikatorgens ausschneiden. Als Sonde wurde die Sequenz von *DsRed* gewählt, da diese in humanen Zellen nicht vorkommt und daher sehr spezifisch nur das Transgen zeigt (vgl. Abb. 21A). Durch Schneiden der DNA mit EcoRV wird ein großer Teil der 5'-LTR und die kodierende Sequenz von *DsRed* ausgeschnitten und somit die generelle stabile Integration des Indikatorgens ins Genom der Wirtszelle für die Zelllinien HeLa-Indi.4 und HeLa-Indi.II9 gezeigt. Bei der Zelllinie HeLa-Indi.21 ist auf dieser Höhe keine Bande zu erwarten, da die eine Schnittstelle für EcoRV (EcoRV (1)) bei der trunkierten LTR in Klon.21 fehlt. Das Enzym KpnI schneidet nur einmal im Indikatorkonstrukt. Daher spiegelt die Anzahl an sichtbaren Banden im Blot, welche die Sonde gebunden haben, die Anzahl an Integrationsorten wider. Durch einen Verdau mit DraI erhält man entweder eine interne Bande des Indikatorgens, die sich eindeutig über die Größe identifizieren lässt (6234 bp), wenn das Plasmid zwischen den DraI-Schnittstellen (1) und (2) bzw. (3) gebrochen ist, oder - je nach Bruchpunkt des Plasmids bei der Integration ins Genom der Zelle - die Anzahl an Integrationsorten. Abbildung 21B zeigt die Southern Blots.

Der Southern Blot der mit EcoRV verdauten DNA zeigt die stabile Integration des Indikatorgens in den Zelllinien HeLa-Indi.4 und HeLa-Indi.II9. Der Verdau der Zelllinien HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.II9 mit KpnI zeigt eine Bande im Gel, die jeweils einen Integrationsort im Genom widerspiegelt. Der Verdau der genomischen DNA der Zelllinie HeLa-Indi.4 zeigt zwei Banden und somit zwei Integrationsorte (Abb. 21B).



**Abbildung 21**

**Southern Blot der drei Zelllinien HeLa-Indi.4, HeLa-Indi.21, HeLa-Indi.I19 und der parentalen HeLa-Zellen.**  
**A)** Plasmidkarte mit den verwendeten Restriktionsenzymen und Lage der Sonde. **B)** Aufgetragen sind 10 µg verdauter genomischer DNA. Markierte Sequenz von *DsRed* diente als Sonde. Die Restriktionsenzyme des jeweiligen Ansatzes sind unterhalb genannt.

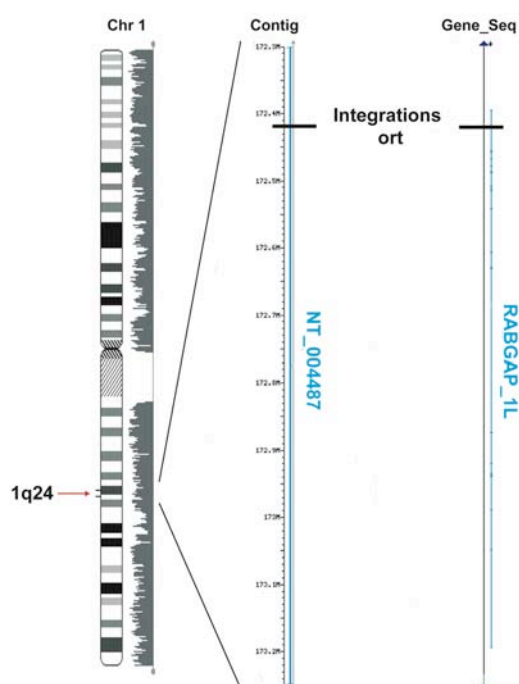
**Bestimmung der Integrationsorte**

Der Integrationsort des Indikatorgens konnte nur in der Zelllinie HeLa-Indi.I19 durch eine Ligation vermittelte PCR (LM-PCR) ermittelt werden. Dabei wird von genomischer DNA ausgehend, die mit einem Restriktionsenzym verdaute wurde, durch einen spezifischen, biotinylierten Primer für das Transgen ein DNA-Strang synthetisiert, an dessen Ende ein



Linker ligiert wird. Nach Anreicherung der biotinylierten DNA-Stränge kann dieses Fragment durch spezifische Primer für das Transgen und den Linker in drei PCR-Runden amplifiziert werden. Das dabei entstehende Produkt enthält bekannte Sequenzen des Transgens und anschließend daran die unbekannte genomische Sequenz. Durch Sequenzierung und einem Abgleich mit der Datenbank wurde so die genomische Sequenz ermittelt, die den Integrationsort umgibt.

In der Zelllinie HeLa-Indi.II9 ist das Indikatorgen in den langen Arm des Chromosom 1, in der Bande 1q24, ungefähr an Nukleotid-Position 172,4 Mbp integriert. Im Bereich der Integrationsstelle befindet sich das Gen für das RAB GTPase activating protein 1 like (RABGAP-1L). Nach neuesten Blast-Ergebnissen liegt das Indikatorgen im ersten Intron bzw. untranslatierten Bereich des RABGAP-1L Gens (Abb. 22).



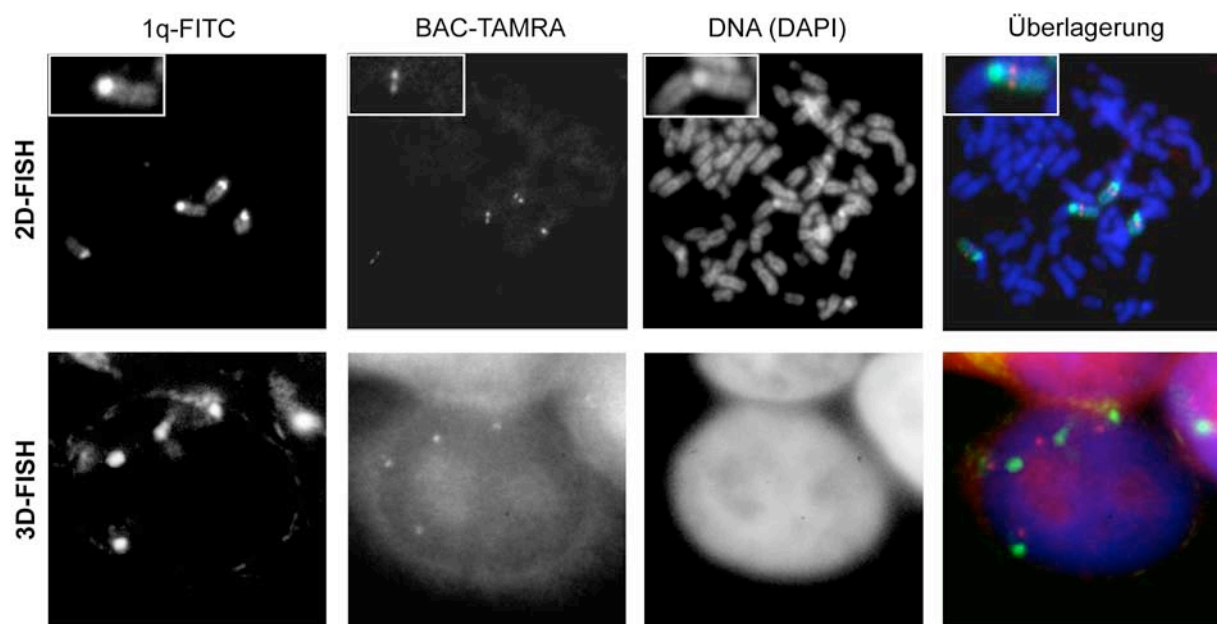
**Abbildung 22**

**Integrationsort des Indikatorgens in HeLa-Indi.II9.** Karyogramm von Chromosom 1 mit dem Bandenmuster und Gendichte. Der rote Pfeil zeigt den Integrationsort in Bande 1q24, daraus sind das Contig und die umliegenden Gensequenzen heraus vergrößert.

### FISH-Analyse

Eine Möglichkeit herauszufinden wie viele Chromosomen eine Zelle trägt, ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit spezifischen Sonden für ganze Chromosomen (Chromosomen Paint) oder Bereiche von Chromosomen.

In der Indikatorzelllinie HeLa-Indi.II9 wurde der Integrationsort auf Chromosom 1q24 bestimmt. Durch eine 2D- und 3D-FISH mit einer Sonde gegen den langen Arm von Chromosom 1 (#1q) konnte die Anzahl an diesem Chromosom in dieser Zelllinie bestimmt und gezeigt werden, dass der lange Arm von Chromosom 1 (1q) in vierfacher Kopie vorliegt. Parallel wurde der BAC-Klon RP11-72K9, der über dem Integrationsort liegt, als Sonde verwendet. Das Signal des BAC-Klons konnte ebenfalls auf jedem der langen Arme der Chromosomen 1 lokalisiert werden (Abb. 23).



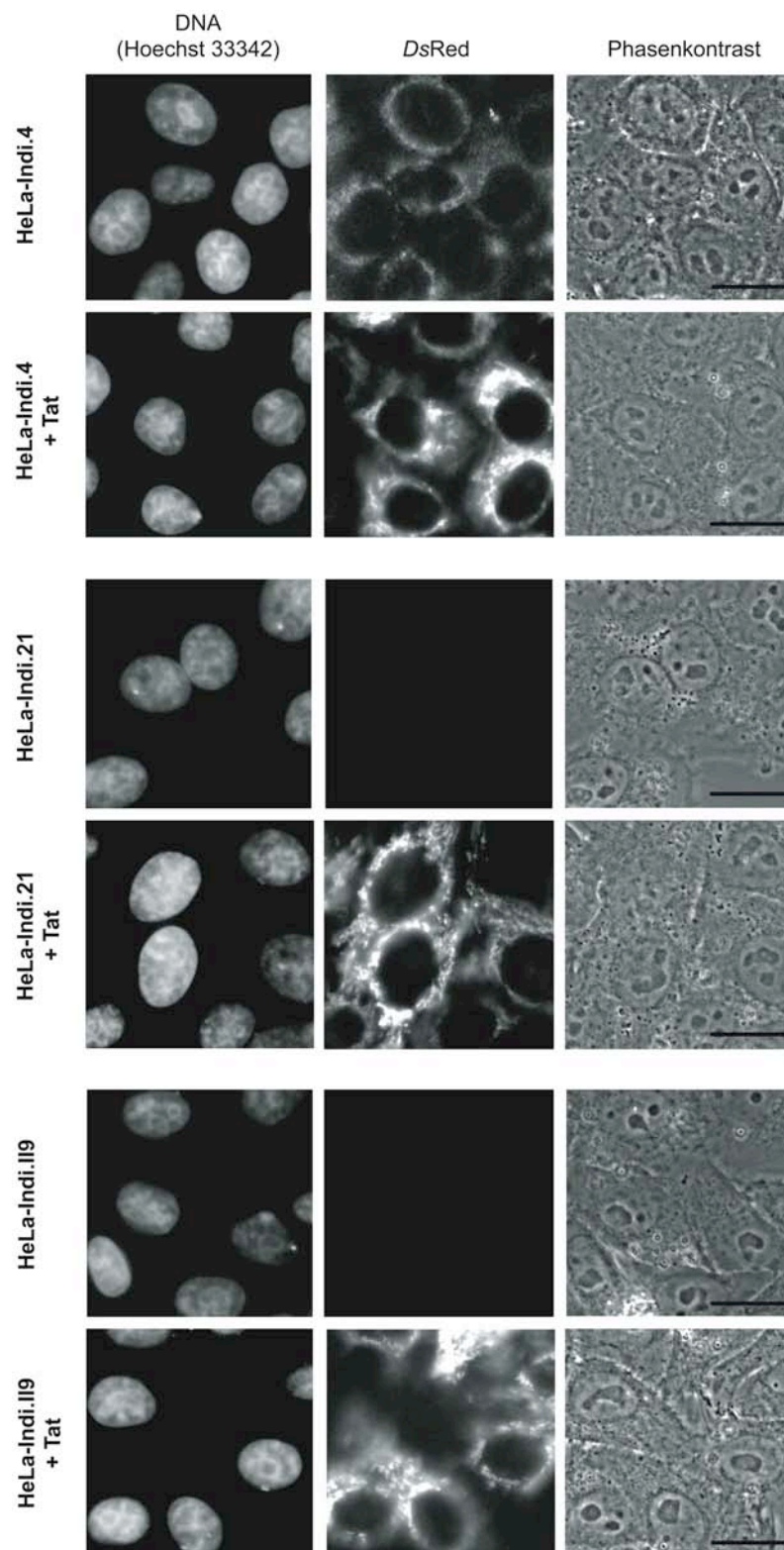
**Abbildung 23**

**BAC FISH auf HeLa-Indi.II9.** Gezeigt ist eine 2D-FISH auf eine Metaphasenspreitung und eine 3D-FISH, die eine Projektion von zwei verschiedenen Ebenen des selben Zellkerns darstellt. Die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt, eine FITC markierte Sonde zeigt den langen Arm von Chromosom 1 (#1q), der BAC-Klon RP11-72K9 überspannt den Integrationsort des Indikators (TAMRA markiert), das letzte Bild zeigt eine Überlagerung. In der oberen Reihe ist eins der vier Chromosomen 1 zusätzlich vergrößert dargestellt.

### 3.3.3 Analyse der Transkriptionsaktivierung der drei Zelllinien auf Proteinebene

In den ersten Histogrammen der FACS-Analyse (vgl. 3.3.1) wird deutlich, dass die verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Hintergrundfluoreszenz des Indikators zeigen und sich unterschiedlich stark induzieren lassen. Dies sollte zum einen für die drei Zelllinien im Mikroskop betrachtet werden, um die verschiedenen Fluoreszenzlevel des GePS

einschätzen zu können, und zum anderen sollte die Induktion durch das Tat-Protein mit Hilfe einer quantitativen FACS-Analyse bestimmt werden.



**Abbildung 24**

**Fluoreszenzaufnahmen der drei Indikatorgen-Zelllinien mit und ohne Tat-Aktivierung.** Die folgenden Kanäle sind von links nach rechts dargestellt: Hoechst 33342, DsRed und Phasenkontrast. Scale Bar: 20  $\mu\text{m}$ .

### **Mikroskopie**

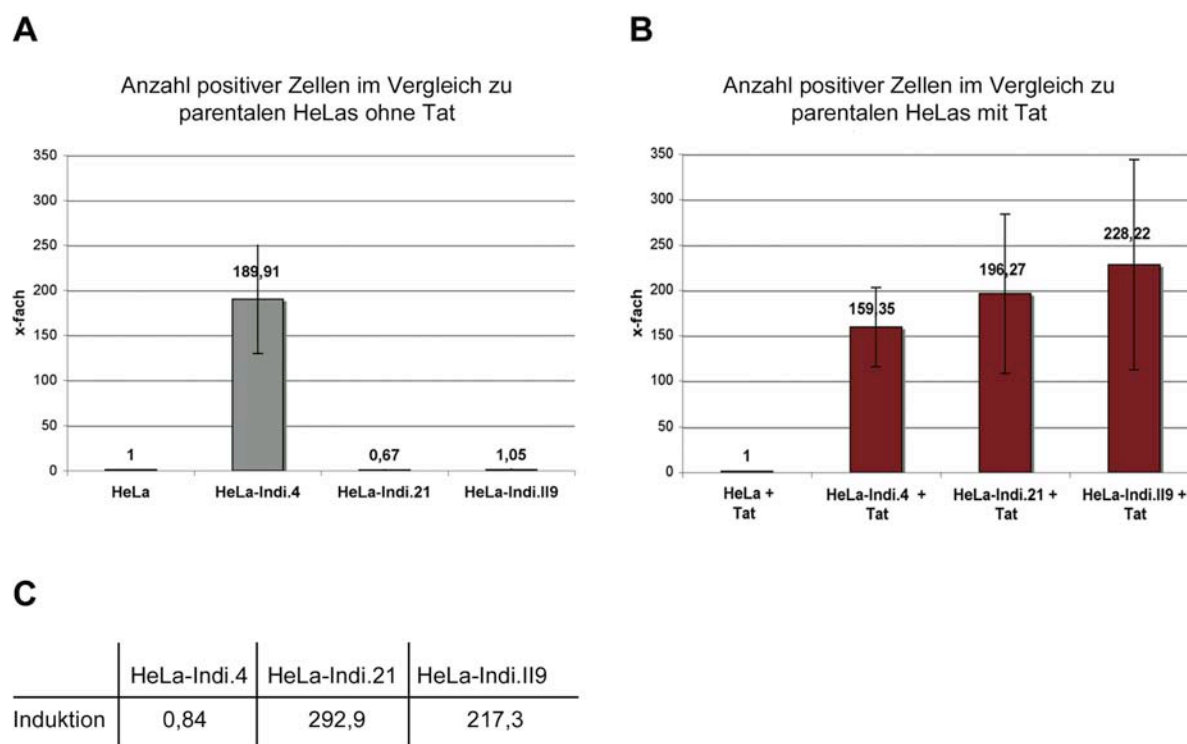
Die drei Zelllinien HeLa-Indi.4, HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.119 wurden ausgesät und z.T. mit dem Tat-Expressionsplasmid pL3Tat transfiziert. 48 Std. nach der Transfektion wurde die DNA mit Hoechst 33342 gegengefärbt und Bilder am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Bei der Zelllinie HeLa-Indi.4 ist auch ohne Tat-Expression eine rote Hintergrundfluoreszenz im Zytoplasma zu erkennen, bei den beiden anderen Zelllinien nicht. Durch die Expression des Induktors Tat kann die rote Fluoreszenz in der Zelllinie HeLa-Indi. 4 gesteigert und in den beiden anderen Zelllinien deutlich induziert werden (Abb. 24). Die Fluoreszenzintensitäten sind unter den Bildern nicht direkt vergleichbar, da zur Aufnahme der roten Fluoreszenz z.T. eine Auto-Expositionszeit gewählt wurde. Diese war bei Klon HeLa-Indi.4 nach Tat-Induktion kürzer als vor Induktion, was deutlich macht, dass die Fluoreszenzintensität auch bei diesem Klon noch gesteigert wurde (vgl. Abb. 24). Die Expositionszeit der nicht induzierten Zellen von HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.119 wurde fix gewählt.

### **FACS-Analyse zur Bestimmung der Induzierbarkeit durch Tat**

Die Induzierbarkeit der drei verschiedenen Zelllinien wurde durch eine FACS-Analyse 48 Std. nach Induktion bestimmt. Dazu wurden die Zelllinien HeLa-Indi.4, HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.119 und die parentalen Zellen HeLa in jeweils zwei Wells einer 6-Well-Platte ausgesät und jeweils eines davon durch Transfektion von 500 ng eines Tat-Expressionsplasmid (pL3Tat) induziert, was zur Expression des LTR-regulierten Indikatorproteins *DsRed* führte. Es wurden die Prozentzahlen der *DsRed*-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl ermittelt und ins Verhältnis zu HeLa-Zellen mit und ohne Tat gesetzt (Abb. 25).

Die Graphen zeigen deutlich, dass die Anzahl an *DsRed*-positiven Zellen in der Zelllinie HeLa-Indi.4 bereits ohne Tat das Niveau der mit Tat induzierten Zellen zeigt. Daraus wird auch klar, dass die Induktion in der Zelllinie HeLa-Indi.4 nicht anhand der *DsRed*-positiven Zellzahl, sondern über die Zunahme der Fluoreszenzintensität stattfindet, was auch die Mikroskopie-Daten in Abbildung 24 zeigen. Die anderen beiden Zelllinien zeigen eine kaum höhere Anzahl an positiven Zellen ohne Tat als die parentalen HeLa-Zellen. Die Zelllinien HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.119 zeigen nach Expression von Tat jedoch einen ca. 200-300 fachen Anstieg der Anzahl an *DsRed*-positiven Zellen. Die großen Standardabweichungen sind auf die stark unterschiedlichen Transfektionseffizienzen der einzelnen Ansätze zurückzuführen. Eine Transfektionskontrolle in Form eines Expressionsplasmids für ein fluoreszierendes Protein wurde z.T. in den Ansätzen mitgeführt. Für die Auswertung der Tat-

Induktion bei den HeLa-Indi-Zelllinien stellte sich jedoch heraus, dass die verlässlichsten Ergebnisse durch Einbezug der Gesamtpopulation erzielt wurden.



### Abbildung 25

**FACS-Analyse zur Induktion der drei Zelllinien HeLa-Indi.4, HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.II9 durch Transfektion eines Expressionsplasmids für das virale Protein Tat.** Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. **A)** Anzahl positiver Zellen ohne Induktion im Verhältnis zu parentalen HeLa-Zellen. **B)** Anzahl positiver Zellen nach Tat-Induktion im Verhältnis zu parentalen HeLa-Zellen. **C)** Induktion errechnet durch den Quotienten aus x-facher Anzahl induzierter positiver Zellen und x-facher Anzahl nicht induzierter positiver Zellen.

### Die verkürzte HIV-LTR in Klon.21 ist vollständig induzierbar

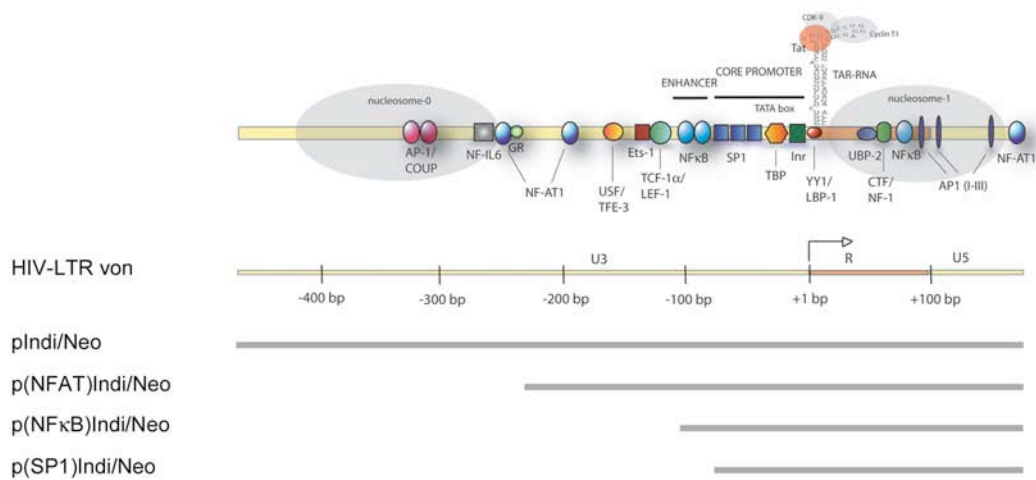
Durch Primer-Walking wurde festgestellt, dass die 5'-HIV-LTR im Zellklon HeLa-Indi.21 eine Verkürzung aufweist, die durch Bruch an dieser Stelle bei der Integration in das Genom der Zelle entstanden sein muss (vgl. 3.3.1). Dabei ist der Bereich ab Nukleotid -240 5' des Transkriptionsstarts verloren gegangen und somit auch potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, wie z.B. AP-1 und NF-IL6. In diesem Bereich (-340 bis -184) vermutet man darüber hinaus ein negatives regulatorisches Element (NRE), bei dessen Verlust die Basisaktivität der HIV-1 LTR gesteigert werden kann (Rosen, Sodroski et al. 1985). Außerdem sollte die Erkennungs-Sequenz für die Bindung von Nucleosom-0 nicht mehr vorhanden sein.

Um sicher zu gehen, dass die verkürzte 5'-HIV-LTR im Zellklon HeLa-Indi.21 die Tat-abhängige Aktivierung der Transkription weder positiv noch negativ beeinflusst, wurde ein Indikatorgen kloniert, das exakt die verkürzte HIV-LTR aus Klon Indi.21 als Promotor besitzt. Zusätzlich wurden zwei weitere Indikatorgene hergestellt, die sich durch weitere Verkürzung der 5'-HIV-LTR ausweisen. So entstanden die Konstrukte p(NFAT)Indi/Neo<sup>R</sup>, dessen LTR der von Klon HeLa-Indi.21 entspricht, p(NFκB)Indi/Neo<sup>R</sup>, dessen LTR den Enhancer-Bereich und Core-Promotor-Bereich enthält, aber sämtliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen 5' verloren hat, und p(SP1)Indi/Neo<sup>R</sup>, dessen LTR darüber hinaus nur noch den Core-Promotor und 3' davon gelegene Sequenzen enthält (Abb. 26A).

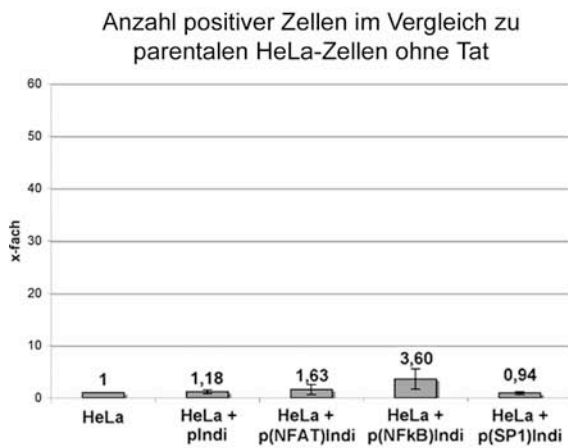
Die Induzierbarkeit der verkürzten 5'-HIV-LTRs wurde in HeLa-Zellen getestet. Dazu wurden HeLa-Zellen mit den Indikatorstrukturen, pFRED als GFP-Transfektionskontrolle und pC-Tat als Tat-Expressionsplasmid co-transfiziert und 24 Std. später im FACS analysiert. In der Auswertung wurden *DsRed*-positive Zellen innerhalb der transfizierten Population (GFP-positiv) berücksichtigt und auf HeLa-Zellen ohne Indikatorstruktur normiert (Abb. 26B). Die Induktion der *DsRed*-Expression verringert sich in diesem Experiment mit zunehmender Verkürzung der 5'-HIV-LTR. Wobei die Anzahl an positiven Zellen nach Tat-Induktion für die drei Indikatorstrukturen pIndi/Neo<sup>R</sup>, p(NFAT)Indi/Neo<sup>R</sup> und p(NFκB)Indi/Neo<sup>R</sup> im Bereich der erwarteten Zahlen bei voller Aktivierbarkeit liegen (vgl. 3.2.2). Erst das verkürzte Indikatorstruktur p(SP1)Indi/Neo<sup>R</sup> zeigt nahezu keine positiven Zellen mehr nach Tat-Aktivierung. Die Induktion dagegen sinkt bereits ab dem verkürzten Konstrukt p(NFκB)Indi/Neo<sup>R</sup>, das ohne Tat-Aktivierung einen höheren Hintergrund an Reporteraktivität zeigt und daher in einer verringerten Induktion resultiert.

Der Core-Promotor alleine - ohne Enhancer und 5' davon liegende Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen - lässt sich somit kaum durch Tat aktivieren, zeigt aber auch keine Basisaktivität mehr. Der Core-Promotor mit Enhancer Region zeigt eine vollständige Transkriptionsaktivierung, jedoch eine höhere Basisaktivität, was in einer verminderten Induktion resultiert. Die Funktion eines negativen regulatorischen Elements, das die Basisaktivität der HIV-1 LTR unterdrückt, könnte man höchstens für dieses Konstrukt - p(NFκB)Indi/Neo<sup>R</sup> - vermuten, da bei diesem Konstrukt die Grundaktivität der LTR ohne Tat höher ist als in den anderen Konstrukten (Abb. 26B-D).

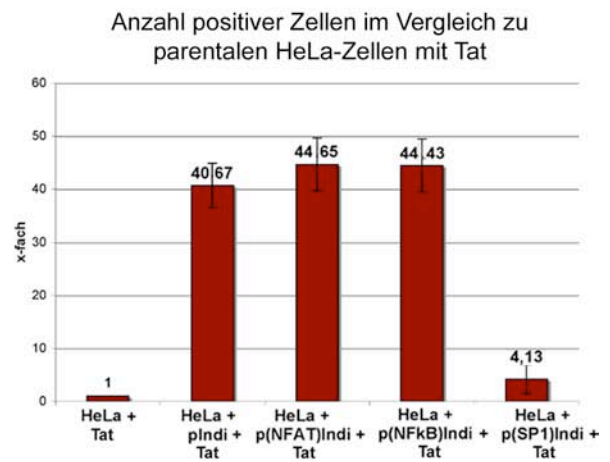
**A**



**B**



**C**



**D**

	pIndi	p(NFAT)Indi	p(NFκB)Indi	p(SP1)Indi
Induktion	34,5	27,4	12,3	4,4

**Abbildung 26**

**Schematische Darstellung der HIV-LTR und der Bereiche, die in den verkürzten Indikatorkonstrukten vorhanden sind und deren Induktion, bestimmt durch eine FACS-Analyse. A)** Schematische Darstellung der LTR. Die grauen Balken geben die Bereiche an, die in den einzelnen Konstrukten mit verkürzter HIV-LTR noch vorhanden sind. **B)-D)** FACS-Analyse zur Induktion der verkürzten LTR durch Tat. Es wurde *DsRed* als Reporter ausgelesen und die Anzahl positiver Zellen ins Verhältnis zur Parentalzelllinie HeLa gesetzt. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. **B)** Anzahl positiver Zellen ohne Tat-Expression. **C)** Anzahl positiver Zellen mit Tat-Expression. **D)** Errechnete Induktionen als Quotienten von induziert durch nicht induziert.

### **3.4 Die Visualisierung des Indikatorgens ist in lebenden Zellen nur episomal möglich**

Das GePS wurde dahingehend entwickelt, Bewegungen des Transgens bei der Transkriptionsaktivierung zu beobachten, mögliche Lokalisationsunterschiede sichtbar zu machen und diese im Kern über die Zeit beobachten zu können. Das CT-IC-Modell beruht auf der Theorie, dass ein Gen sich bei der transkriptionellen Aktivierung vom Chromatin bzw. Chromosomenterritorium ins Interchromatin bewegen muss, um für sämtliche Faktoren, die für die Transkription und Prozessierung benötigt werden und im IC lokalisieren, zugänglich zu sein (vgl. 1.1.2 und 1.1.3).

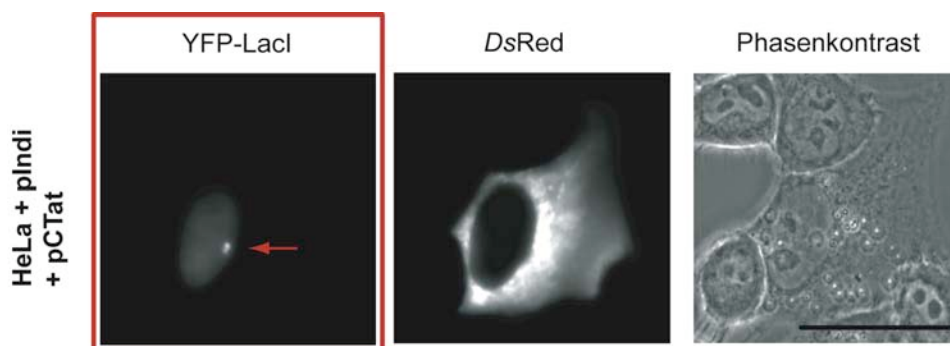
Die Visualisierung des Indikatorgens durch die Bindung der Fluoreszenz-markierten Lac-Repressor-Proteine an die Operatorsequenzen im Indikatorgen bildet die Grundvoraussetzung, um transkriptionsaktivierungsbedingte Bewegungen des Indikatorgens in der lebenden Zelle im 3D-Raum des Kerns beobachten und verfolgen zu können. In Kapitel 3.1.3 konnte die spezifische Bindung der verschiedenfarbigen „Gene Tags“ an die Operatorsequenzen des Indikatorgens prinzipiell gezeigt werden. Transient transfizierte Ansammlungen von Indikatorgen-Plasmiden konnten als Punkte im Kern erkannt werden. In den Zelllinien wird dies eine technische Herausforderung sein, da durch den Southern Blot gezeigt werden konnte, dass in den drei untersuchten Zelllinien nur ein einzelnes Indikatorgen-Plasmid an einem bzw. zwei Integrationsorten integriert ist. Da der Lac-Repressor zur Bindung an eine Operator-Sequenz Dimere bilden muss und ein integriertes Plasmid nur 64 Lac-Operatoren trägt, bedeutet dies, dass die Visualisierung auf höchstens 128 fluoreszierende Lac-Repressor-Moleküle beschränkt ist und diese ausreichen müssen, um das Indikatorgen über eine längere Zeitspanne beobachten zu können.

#### **3.4.1 Das episomale Indikatorgen ist durch den „Gene Tag“ zu erkennen**

Wie bereits in 3.1.3 gezeigt, kann das episomale Indikatorgen durch die Co-Expression eines „Gene Tags“ eindeutig visualisiert werden. Das Indikatorgen stellt sich in den Kernen der Zellen als mehr oder minder punktförmiges Signal dar. Die meisten Zellen zeigen ein oder ein paar wenige Ansammlungen des Indikatorgens. Abbildung 27 zeigt HeLa-Zellen, die mit dem Indikatorgen und dem „Gene Tag“ YFP-LacI transfiziert und nach 24 Std. am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen wurden. Um zu demonstrieren, dass es sich bei dem visualisierten Episomen-Cluster um eine Ansammlung von Indikatorgen-Plasmiden handelt,



wurde zusätzlich ein Tat-Expressionsplasmid co-transfiziert, wodurch die Expression des Reportergens *DsRed* induziert wird und die Zellen ein rotes Zytoplasma zeigen.



**Abbildung 27**

**Fluoreszenzaufnahmen der transient transfizierten HeLa-Zellen mit dem Indikatorgen *pIndi*, einem Tat-Expressionsplasmid und dem „Gene Tag“ YFP-LacI zur Visualisierung des Indikatorgens auf DNA-Ebene.**

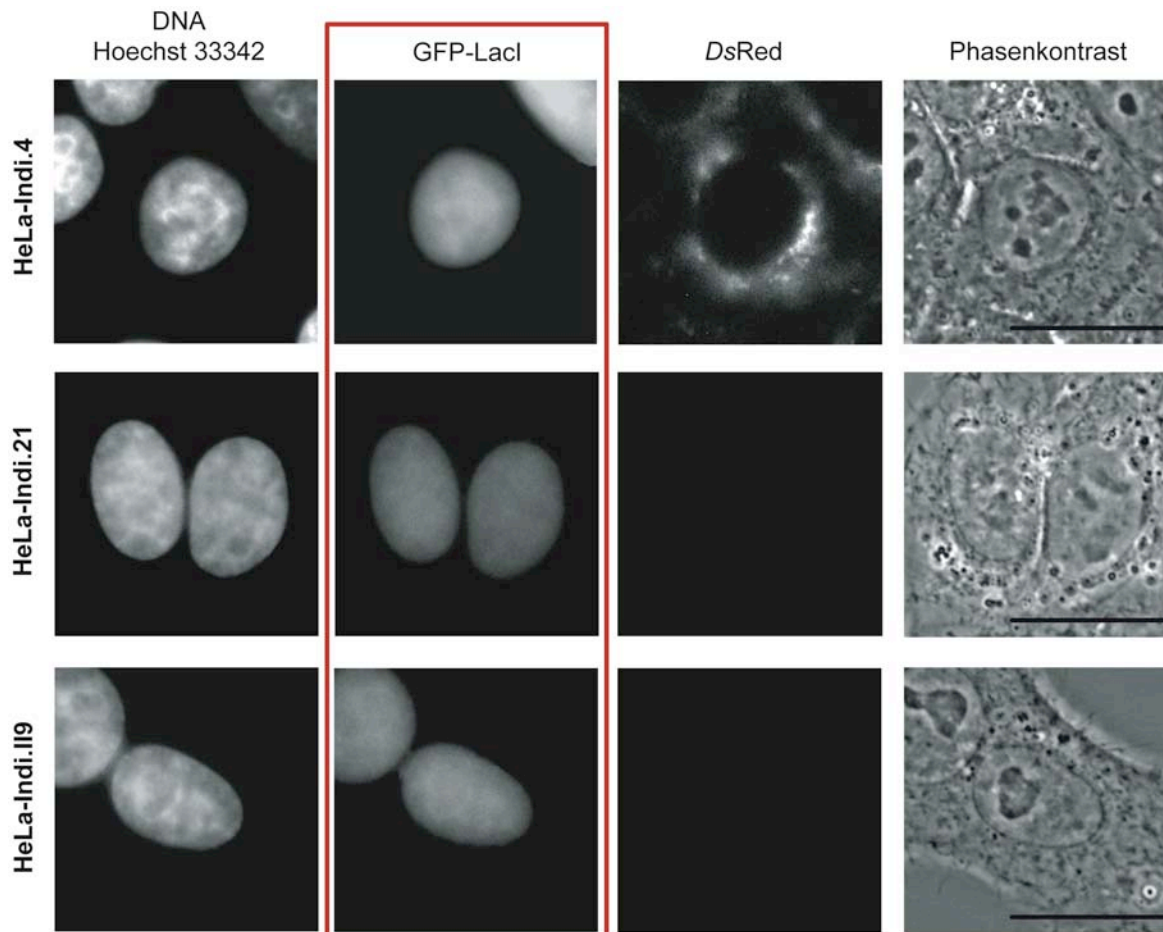
Die Zellen wurden 24 Std. nach Transfektion des Plasmids am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Von links nach rechts sind die Kanäle für YFP, *DsRed* und Phasenkontrast gezeigt. Rot umrandet hervorgehoben ist der YFP-Kanal des „Gene Tags“, in dem das Transgen als Punkt zu erkennen ist. Scale Bar: 20 µm.

### 3.4.2 In den Zelllinien ist kein Indikatorgen durch den „Gene Tag“ zu erkennen

Da die generelle Visualisierung des Indikatorgens durch Bindung des fluoreszierenden „Gene Tags“ möglich ist, wurden die Zelllinien dahingehend untersucht, ob dieses auch als einzelne Kopie eindeutig erkennbar und über eine längere Zeitspanne beobachtbar ist. Durch stabile Visualisierung des Transgens auf DNA Ebene soll in den Zelllinien die transkriptionsbedingten Bewegungen des Transgens beobachtet werden.

Die Zellen wurden in Schälchen mit Glasboden ausgesät und mit dem Expressionsplasmid für den „Gene Tag“ transfiziert. Glasbodenschälchen zeigen in Kombination mit Öbjectiven das beste Auflösungsvermögen. 48 Std. nach Transfektion wurden die Zellen im Mikroskop untersucht und nach einheitlichem punktförmigen Signal des „Gene Tags“, der das Indikatorgen gebunden haben sollte, gesucht. Sowohl im Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop, als auch im Fluoreszenzmikroskop mit 100-facher Vergrößerung des Objektivs konnte kein punktförmiges Signal eindeutig als Transgen identifiziert werden. Auch bei Zellen mit schwachem „Gene Tag“-Signal und somit geringer Hintergrundfluoreszenz war kein Signal des visualisierten Transgens zu finden (Abb. 28). In anderen Lebzell-Systemen

konnte durch Aktivierung des Transgens eine deutliche Chromatinöffnung des Locus und somit eine Vergrößerung des Signals gezeigt werden (Tumbar, Sudlow et al. 1999; Tsukamoto, Hashiguchi et al. 2000). Aus diesem Grund wurden die gleichen Versuchsansätze mit zusätzlicher Transfektion eines Tat-Expressionsplasmids wiederholt, um die transkriptionelle Aktivierung des Indikatorgens zu induzieren. Aber auch nach Induktion war kein eindeutiges Signal detektierbar (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 28**

**Fluoreszenzaufnahmen der stabilen Zelllinien transfiziert mit dem „Gene Tag“ GFPsg143-LacI zur Visualisierung des stabil integrierten Indikatorgens auf DNA-Ebene.** Die Zellen wurden 48 Std. nach Transfektion des Expressionsplasmids für den „Gene Tag“ am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Von links nach rechts sind die Kanäle für Hoechst 33342, GFP, DsRed und Phasenkontrast gezeigt. Von oben nach unten die Zelllinien HeLa-Indi.4, HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.II9. Rot umrandet ist der GFP-Kanal des „Gene Tags“ hervorgehoben, in dem kein Transgen zu erkennen ist. Scale Bar: 20  $\mu$ m.

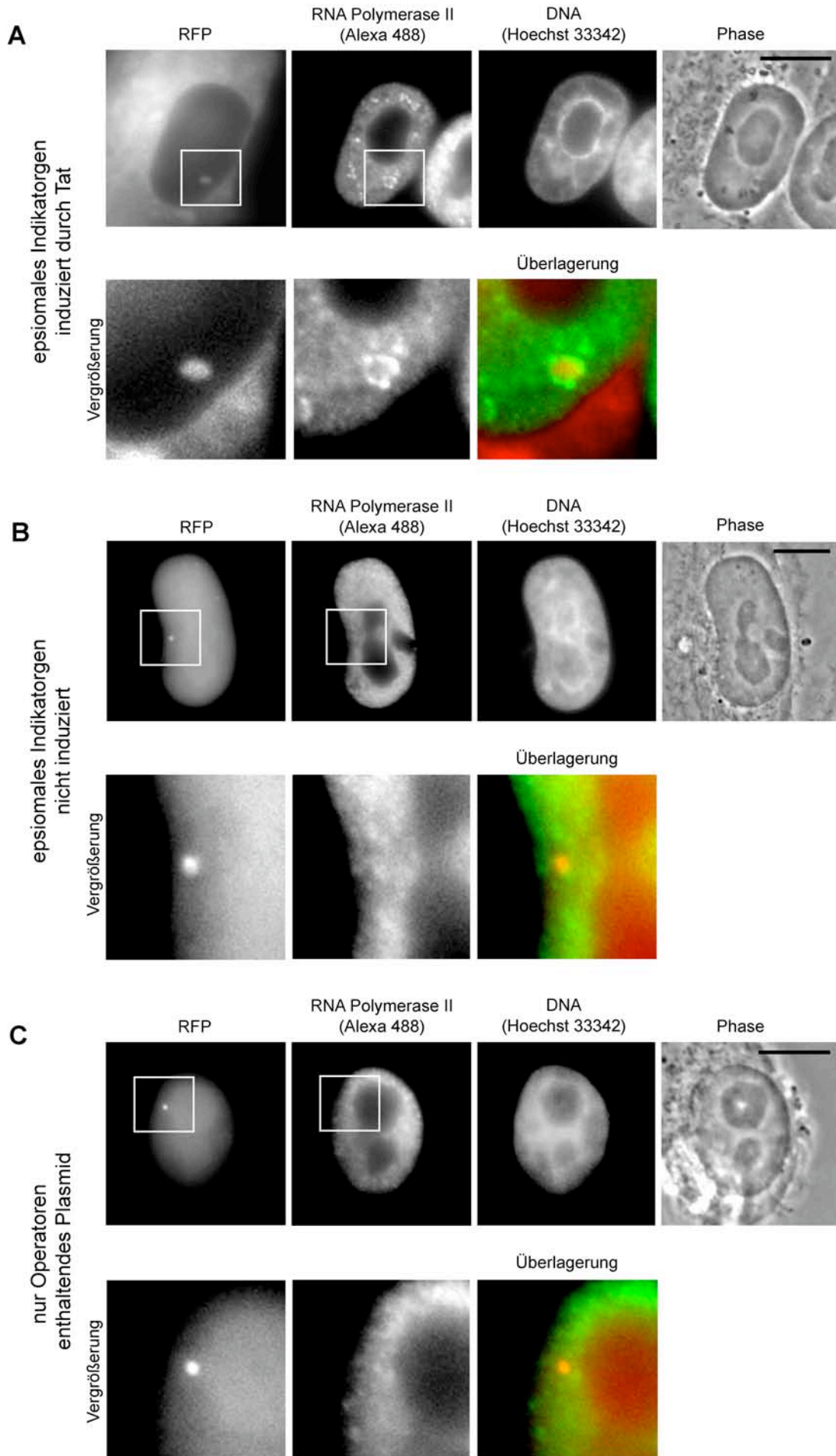
### 3.5 Das episomale Indikatorgen colokalisiert mit der RNA Polymerase II

In Kapitel 3.3.4 konnte gezeigt werden, dass sich das episomale Indikatorgen in Zellen durch Bindung des „Gene Tags“ visualisieren lässt. Anhand der Größe des Signals lässt sich vermuten, dass es sich hierbei um eine Ansammlung vieler Plasmide handelt, die sich zu einem Cluster zusammenschließen. Um zu zeigen, dass ausgehend von diesen Clustern das Indikatorgen transkribiert und exprimiert wird, wird die Colokalisation des episomalen Indikatorgens mit der RNA Polymerase II untersucht.

Hierzu wurden HeLa bzw. HeLa-Tat Zellen ausgesät und mit dem Indikatorgen und dem „Gene Tag“ mRFP-LacI transfiziert. 48 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die RNA Polymerase II durch eine Immunfärbung markiert. Hier diente das Operatoren-enthaltende Plasmid pPS-8.8 als Kontrolle. Die RNA Polymerase II ist im Nukleoplasma verteilt und zeigt Spots mit vermehrter Ansammlung des Proteins. Die Nukleoli sind ausgespart. Von zehn willkürlich ausgewählten Zellen zeigten acht eine Colokalisation des episomalen Indikatorgens mit der RNA Polymerase II, wenn Tat in den Zellen zugegen war (Abb. 29A). Bei zwei der Zellen war keine deutliche Akkumulation der RNA Polymerase II zu sehen. Ohne Expression von Tat konnte keine deutliche Colokalisation beobachtet werden (Abb. 29B), nur eine Zelle von zehn zeigte eine schwache Ansammlung der RNA Polymerase II um das Indikatorgen. Auch in der Negativ-Kontrolle mit pPS-8.8 zeigte keine der zehn Zellen eine deutliche Ansammlung der Polymerase II am Plasmid (Abb. 29C). Bei der Immunfärbung kann eine Akkumulation der RNA Polymerase II um das Signal des Indikatorgens herum beobachtet werden sobald Tat in der Zelle und somit die Transkription induziert ist. In nicht induzierten Zellen bzw. der Negativ-Kontrolle scheint eine Polymerase-Ansammlung an der Stelle des Plasmids eher zufällig, dem gesamten Polymerase II-Muster des Kerns entsprechend, aber ohne Spezifität für das Indikatorgen.

#### Abbildung 29 (nächste Seite)

**Die RNA Polymerase II colokalisiert mit dem episomalen Indikatorgen.** Fluoreszenzaufnahmen repräsentativer Zellen nach Transfektion und Immunfärbung. Jeweils obere Reihe: RFP zeigt die Reporterexpression von pIndi als Fluoreszenz im Zytoplasma und das Indikatorgen selbst durch Bindung des „Gene Tags“ mRFP-LacI auf DNA-Ebene als punktförmiges Signal im Kern; Alexa 488 zeigt die Immunfärbung der RNA Polymerase II; DNA-Gegenfärbung mit Hoechst 33342; Phasenkontrast. Scale Bar: 10 µm. Jeweils untere Reihe: Ausschnitt des RFP- und Alexa 488-Kanals vergrößert und entsprechende Überlagerung der zwei Kanäle. **A)** HeLa-Tat Zellen transfiziert mit pIndi und dem „Gene Tag“. **B)** HeLa Zellen transfiziert mit pIndi und dem „Gene Tag“. **C)** HeLa-Tat Zellen transfiziert mit pPS-8.8 und dem „Gene Tag“.



## 3.6 Tat fördert die Elongation und das Spleißen der RNA vom episomalen und integrierten Indikatoren

### 3.6.1 Analyse der Transkriptionsaktivierung auf RNA-Ebene

Über die HIV-LTR ist bekannt, dass sie auch ohne Tat eine gewisse Basisaktivität besitzt, die vom zellulären Hintergrund und der Chromatiumgebung des Integrationsortes abhängt. Ohne Tat wird die Polymerase II von den Transkriptionsfaktoren, die die LTR binden, rekrutiert und fängt am Transkriptionsstart an ineffizient Transkripte zu bilden. Wobei sie meist nach ca. 60 bp im Bereich der TAR abfällt. Erst durch Tat und die rekrutierten Faktoren wird die Polymerase II an der C-Terminalen Domäne phosphoryliert, wodurch sie effizient Transkripte von voller Länge schreibt. Da in den beiden Zelllinien HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.119 ohne Zugabe von Tat weder durch Mikroskopie noch durch FACS-Analyse die Expression des Reporterproteins *DsRed* detektiert werden kann, sollte dies auf RNA-Ebene überprüft und quantifiziert werden. Auch in der Zelllinie HeLa-Indi.4, die eine hohe Basisaktivität besitzt und sich durch Tat die Expression des Indikatorgens kaum mehr steigern lässt, sollte dieses Verhalten auf RNA-Ebene untersucht werden.

Darüber hinaus gibt es immer mehr Hinweise dafür, dass auch die noch nicht integrierte Form der HIV-DNA, die 1-LTR- und 2-LTR-Circles, transkribiert werden (Engelman, Englund et al. 1995; Wiskerchen and Muesing 1995; Gillim-Ross, Cara et al. 2005). In unserem episomalen Indikatormodell werden auch die transienten Vektoren nach Zugabe von Tat transkribiert und Reporterprotein synthetisiert. Auch dies sollte auf RNA-Ebene quantifiziert werden.

#### **Die HIV-LTR zeigt eine deutliche Basisaktivität auf RNA-Ebene sowohl im episomalen wie integrierten Zustand**

Eine Möglichkeit um die Mengen von einem DNA- oder RNA-Ausgangsmaterial quantitativ zu bestimmen, ist die Real-Time-PCR. Bei dieser Methode wird der Amplifikationsverlauf eines Templates über die Zeit verfolgt, indem die Fluoreszenz gemessen wird, die von dem Farbstoff SYBR Green abgegeben wird, nachdem er sich an die kleine Furche doppelsträngiger DNA angelagert hat. Anschließend wird der CT-Wert errechnet und es kann auf die Menge des Ausgangsmaterials zurück geschlossen werden.

Die CT-Werte geben den Zyklus an, in dem in allen Proben die gleiche festgesetzte Anzahl an Amplifikaten enthalten ist. Je niedriger der CT-Wert desto mehr Ausgangsmaterial war in der Probe vorhanden und umso früher wurde der Schwellenwert an Amplifikat erreicht. Der

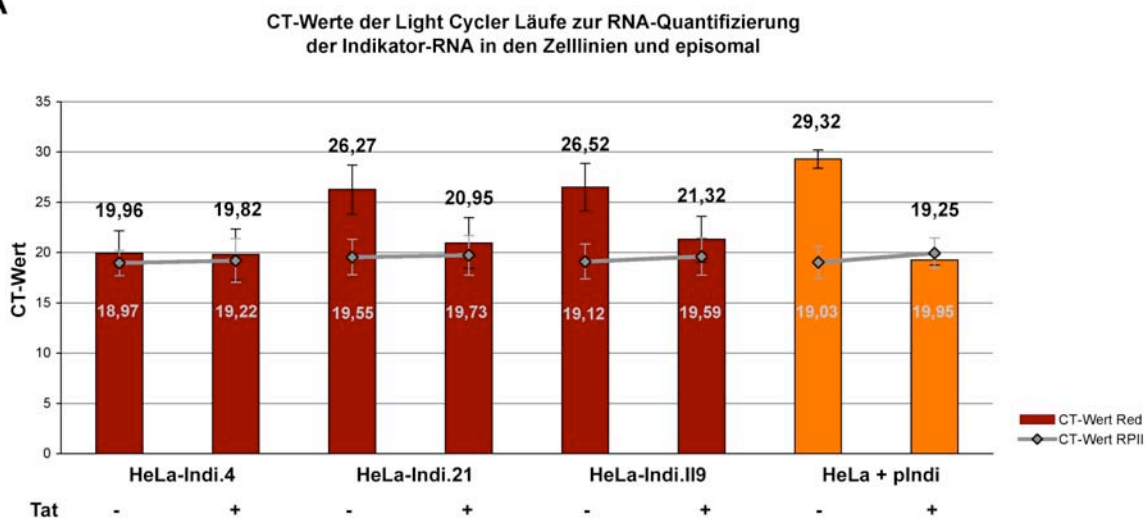
CT-Wert der RNA Polymerase II (RPII) sollte zum Standardisieren möglichst in beiden zu vergleichenden Proben ähnlich sein (maximale Abweichung von 1,0 Zyklen).

Es wurde unabhängig jeweils zwei Mal die Komplet-RNA aus  $5 \times 10^6$  Zellen, die zuvor mock- bzw. mit einem Tat-Expressionsplasmid transfiziert wurden, isoliert. Diese wurde jeweils in zwei reversen Transkriptionen (RT) in cDNA umgeschrieben und je zwei Light Cycler Läufe pro RT für die Zelllinien quantifiziert und je ein Light Cycler Lauf pro RT für pIndi. Als zellulärer Standard wurde das House-Keeping-Gen RNA Polymerase II herangezogen. Die CT- und  $\Delta\Delta$ CT-Werte sind in folgender Abbildung 30 dargestellt.

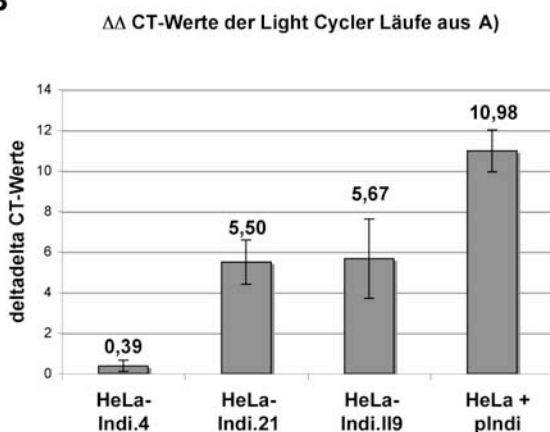
Die CT-Werte von RPII sind alle sehr ähnlich, was auf eine ungefähr gleiche Menge an cDNA-Ausgangsmaterial in allen Proben zurück schließen lässt. Die CT-Werte für das Indikatorgen („inRed“) von HeLa-Indi.4 verändern sich kaum. Nach Expression von Tat erhöht sich die Anzahl an DsRed-Transkripten sehr wenig, was mit den Mikroskopie- und FACS-Daten konform ist. Bei den Zelllinien HeLa-Indi.21 und -Indi.II9 sowie auch dem episomalen Indikatorgen ist eine Induktion zu sehen. Eine Zyklusdifferenz von 3 entspricht für die Primer „RPII“ und „in Red“ etwa einer 10-fachen Menge an Ausgangsmaterial, eine Zyklusdifferenz von 6 etwa die 100-fache Menge (vgl. Primertest 2.2.6). Die CT-Werte zeigen aber auch, dass ohne die Expression von Tat schon Reporter-RNA vorhanden ist, zwar deutlich weniger als die vom House-Keeping-Gen RNA Polymerase II (die CT-Werte liegen oberhalb der RPII-Linie), aber dennoch nachweisbar. Bei diesem Experimenten-Aufbau, d.h. bei der hier eingesetzten cDNA-Menge, liegt der CT-Wert für ein stark exprimiertes Gen, wie das House-Keeping-Gen RNA Polymerase II, im Schnitt bei 19 (+/-2) Zyklen. Das Astrozyten-spezifisch exprimierte hGFAP-Gen, das in HeLa-Zellen nicht exprimiert wird, zeigt einen CT-Wert von 34, der aber nur durch Primer-Dimere entstanden ist und kein spezifisches Produkt darstellt, wie in einem Kontrollgel eindeutig zu erkennen war (Daten nicht gezeigt). D.h. erst ab Zyklus >34 kann man für diesen Aufbau sagen, dass keine RNA im Ausgangsmaterial vorhanden war.

Zusammenfassend heißt das, dass in den Zelllinien HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.II9 und dem transient transfizierten episomalen pIndi auch ohne Expression von Tat Reporter-Gen-RNA vorhanden ist, aber keine detektierbare Menge an Protein synthetisiert wird.

A



B



### Abbildung 30

**Light Cycler Quantifizierung der Reporter-Gen-RNA in den Zelllinien und dem nicht integrierten Indikator-Gen vor und nach Transkriptionsaktivierung durch Tat.** A) Die X-Achse bezeichnet die Zelllinien bzw. plndi vor und nach Tat-Aktivierung, die Y-Achse den CT-Wert. Die roten Balken kennzeichnen die Reporter-cDNA quantifiziert durch das Primerpaar „inRed“ der Zelllinien, orange die der episomal Indikator-Gen cDNA, die grauen Punkte die quantifizierte cDNA der RNA Polymerase II als Standard. Die möglichst horizontalen Verbindungslinien zwischen den RPII-Werten der zu vergleichenden Proben zeigen die selbe Menge an Ausgangsmaterial an. Für die Zelllinien ist der Mittelwert aus acht Light Cycler Läufe gezeigt, für plndi aus vier. B)  $\Delta\Delta$  CT-Werte der CT-Werte aus A). Je größer der Wert, desto größer die Induzierbarkeit.

### 3.6.2 Tat fördert indirekt das Spleißen der mRNA

#### **Die Transkripte des Indikatorgens werden von endogenen Spleißfaktoren modifiziert**

Das Indikatorkonstrukt plndi ist durch sein Intron so konzipiert, dass es mit endogenen Spleißfaktoren interagieren soll. Dadurch wird in Säugetierzellen die Expression gesteigert und sichergestellt, dass bei einem Lokalisationsvergleich in Bezug auf Spleißfaktoren enthaltende Speckles eine Interaktion mit Spleißosomen überhaupt stattfindet. Daher war es wichtig auf RNA-Ebene zu zeigen, dass die naszierende RNA gespleißt wird.

Es wurde parallel die RNA von nicht induzierten und Tat-induzierten Zellen der Zelllinien HeLa-Indi.4, -Indi.21 und -Indi.119 isoliert und in cDNA revers transkribiert. Die Induktion erfolgte durch Transfektion eines Tat-Expressionsplasmids, die RNA wurde 48 Std. nach Transfektion isoliert. Darüber hinaus wurden HeLa-Zellen mit dem Indikatorkonstrukt plndi oder mit dem Indikatorkonstrukt und dem Tat-Expressionsplasmid transfiziert, um auch für den episomalen Zustand von plndi eine Aussage treffen zu können.

Das Indikatorkonstrukt plndi besitzt nach dem Offenen Leserahmen für das Reportergen *DsRed* drei alternative Spleißdonore und zwei Akzeptoren. In der folgenden Graphik sind diese schematisch dargestellt und die zu erwartenden Transkripte gezeigt: ungespleißte RNA und vier mögliche Varianten, die durch Benutzung der unterschiedlichen Spleißdonore und -Akzeptoren theoretisch entstehen können. Durch PCR mit Primern, die im *DsRed*-Gen und nach der Intronsequenz liegen, sollten die Spleißvarianten anhand ihrer Größe unterscheidbar sein. Die zu erwartenden Größen sind in der Graphik gezeigt (Abb. 31A).

Die isolierte RNA wurde mit random hexamer Primern revers transkribiert und in einer PCR amplifiziert. Die entstandenen PCR-Produkte sind im folgenden Gel gezeigt (Abb. 31B). Parallel zu den genannten Primern wurde ein Ansatz mit Primern für RPII gemacht, um zu sehen, ob in allen Ansätzen ungefähr gleich viel cDNA eingesetzt wurde.

Bei der RNA aller induzierter Zellen sieht man ungespleißte RNA und vier Spleißvarianten. Die ungespleißte RNA und die zwei Spleißvarianten 2 und 4 konnten eindeutig durch Extrahierung aus dem PCR-Gel und Sequenzierung zugeordnet werden. In den nicht induzierten Zelllinien sieht man auch ein PCR-Produkt, was bereits in einer quantitativen PCR gezeigt wurde, obwohl man in den FACS-Analysen und Mikroskopie-Daten der Zelllinien HeLa-Indi.21 und .119 kein Protein (*DsRed*) detektieren konnte. Interessanterweise erhält man im nicht induzierten Zustand bei diesen beiden Zelllinien zum größten Teil die ungespleißte Variante und eine geringe Menge an den Spleißvarianten 2 und 4.



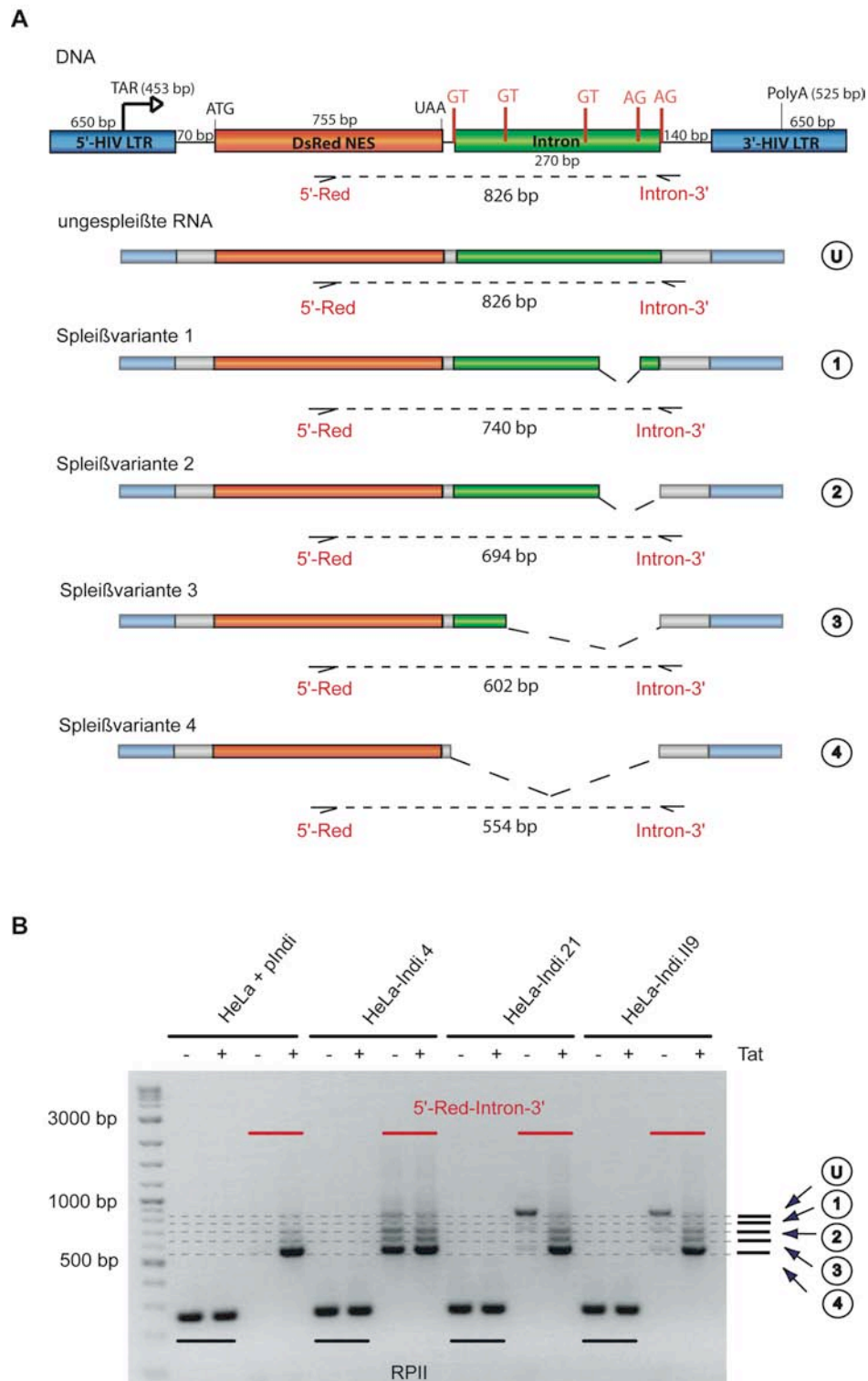


Abbildung 31

**Verschieden gespleißte Transkripte des Indikators vor und nach Tat-Aktivierung.** **A)** Schematische Darstellung der möglichen Transkripte, die durch Spleißen der Indikator-RNA entstehen können und deren Längenangabe. Die Pfeile und gestrichelte Linie geben die verwendeten Primer und das entstehende Produkt bei der PCR an. **B)** PCR mit in A) bezeichneten Primer auf cDNA des episomalen Indikators und der Zelllinien. Rote Balken geben die Spuren an, in denen 5'-Red und Intron-3' als Primer verwendet wurden, die schwarzen, in denen RPIIas und RPIIs als Primer zur Kontrolle verwendet wurden. Die Zahlen zeigen die ungespleißte RNA (U) und die Spleißvarianten (1)-(4) aus A) an.

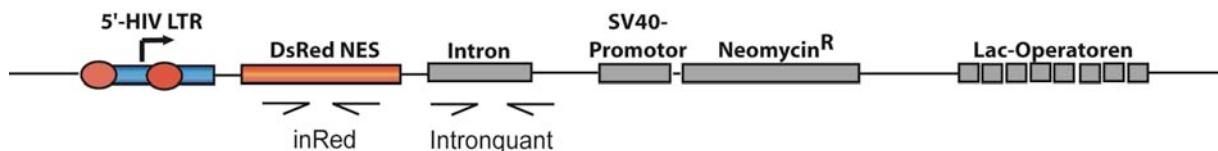
Im Gegensatz dazu stehen die induzierten Zellen, in denen die kürzeste Spleißvariante überwiegt. Die HeLa-Indi.4 Zelllinie unterscheidet sich in sofern von den anderen Zelllinien, dass auch im nicht-induzierten Zustand bereits Reporterprotein zu detektieren ist. Auch auf RNA-Ebene erhält man hier verschiedene Spleißvarianten, wobei auch ohne Expression von Tat bereits das vollständig gespleißte Transkript überwiegt. In Zellen mit episomalem plndi kann fast keine cDNA in nicht induzierten Zellen nachgewiesen werden, in den induzierten erhält man das gleiche Spleißmuster wie in den Zelllinien.

Zusammenfassend decken sich diese Ergebnisse mit den Daten der quantitativen PCR, bei der sowohl in den nicht-induzierten als auch den induzierten Zellen Reporter-RNA detektiert werden konnte. Jedoch unterscheiden sich die Spleißvarianten der Transkripte abhängig vom Transkriptionsstatus.

### Mit Tat verschiebt sich das Verhältnis der gespleißten mRNA

Da man bei einer qualitativen PCR oft Mengenverschiebungen an Amplifikat sehen kann, die tatsächliche Menge aber schwer abzuschätzen und einzuordnen ist, wurde eine quantitative PCR zur tatsächlichen Bestimmung des cDNA-Ausgangsmaterials gemacht. Das Verhältnis von ungespleißter zu gespleißter RNA wurde durch die Berechnung der vergleichenden Expressionslevel ( $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ) bestimmt, um die obigen Erkenntnisse zu überprüfen.

Zur Quantifizierung der verschiedenen prozessierten RNAs wurden Primer gewählt (vgl. Abb. 32), die nur ein Produkt ergeben, wenn die RNA völlig ungespleißt ist (Intronquant). Als Referenz wurde ein Primerpaar gewählt, das sämtliche Reporter-RNA amplifiziert (inRed). RPII wurde als Standard verwendet. Die CT-Werte der Light Cycler Läufe und die daraus berechneten vergleichenden Expressionslevel sind in Abbildung 33 dargestellt.

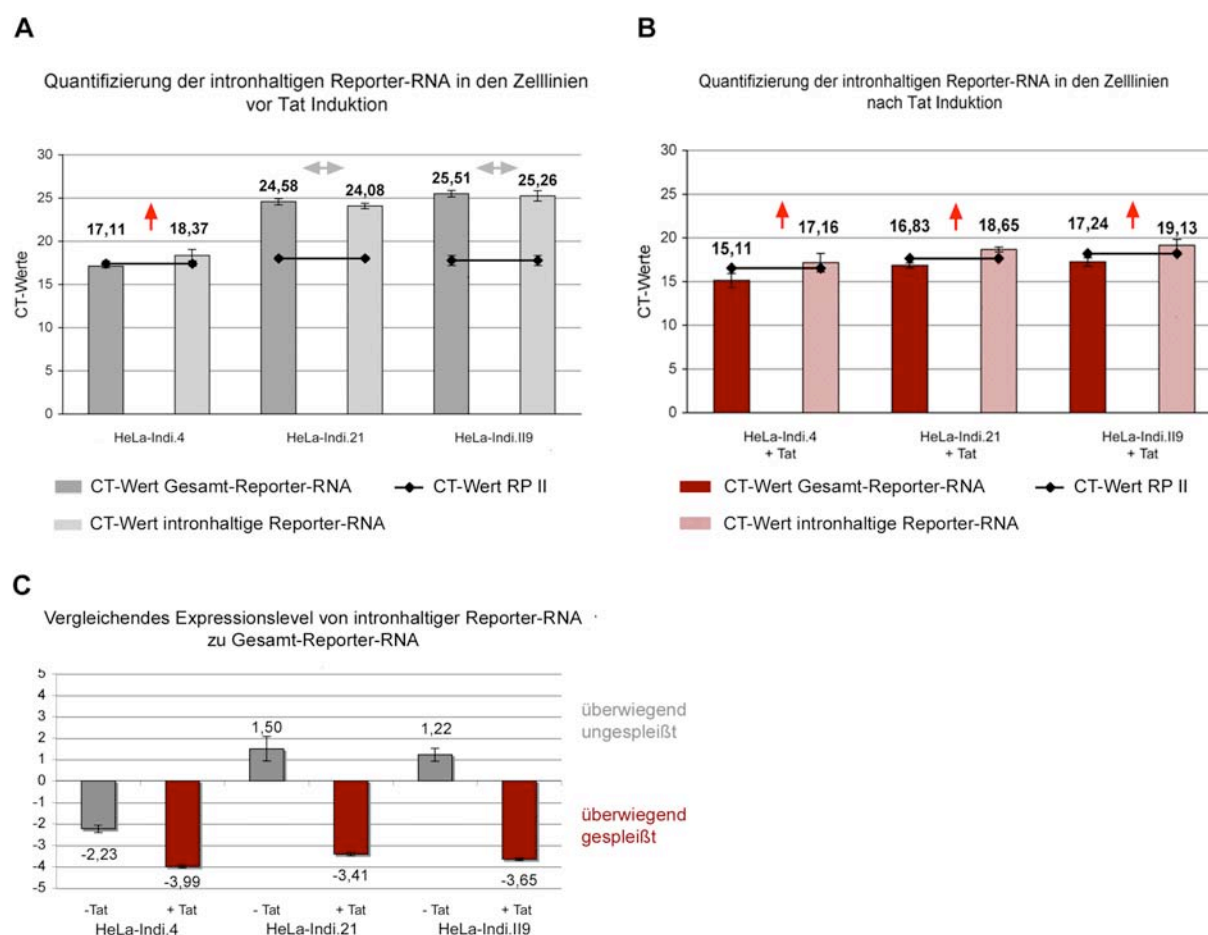


**Abbildung 32**

Lage der im Light Cycler zur Quantifizierung verwendeten Primer, schematisch dargestellt.

In der Zelllinie HeLa-Indi.4 ist der CT-Wert sowohl ohne als auch nach Tat-Expression für die intronhaltige RNA größer als für die gesamte Reporter-RNA, d.h. sowohl ohne Tat als auch mit Tat liegt gespleißte mRNA vor. In den Zelllinien HeLa-Indi.21 und -Indi.119 ist ohne Expression von Tat sämtliche RNA ungespleißt, die Unterschiede der CT-Werte sind <1

Zyklus. Erst nach Expression von Tat steigt die gespleißte Transkriptmenge an (Abb. 33A und B). Nach Berechnung der vergleichenden Expressionslevel für intronhaltige Reporter-RNA zu Gesamt-Reporter-RNA ergibt sich, dass in der Zelllinie HeLa-Indi.4 ohne Tat ungefähr die Hälfte der RNA gespleißt ist, nach Expression von Tat enthält nur noch ein Viertel der RNA ein Intron. Bei den Zelllinien HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.II9 ist nach Expression von Tat nur noch ein Drittel bis ein Viertel intronhaltig (Abb. 33C).



**Abbildung 33**

**Quantifizierung intronhaltiger RNA des Indikators vor und nach Tat-Aktivierung.** Es wurden vier Light Cycler Läufe aus zwei reversen Transkriptionen einer RNA in die Auswertung einbezogen. **A) und B)** Balken zeigen die CT-Werte der Reporter-RNA, amplifiziert durch zwei verschiedene Primer-Paare. Die verbundenen Punkte stellen die CT-Werte der Kontrolle mit RPII-Primern dar. **A)** Quantifizierung vor Tat-Aktivierung. **B)** Quantifizierung nach Tat-Aktivierung. **C)** Vergleichendes Expressionslevel. Graue Balken stellen die Expressionslevel vor Tat-Aktivierung, rote nach Tat-Aktivierung dar. Negative Werte zeigen einen geringen Anteil an intronhaltiger RNA an, positive einen großen. Werte zwischen 0 und 2 werden als gleiche Mengen zu vergleichender RNA gewertet.

Daraus kann man schließen, dass durch Tat die Transkription und auch das Spleißen positiv beeinflusst wird, zumal auch bei der Zelllinie HeLa-Indi.4 nach Tat-Expression die intronhaltige RNA noch weiter abnimmt, obwohl die Menge an Transkripten sich durch Tat nur gering steigert.

### **Die transkriptions-defiziente Mutante Tat(K41A) kann das Spleißen nicht induzieren**

Um einen Hinweis zu bekommen, ob das Protein Tat selbst für die Rekrutierung der Spleißfaktoren verantwortlich ist, wurde eine transkriptions-defiziente Mutante von Tat kloniert. Durch Austausch des Lysins an Position 41 gegen ein Alanin verliert Tat(K41A) die Fähigkeit, die Transkriptionselongation zu induzieren.

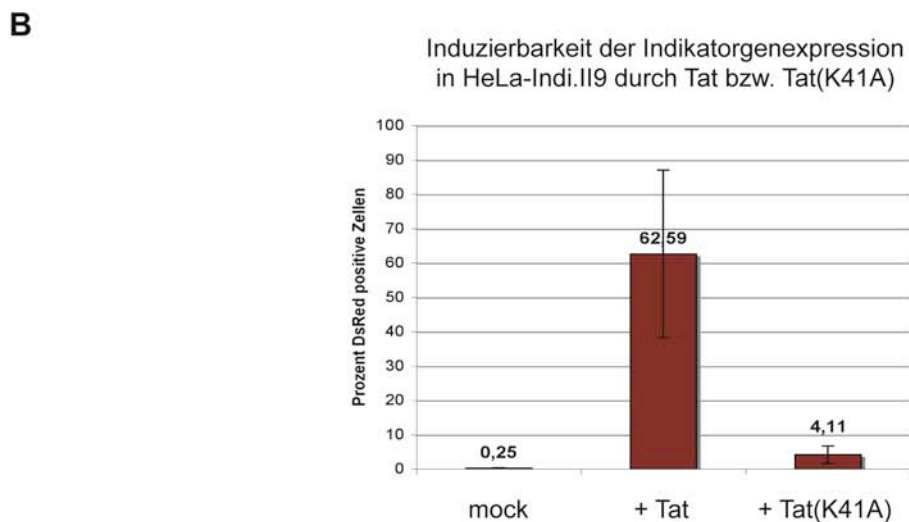
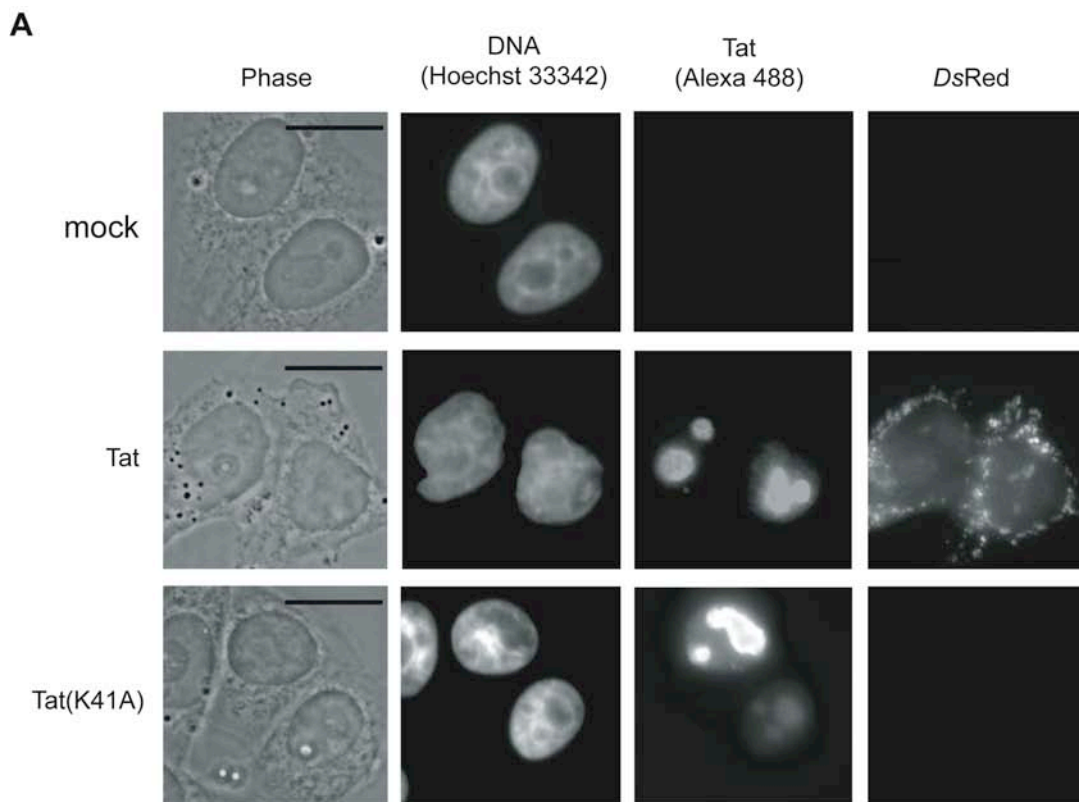
Um heraus zu finden, ob diese Mutante dennoch das beobachtete Spleißen induzieren kann, wurden HeLa-Indi.II9-Zellen mit pCTat bzw. pCTat(K41A) transfiziert und 48 Std. später die RNA isoliert und revers in cDNA transkribiert. Von jedem Ansatz wurde ein Aliquot von Zellen für eine FACS-Analyse genommen. Darüber hinaus wurde die Expression von Tat bzw. Tat(K41A) durch eine Immunfärbung nachgewiesen.

Die Immunofluoreszenz zeigt, dass sowohl Tat als auch Tat(K41A) in den Zellen exprimiert wurde und wie erwartet in den Nukleoli lokalisiert (Abb. 34A). Durch die FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die mock-transfizierten Zellen keine *DsRed*-Reporterexpression zeigen, nach Transfektion von pCTat 62% der Zellen Reporter-positiv waren und durch pCTat(K41A) nur in 4% der Zellen eine Induktion der Reporterexpression erfolgte (Abb. 34B). Tat(K41A) hat also seine Fähigkeit zur Expressionsinduktion fast vollständig verloren.

Wiederum wurde durch eine PCR auf die gewonnene cDNA mit den Primern 5'-Red und Intron-3' (und RPIIas und RPIIs als Kontrolle bzw. Referenz) die verschiedenen Spleißvarianten amplifiziert und der Länge nach aufgetrennt. In Abb. 35C sieht man, dass die mock-transfizierten und pCTat(K41A) transfizierten Zellen das gleiche Muster an Spleißen zeigen, d.h. man kann verschiedene Spleißvarianten erkennen, jedoch keine deutliche Verschiebung hin zu vollständig gespleißten Transkripten wie man es eindeutig bei Zellen sieht, die mit pCTat transfiziert wurden.

Um diese Aussage auch quantitativ zu stützen, wurde durch Real-Time-PCR die Menge an Transkripten generell und die Menge an intronhaltigen Transkripten bestimmt (vgl. Abb. 32). Die CT-Werte sind in Abb. 35A und die daraus berechneten vergleichenden Expressionslevel in Abb. 35B gezeigt. Auch hier bestätigt sich die Beobachtung, dass

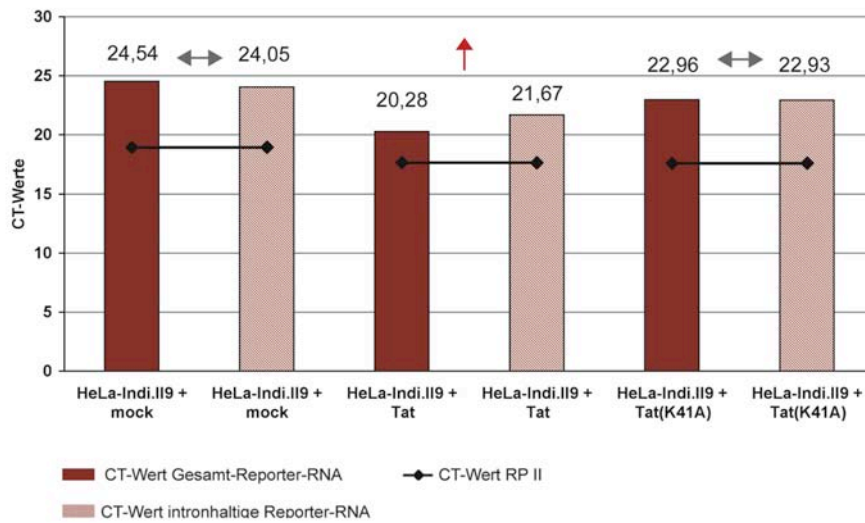
Tat(K41A) die Verschiebung hin zu vollständig gespleißten Transkripten nicht induzieren kann.



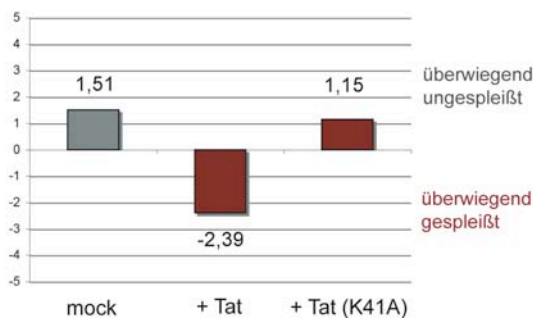
### Abbildung 34

**Tat(K41A) induziert in HeLa-Indi.II9 nur in 4% der Zellen die Transkription. A)** Immunfluoreszenz zum Nachweis der Expression von Tat und Tat(K41A) in den transfizierten Zellen HeLa-Indi.II9. Sowohl Tat als auch Tat(K41A) lokalisieren in den Nukleoli. Scale Bar: 20  $\mu$ m. **B)** FACS-Analyse, 48 Std. nach der Transfektion von HeLa-Indi.II9. Gezeigt ist die Anzahl an Reporter-positiven Zellen in Prozent.

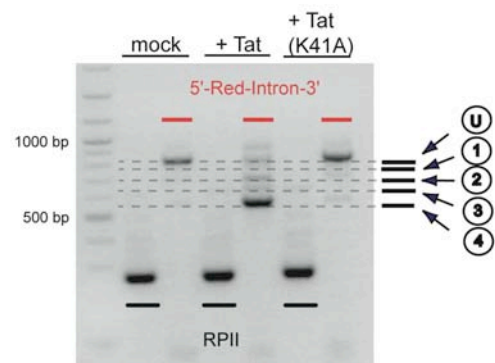
**A** Quantifizierung intronhaltiger Indikatorgen-RNA in HeLa-Indi.II9 nach Induktion mit Tat bzw. Tat(K41A)



**B** Vergleichende Expressionslevel von intronhaltiger zu Gesamt-Indikatorgen-RNA in HeLa-Indi.II9



**C** Spleißvarianten der Indikatorgen-RNA in HeLa-Indi.II9 nach Induktion durch Tat bzw. Tat(K41A)



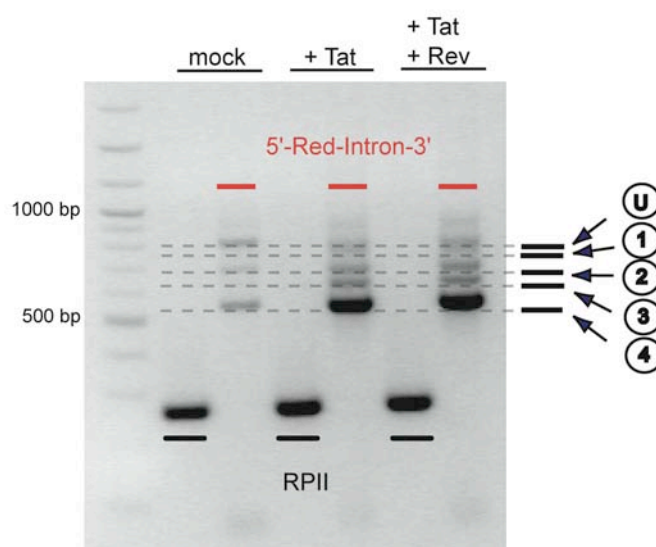
**Abbildung 35**

**Tat(K41A) induziert in HeLa-Indi.II9 kein Spleißen.** **A)** Balken zeigen die CT-Werte der Reporter-RNA, amplifiziert durch zwei verschiedene Primer-Paare. Die verbundenen Punkte stellen die CT-Werte der Kontrolle mit RP II-Primern dar (Mittelwert aus zwei Light Cycler Läufen). **B)** Vergleichende Expressionslevel. Graue Balken stellen die Expressionslevel vor Tat-Aktivierung, rote nach Tat-Aktivierung dar. Negative Werte zeigen einen geringen Anteil an intronhaltiger RNA an, positive einen großen. Werte zwischen 0 und 2 werden als gleiche Mengen zu vergleichender RNA gewertet. **C)** Spleißvarianten der Reporter-Transkripte. Ohne Tat und mit Tat(K41A) gibt es überwiegend ungespleißte Transkripte. Mit Tat erhält man überwiegend vollständig gespleißte Transkripte (vgl. Abb. 31).

### Das virale Rev-Protein hat keinen Einfluss auf das Spleißen der Reporter-RNA

Das virale Protein Rev des HI-Virus gehört ebenso wie Tat zu den regulatorischen Proteinen. Es bindet an das „Rev Response Element“ (RRE) der viralen RNA und gewährleistet so den Transport der viralen RNA aus dem Kern, bevor diese vollständig gespleißt werden kann. Nur so kann das Virus die Strukturproteine exprimieren und das virale Genom zur Verpackung ins Zytoplasma transportieren. Möglicherweise trägt Rev daher auch zum Zusammenhang zwischen Transkription, Spleißen und Export ungespleißter RNA bei. Aus diesem Grund wurde weiterhin untersucht, ob durch Co-Expression von Rev das Spleißmuster verändert wird. HeLa-Indi.II9 Zellen wurden ausgesät und 48 Std. nach Transfektion von Expressionsplasmiden für Tat bzw. Tat und Rev-GFP die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch eine anschließende PCR wurden die Spleißvarianten der Transkripte in einem Gel der Größe nach aufgetrennt (Abb. 36). Die Expression von Rev wurde im Mikroskop durch den GFP-Tag kontrolliert (nicht gezeigt). Die PCR mit RPII-Primer zeigt den Einsatz gleicher Mengen an cDNA, sowie keine Kontamination mit genomischer DNA an.

Spleißvarianten der Indikatorgen-RNA in HeLa-Indi.II9 nach Induktion durch Tat bzw. Tat und Rev



**Abbildung 36**

**Spleißvarianten der Reporter-Transkripte nach Tat-Induktion und Co-Expression von Rev.** Sowohl mit Tat alleine als nach Co-Expression mit Rev erhält man überwiegend vollständig gespleißte Transkripte im Vergleich zu nicht induzierten Zellen (vgl. Abb. 31).

Das erhaltene Spleißmuster zeigt, dass durch die Co-Expression von Rev keine Veränderung des Spleißmusters zu erkennen ist. Es gibt keine Verschiebung hin zu mehr ungespleißten Transkripten.

### **3.7 Bilden nicht replizierende Episomen Chromatin?**

Das virale Genom von SV40 (Simian Virus 40) oder EBV (Epstein-Barr Virus) liegt nach der Infektion der Zelle als zirkuläre episomale DNA im Zellkern der Wirtszelle vor, die sich selbst bzw. im Zuge der Wirtszell-Replikation replizieren kann. Beide genannten Virusgenome sind mit Nucleosomen assoziiert, für SV40 konnten sogar Histonmodifikationen in verschiedenen Stadien der Infektion bestimmt werden (Balakrishnan and Milavetz 2005). Nach wie vor ist jedoch die Frage noch nicht geklärt, ob episomale, nicht replizierende DNA, wie z.B. die nicht integrierte HIV-DNA, in menschlichen Zellen Histone bindet und somit Chromatin bilden kann. Da das hier entwickelte GePS die HIV-LTR als induzierbaren Promotor verwendet, über die bekannt ist, dass sie an definierten Stellen unabhängig vom Integrationsort Nucleosomen bindet, soll dies in diesem Zellsystem untersucht werden. In verschiedenen methodischen Ansätzen können durch direkten Vergleich der integrierten und nicht integrierten LTR Hinweise dafür gesammelt werden, die möglicherweise mehr Aufschluss über die Chromatinzusammensetzung von Episomen geben.

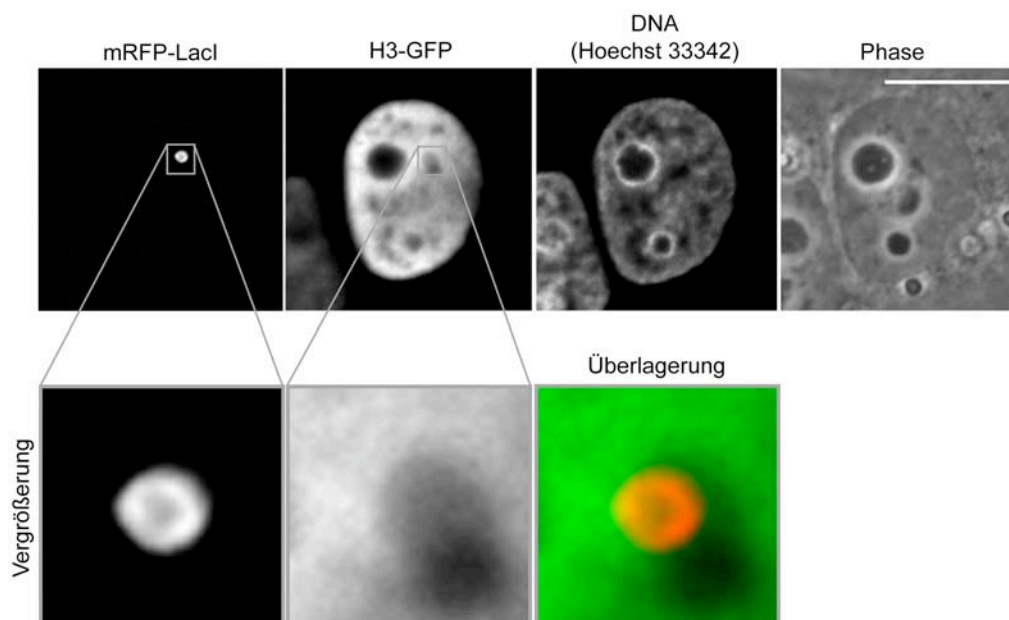
#### **3.7.1 Eine Colokalisation von H3 und dem episomalem Indikatorgen kann nicht eindeutig gezeigt werden**

Einen ersten Hinweis auf die mögliche Bildung von Chromatin an nicht genomischer DNA, sollte eine Colokalisationsuntersuchung geben. Das Histon H3 ist eines der vier Core-Histone eines Nucleosoms in Säugetierzellen, das zusammen mit H4 zu den Histonen mit geringer Austauschrate gehört (Kimura and Cook 2001). Daher sollte es als Marker für Chromatin dienen.

HeLa-Zellen wurden ausgesät, mit dem Indikatorgen, dem „Gene Tag“ mRFP-LacI und einem Expressionsplasmid für das Histon H3-GFP transfiziert und 48 h später fixiert. Die Visualisierung des Indikatorgens durch den „Gene Tag“ auf DNA Ebene als rot fluoreszierendes Cluster im Kern ist deutlich zu erkennen. Die H3-GFP-Fluoreszenz zeigt das erwartete Chromatin-Muster im Kern, das die Nucleoli ausspart. Die deutliche Abhebung



von kondensierteren DNA-Bereichen entspricht denen der DNA-Gegenfärbung, ist aber nicht so kontrastreich wie diese. Darüber hinaus gibt es keine eindeutige Colokalisation des episomalen Indikatorgens mit dem Histon H3, wie man sie bei solch einer Ansammlung an DNA erwarten würde. Abb. 37 zeigt die dekonvolvierten Fluoreszenzaufnahmen einer repräsentativen Zelle.



**Abbildung 37**

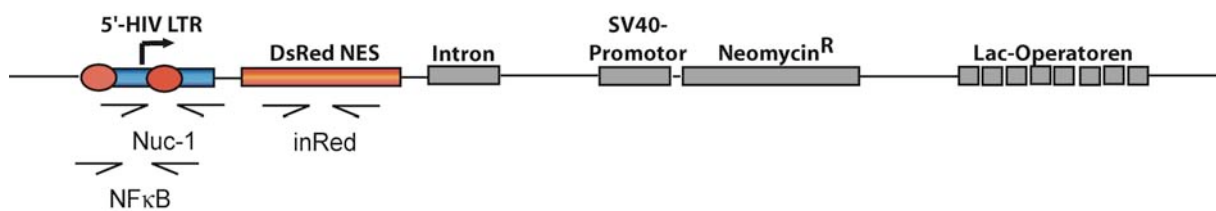
**Colokalisation des episomalen Indikatorgens und H3.** HeLa-Zellen wurden mit dem Indikatorgen, dem „Gene Tag“ mRFP-LacI und einem H3-GFP-Expressionsplasmid co-transfiziert und 48 Std. später fixiert. Der mRFP-LacI-Kanal zeigt das durch den „Gene Tag“ visualisierte Indikatorgen auf DNA-Ebene. H3-GFP zeigt das visualisierte Histon H3. Die DNA wurde mit Hoechst 33342 gegengefärbt. Die untere Bildreihe zeigt einen Bildausschnitt der beiden Kanäle für mRFP und GFP vergrößert und überlagert. Es ist keine eindeutige Colokalisation von H3-GFP und dem visualisierten Indikatorgen zu sehen. Scale Bar: 10 µm.

### 3.7.2 ChIP-Analyse für das integrierte Indikatorgen

Um auf biochemische Art und Weise die Bindung von Proteinen an Chromatin zu zeigen, wird häufig die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) als Methode verwendet. Hierbei werden DNA-gebundene Proteine mit der DNA durch Fixierung kreuzvernetzt, die DNA verdaut und anschließend mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die co-präzipitierte DNA kann mittels PCR nachgewiesen werden.

Für die integrierte HIV-LTR ist bekannt, dass bei der Transaktivierung durch das virale Protein Tat, Chromatin-modellierende Faktoren rekrutiert werden, die z.B. zu einer

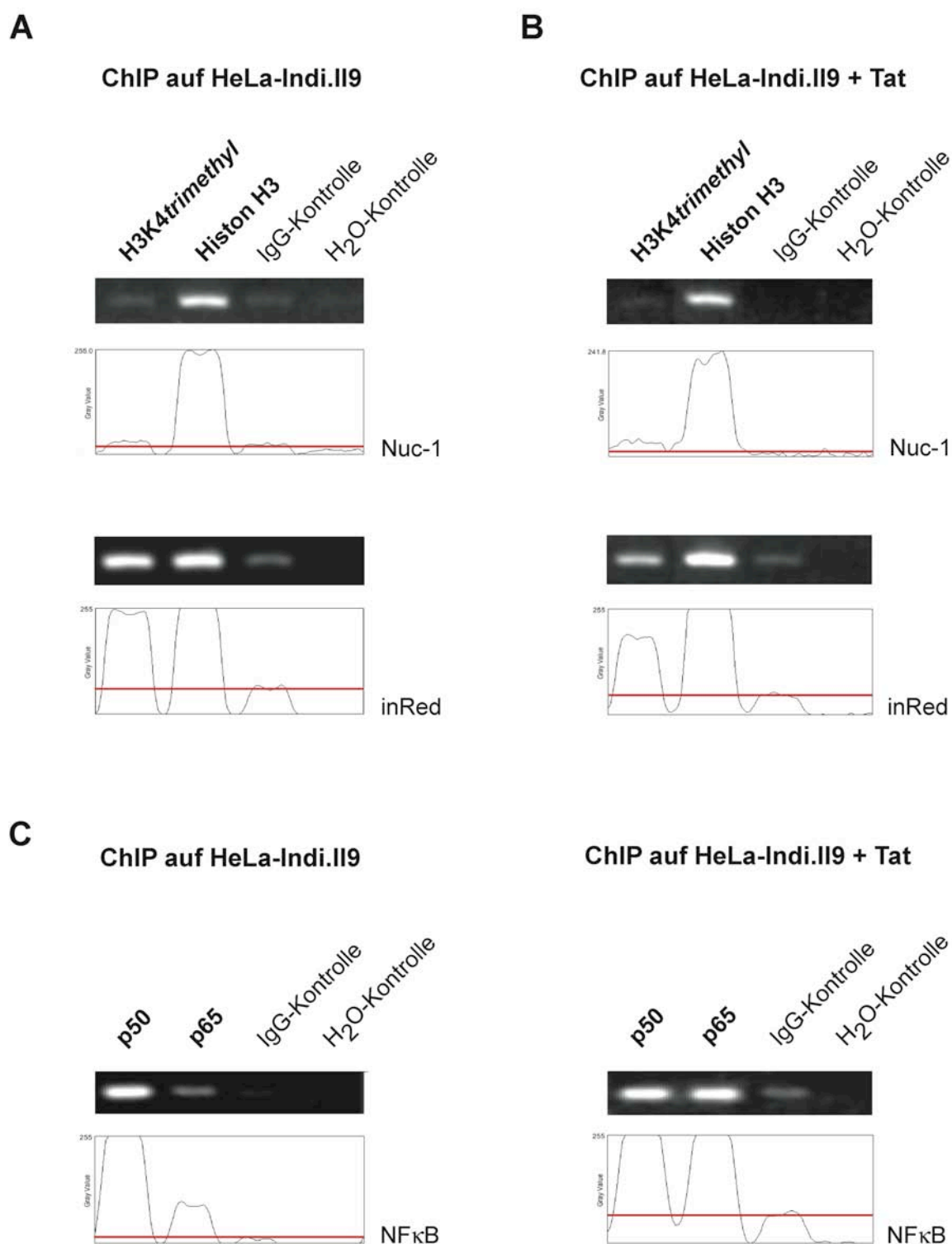
Hyperacetylierung oder Methylierung des Nuc-1 führen (vgl. 1.2.2). Um diese Veränderungen für das integrierte Indikatorgen zu testen, wurden ChIP-Analysen durchgeführt. Hierbei wurde der Erfolg der Methode generell durch die Präzipitation mit einem Antikörper gegen Histon H3 getestet. Darüber hinaus ist bekannt, dass durch die Tat-Aktivierung in den codierenden Bereichen der Gene, das Histon H3 an Lysin-Position K4 trimethyliert wird. H3K4 ist generell ein Marker für aktive Transkription in menschlichen Zellen (vgl. 1.1.2 und 1.2.2). Dies sollte bestätigt und für das Nucleosom 1 untersucht werden, das Hauptziel des Tat-bedingten Nucleosomen-Remodeling ist. NF $\kappa$ B ist der Transkriptionsfaktor, dessen Bindungssequenzen im Enhancer-Bereich der HIV-LTR liegen und wichtig bei der transkriptionellen Aktivität der LTR ist. Auch dessen Bindung sollte bei einer ChIP mit Antikörpern gegen die beiden Untereinheiten von NF $\kappa$ B p50 und p65 untersucht werden bzw. als Positivkontrolle dienen. Die Tat-Aktivierung erfolgte durch Transfektion der Zellen mit einem Tat-Expressionsplasmid 48 Std. vor der Zellernte. Als Negativkontrollen wurden zwei ChIP-Ansätze parallel gemacht. Zum einen ein Ansatz mit einem IgG-Antikörper und zum anderen ein Ansatz ohne Antikörper (noAB-Kontrolle). Diese beiden Ansätze zeigen den zu erwartenden Hintergrund der Methode. Da die letztere Kontrolle immer unter der IgG-Kontrolle lag, ist diese nicht gezeigt. Durch PCRs, die spezifisch die Nuc-1 Region bzw. die NF $\kappa$ B-Bindungssequenz der HIV-LTR amplifizieren und eine weitere mit Primern, die einen Bereich im codierenden Gen *DsRed* binden, wurde versucht die präzipitierte DNA zu amplifizieren. Die Bindebereiche der Primer sind schematisch in Abbildung 38 gezeigt.



**Abbildung 38**

**Primerbindungsstellen für die ChIP-Analyse**, die für die PCR auf geChIPte DNA verwendet wurden. Nuc-1, NF $\kappa$ B und inRed geben die drei Bereiche an.

Die Intensität der Banden wurde durch einen Linien-Scan bestimmt und als Intensitäts-Plot dargestellt. Die Negativkontrolle mit IgG gibt das Hintergrund-Level an. Nur Banden die eine stärkere Intensität zeigen und somit im Intensitäten-Plot überhalb der roten Linie verlaufen, stellen ein Signal und somit eine Bindung des Proteins an die DNA dar.

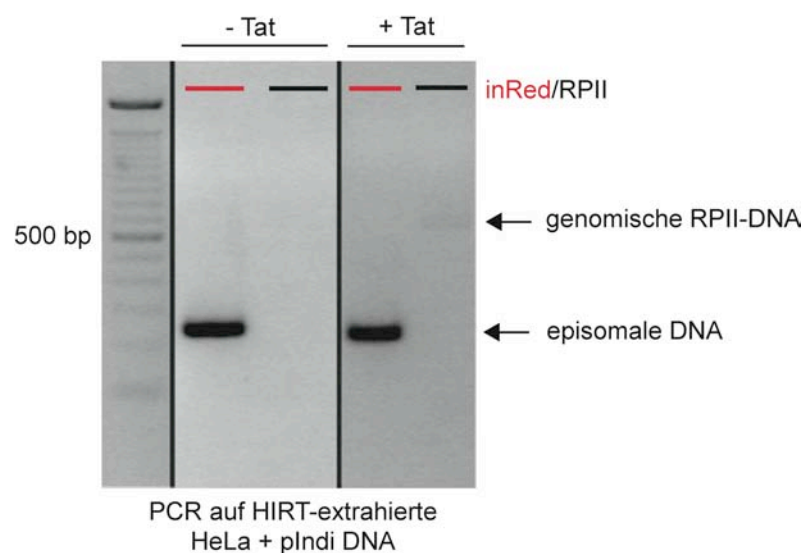
**Abbildung 39**

**ChIP und PCR-Nachweis co-präzipitierter DNA des Indikators in HeLa-Indi.II9.** Es sind die Gel-Bilder der PCR-Produkte gezeigt und ein Plot-Profil dieser Gel-Banden. Die rote Linie gibt das Level der Negativkontrolle IgG an. Nur Banden, die intensiver als die Negativkontrolle sind, zeigen eine spezifische Bindung des präzipitierten Proteins an DNA. **A)** ChIP auf HeLa-Indi.II9 mit Histon-Antikörpern, nachgewiesen mit Nuc-1 und inRed-Primern. **B)** ChIP auf HeLa-Indi.II9 + Tat mit Histon-Antikörpern, nachgewiesen mit Nuc-1 und inRed-Primern. **C)** ChIP auf HeLa-Indi.II9 +/- Tat mit NF $\kappa$ B-Antikörpern, nachgewiesen mit NF $\kappa$ B-Primern.

Die Bindung von H3 an das integrierte Indikatorgen konnte in der Zelllinie HeLa-Indi.II9 für nicht induzierte und Tat-induzierte Zellen sowohl für den Nuc-1-Bereich als auch für den gencodierenden Bereich gezeigt werden. Die spezifische Modifikation des trimethylierten Lysins H3K4 konnte nur für den codierenden Bereich des Indikatorgens gezeigt werden, jedoch ohne und mit Tat-Aktivierung (Abb. 39A und B). Diese Modifikation scheint nicht von der Tat-Aktivierung abhängig zu sein. Die Untereinheit p50 von NF $\kappa$ B konnte ebenso in nicht induzierten als auch induzierten Zellen nachgewiesen werden, p65 dagegen konnte nur in Tat-induzierten Zellen präzipitiert werden (Abb. 39C).

### 3.7.3 ChIP-Analyse der nicht integrierten HIV-LTR im Vergleich

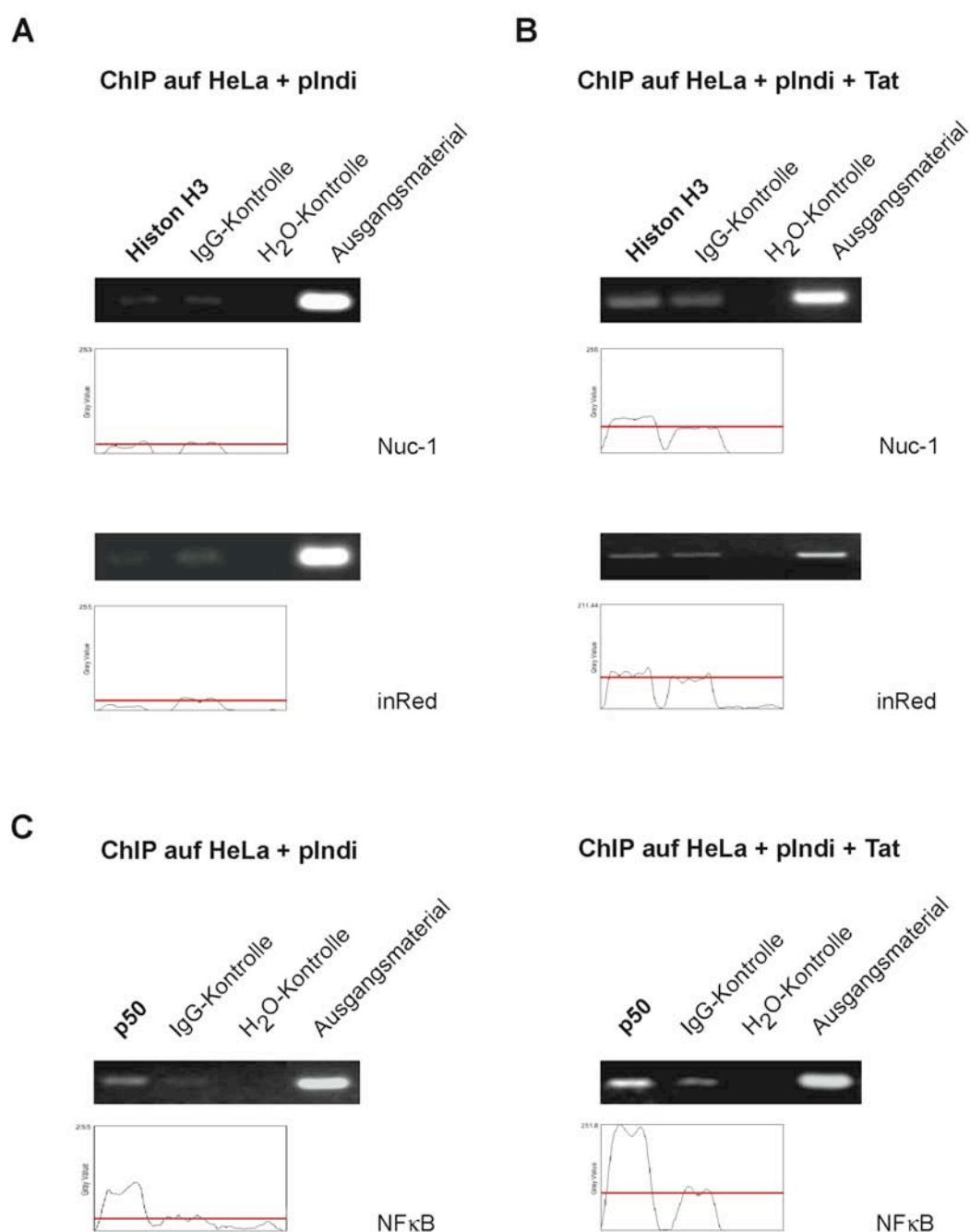
Um die Frage, ob episomale, nicht replizierende DNA in menschlichen Zellen Chromatin bildet, näher zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit dem Indikatorgen pIndi und optional einem Tat-Expressionsplasmid transfiziert und 42 Std. später fixiert und die Proteine dadurch mit der DNA kreuzvernetzt. Durch eine HIRT-Extraktion wurde die episomale DNA von der genomischen DNA der Zellen getrennt. Durch eine PCR mit Primern, die genomische DNA binden (RPII) und Indikatorgen spezifischen Primern (inRed), konnte der Erfolg der Extraktion gezeigt werden (Abb. 40). Episomale DNA lässt sich durch PCR nachweisen, von genomischer DNA sind nur Spuren nach der Amplifikation zu erkennen.



**Abbildung 40**

**Nachweis der erfolgreichen HIRT-Extraktion.** PCR auf HIRT-extrahierte DNA nach Transfektion von HeLa-Zellen mit pIndi bzw. pIndi und einem Tat-Expressionsplasmid. inRed zeigt episomale DNA nach der Amplifikation an, RPII die Kontamination mit genomischer DNA.

Die extrahierte DNA wurde durch eine ChIP-Prozedur auf die Bindung von Histon H3 getestet, eine ChIP mit einem Antikörper gegen p50 sollte als Positivkontrolle dienen.



**Abbildung 41**

**ChIP und PCR-Nachweis co-präzipitierter DNA des episomalen Indikatorgens.** Es sind die Gel-Bilder der PCR-Produkte gezeigt und ein Plot-Profil dieser Gel-Banden. Die rote Linie gibt das Level der Negativkontrolle IgG an. Nur Banden, die intensiver als die Negativkontrolle sind, zeigen eine spezifische Bindung des präzipitierten Proteins an DNA. **A)** ChIP auf HeLa + pIndi mit einem Antikörper gegen das Histon H3, nachgewiesen mit Nuc-1 und inRed-Primern. **B)** ChIP auf HeLa + pIndi + Tat mit einem Antikörper gegen das Histon H3, nachgewiesen mit Nuc-1 und inRed-Primern. **C)** ChIP auf HeLa + pIndi +/- Tat mit einem p50-Antikörper, nachgewiesen mit NF $\kappa$ B-Primern.

Durch eine PCR, die die Nuc-1 Region der HIV-LTR amplifiziert und Primern, die im codierenden Gen *DsRed* liegen bzw. die NF $\kappa$ B-Bindungssequenz flankieren, wurde versucht die möglicherweise präzipitierte DNA zu amplifizieren (vgl Abb. 38). Die Intensität der Banden ist wiederum durch einen Plot dargestellt, bei dem die IgG-Kontrolle den Hintergrund der Methode darstellt.

Nach Induktion des episomalen Indikatorgens durch Tat konnte nur minimal über der Negativkontrolle liegend das Produkt für Histon H3 gebundene DNA nachgewiesen werden. Ohne Tat-Induktion konnte keine episodale DNA co-präzipitiert werden, die an H3 gebunden war (Abb. 41A und B). Mit einem Antikörper gegen p50 dagegen konnte transkriptions-unabhängig episodale DNA präzipitiert werden (Abb. 41C).

## 4 Diskussion

### 4.1 Das GePS im Vergleich zu anderen Systemen

#### 4.1.1 Die visualisierenden Bestandteile des GePS

##### Der „Gene Tag“ und seine spezifische Bindung

Der „Gene Tag“ dient zur Visualisierung des Transgens auf DNA-Ebene und konnte in dieser Arbeit erfolgreich für die spezifische Visualisierung des episomalen Indikatorgens eingesetzt werden. Die Auswahl an drei verschiedenen Farbvarianten durch Fusion des Lac-Repressors mit GFPsg143 als grün fluoreszierendes, eYFP(F46L) als gelb fluoreszierendes und mRFP als rot fluoreszierendes Protein vereinfachte die Benutzung von verschiedenen Farbkombinationen erheblich. Der hier verwendete „Gene Tag“ basiert auf dem Lac-Operator/Lac-Repressor-System. Der Lac-Repressor und der Lac-Operator sind Bestandteile der Regulation des Lac-Operons in Bakterien. Der Wild-Typ Lac-Repressor besteht aus vier identischen Untereinheiten, die jeweils ein Molekulargewicht von 38 kDa haben. Solch ein Tetramer bindet jeweils an zwei Operator-Sequenzen. Der hier verwendete Lac-Repressor bildet nur Dimere, weswegen er nur noch eine Operator-Sequenz bindet. Seine Bindung an die Operator-Sequenz ist sehr spezifisch, da durch einzelne Mutationen in der Operator-Sequenz die Bindung verhindert werden kann. Dieses System stammt aus Bakterien, weshalb die Wahrscheinlichkeit für Kreuzreaktionen in humanen Zellen sehr gering ist. Durch eine NLS (nuclear localization sequence) des SV40 T-Antigens (Simian Virus 40 Large Tumor-Antigen) am Lac-Repressor wird gewährleistet, dass das Fusionsprotein in den Kern transportiert wird, wo sich das Transgen mit den Lac-Operatoren befindet. Die NLS des SV40 T-Antigens ist eine Lysin-reiche Region (AS: PKKKRKV), die durch Bindung an Importin- $\alpha$  und - $\beta$  durch den Kern-Poren-Komplex geschleust wird. Die Expression steht unter der Kontrolle eines schwachen Promotors, dem F9-1 Promotor aus einem Maus-Polyoma-Virus, um die Hintergrund-Fluoreszenz im Kern und das Signal/Rausch-Verhältnis so gering wie möglich zu halten.

Das Lac-Operator/Lac-Repressor-System stellt ein gut etabliertes System dar, das die spezifische Protein-DNA-Bindung ausnutzt. Es wurde bisher in vielerlei Ansätzen erfolgreich angewendet, sowohl in Hefe, Drosophila, Pflanzen als auch Säugetierzellen, um distinkte chromosomale Bereiche zu visualisieren (Tumbar, Sudlow et al. 1999; Tsukamoto, Hashiguchi et al. 2000; Belmont 2001; Kato and Lam 2001; Vazquez, Belmont et al. 2001; Gasser 2002; Spector 2003; Dietzel, Zolghadr et al. 2004; Matzke, Huettel et al. 2005). Ein

ebenso auf bakteriellen Bausteinen basierendes System stellt das Tet-Repressor/Tet-Operator-System dar. Dieses wurde bisher jedoch nur in Hefe und Pflanzenzellen verwendet, um Chromosomenbereiche zu visualisieren (Michaelis, Ciosk et al. 1997; Fuchs, Lorenz et al. 2002; Matzke, Huettel et al. 2005; Cabal, Genovesio et al. 2006). Ein weiteres System, das bisher nur in einer Arbeitsgruppe auch in Säugetierzellen, respektive Mauszellen, Anwendung fand, ist die Bindung eines GFP-fusionierten Glucokortikoid-Rezeptors an die Reporter-Elemente des Maus-Mamma-Tumor-Virus (MMTV) (McNally, Muller et al. 2000; Muller, Walker et al. 2001).

### **Die Referenzstrukturen visualisiert durch fluoreszierende Proteine**

Referenzpunkte werden aus zwei Gründen in einem GePS benötigt. Zum einen soll die Position des Indikatorgens bzw. dessen Veränderung in Bezug auf das Chromosomenterritorium bzw. andere Kernkomponenten bestimmt werden. Zum anderen ist der lebende Kern kein absolut statisches Gebilde. Neben der Eigenbewegung der Zelle, den Bewegungen der Chromosomenterritorien und Foci, gibt es auch Bewegungen wie Brown'sche Molekularbewegungen (Übersichtsartikel (Spector 2003)). Aus diesem Grund wird ein Anhaltspunkt benötigt, zu dem die Bewegung des Indikatorgens relativ bestimmt werden kann. Daher müssen auch diese Komponenten visualisiert werden. Chromosomenterritorien können z.B. durch die Scratch-Loading-Methode (Schermelleh, Solovei et al. 2001) oder Mikroinjektion von fluoreszenz-markierten Nukleotiden und anschließender Segregation *in vivo* markiert werden. DNA kann aber auch durch Lebendzell-Farbstoffe wie Hoechst 33258 oder DRAQ5, die in die DNA interkalieren, dargestellt werden (Martin, Leonhardt et al. 2005). Kernorganellen, wie z.B. Nukleoli, Speckles, Cajal Bodies oder PML Bodies können durch injizierte Antikörper gegen ein typisches Protein des Organells visualisiert werden. Dies bietet zwar die Möglichkeit endogene Proteine darzustellen, jedoch hängt hier die Spezifität nur das gewünschte Protein zu markieren von der Qualität des Antikörpers ab und schließt den Funktionsverlust des Proteins durch die Größe des gebundenen Antikörpers (ca. 150 kDa) und Bindung an ein funktionelles Epitop nicht aus. Dennoch bietet die Antikörperfärbung eine Möglichkeit Aktivitäts-spezifische Modifikationen eines Proteins zu unterscheiden. Da die Mikroinjektion und Antikörperfärbung jedoch einen gewissen mechanischen Eingriff in die Zellen darstellt und in Behinderung der Zellfunktion resultieren kann, bietet die Fusion von fluoreszierenden Proteinen einen verhältnismäßig geringen Eingriff für die Zelle, den sie meist toleriert. Durch die genetische Verknüpfung eines fluoreszierenden Proteins mit dem Zielprotein wird zwar spezifisch nur dieses Protein visualisiert, schließt aber die Darstellung endogener Proteine aus. Auch hierbei darf nicht vergessen werden, dass das fluoreszierende Protein als relativ großer Komplex (>30 kDa) die Lokalisation und Funktion des untersuchten Proteins beeinflussen kann und daher



ausreichend Kontrollen mitgeführt werden müssen (Übersichtsartikel (Shaner, Steinbach et al. 2005; Giepmans, Adams et al. 2006)). In dieser Arbeit wurden verschiedene Referenzstrukturen durch Fusion von Proteinen, die in der Kernstruktur lokalisieren, an fluoreszierende Proteine visualisiert. Alle Fusionsproteine zeigten die erwartete Lokalisation.

#### 4.1.2 Andere Lebendzell-Systeme in Säugetierzellen

Es gibt mehrere bereits existierende Lebendzell-Systeme, die sich auch die spezifische Rekrutierung von einem Transkriptionsfaktor bzw. die Visualisierung der genomischen DNA-Region über DNA-bindende Proteine zu Nutze machen, um die Veränderungen nach Transkriptionsaktivierung an diesem Locus zu beobachten.

Die Arbeitsgruppe um Belmont leistete Pionierarbeit durch Etablierung der Visualisierung einer spezifischen chromosomalen Region über die Lac-Repressor/Lac-Operator Bindung (Tumbar, Sudlow et al. 1999).

Tumbar *et al.* konnten nach Rekrutierung der *Acidic Activation Domain* (AAD) von VP16 in eine 90 Mbp große Chromosomenregion eine Auffaltung des gesamten Chromatinbereichs beobachten (Tumbar, Sudlow et al. 1999). Die spezifische Rekrutierung der VP16-AAD erfolgte durch Fusion an den Lac-Repressor-GFP und dessen Bindung an eine Vielzahl von Lac-Operatoresequenzen, die durch Integration und anschließende Gen-Amplifikation durch DHFR-Inhibitoren (Dihydrofolat-Reduktase-Inhibitoren) stabil in CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary Cells*) integriert worden waren. Parallel zu dieser Auffaltung beobachteten die Autoren die Rekrutierung der Transkriptions-Maschinerie und verschiedener Histon-Acetyltransferasen.

In einem daraus weiterentwickelten Zellsystem, mit nur noch 10-20 Kopien einer 256-Lac-Operator enthaltenden Sequenz, konnten sie die permanente Lokalisation dieser VP16-AAD aktivierten Region im Inneren des Kern von CHO-Zellen zeigen. Ohne eine VP16-AAD Aktivierung wanderte diese Lac-Operator-Region nur vorübergehend in der frühen G1- und der frühen S-Phase in das Innere des Kerns, lokalisierte sonst vorwiegend peripherer (Tumbar and Belmont 2001).

Ein weit ausgefeilteres System entwickelte die Arbeitsgruppe um David Spector. In diesem Lebendzell-System steht ein CFP-Gen indirekt unter der Kontrolle eines Tetrazyclin-induzierbaren Promotors. Die Lokalisations-Detektion des Transgens in der Zelle erfolgt über die Bindung eines YFP-fusionierten Lac-Repressors an die 5' des Gens gelegenen Lac-

Operatoren. Durch die Doxycyclin induzierbare Bindung des Tet-R an die Erkennungssequenz (Tet-O) wird die Aktivierungsdomäne von VP16 an den CMV-Minimalpromotor rekrutiert. In zwei etablierten BHK-Zelllinien (*Baby Hamster Kidney Cells*) mit 1000 und 50 geschätzten Integraten, konnte eine Chromatinöffnung des durch den Lac-Repressor-YFP visualisierten Integrationslocus nach Doxycyclin-Induktion beobachtet werden (Tsukamoto, Hashiguchi et al. 2000).

Eine Weiterentwicklung dieses Systems erlaubt darüber hinaus die Visualisierung der transkribierten RNA über die Bindung von MS2-YFP an dafür spezifische Bindungsstellen in der RNA. Auch fluoreszenzmarkierte Transkriptionsfaktoren, Spleißfaktoren oder die RNA Polymerase II colokalisierten an dem Genlocus. Eine expressionsabhängige Chromatinveränderung konnte ebenfalls in diesem System durch Veränderung von Histonmodifikationen gezeigt werden (Janicki, Tsukamoto et al. 2004). Jedoch tragen die dort verwendeten Zelllinien ungefähr 200 Kopien des Transgens mit jeweils 256 Lac-Operatoren und 96 Tetrazyklin-Response-Elementen.

Ein viertes Lebzendzell-System basiert auf der Induzierbarkeit des MMTV-Promotors durch das Glucokortikoid-Hormon Dexamethason und der spezifischen Bindung des Glucokortikoid-Rezeptors an entsprechende Elemente im MMTV-Promotor (*Murine Mamma Tumor Virus*). Durch Markierung des Glucokortikoid-Rezeptors mit GFP konnte der Array von 200 Kopien des MMTV-Promotors visualisiert werden und eine deutliche Dekondensierung des Chromatins nach Zugabe des Hormons in Maus-3617-Zellen beobachtet werden (Muller, Walker et al. 2001).

#### **4.1.3 Das Indikatorgen und daraus entstehende Vorteile des GePS gegenüber den anderen Lebzendzell-Systemen**

Um expressionsabhängige Positions-Veränderungen des Transgens beobachten zu können, muss es durch einen induzierbaren Promotor reguliert werden, der spezifisch durch einen Aktivator induziert werden kann. Außerdem muss die genaue Position des Transgens für positionelle Veränderungen bestimmbar und der aktive Zustand des Transgens leicht und schnell durch ein Reporterprotein zu erkennen sein.

Das Indikatorgen pIndi wurde aufgrund dieser Voraussetzungen kloniert. Das Transgen besitzt die HIV-1 LTR als induzierbaren Promotor, der spezifisch durch das virale Tat-Protein induziert werden kann. Dies konnte durch FACS-Analysen sowohl für das episomale als auch das integrierte Transgen gezeigt werden. Darüber hinaus besitzt es 64 Bindungs-

stellen für den Lac-Repressor, wodurch es über die Bindung der verschiedenfarbigen „Gene Tags“ im episomalen Status als leuchtender Punkt im Kern sichtbar war. Das Reporterprotein *DsRed* ist einfach und sicher im Mikroskop wie im FACS detektierbar. Darüber hinaus konnte die Interaktion mit endogenen Spleißfaktoren eindeutig gezeigt werden, da durch das enthaltene Intron verschiedene Transkriptvarianten möglich sind, die durch eine analytische PCR und Auftrennung im Gel zu detektieren waren.

Das hier entwickelte GePS bietet zwei maßgebliche Vorteile gegenüber den in 4.1.2 beschriebenen Systemen. Zum einen steht die induzierbare Expression des Indikatorgens unter der Kontrolle der HIV-1 LTR. Auch wenn dieser Promotor ein viraler Promotor ist, nutzt er mit Ausnahme des viralen Transaktivators Tat nur zelluläre Faktoren, um die Transkription zu bewerkstelligen. Er stellt daher für humane Zellen einen relevanten Promotor dar, da der Mensch Zielwirt des HI-Virus ist und sich das Virus sehr genau an die Transkription des Wirts angepasst hat. Die Transkriptionsaktivierung bzw. –elongation erfolgt auf RNA-Ebene durch die Bindung des viralen Tat-Proteins an die frisch naszierende RNA. Das heißt, die ersten Tat-unabhängigen Transkripte entstehen nur durch die durch zelluläre Faktoren bedingte Transkription. Darüber hinaus integriert das Virus stabil ins Genom der Wirtszelle und bildet durch Bindung von Nukleosomen Chromatin wie diese und nimmt die spezielle Chromatinkonformation des Integrationsortes an. Gerade was die Chromatinbeschaffenheit und das Nukleosomen-Remodeling bei der Transkriptionsaktivierung angeht, ist viel über die integrierte HIV-1 LTR bekannt.

Zum anderen wurden in dieser Arbeit Zelllinien etabliert, die nur einzelne Integrate tragen und so am ehesten dem natürlichen Transkriptions-Reglement einer Zelle entsprechen.

Das System aus der Arbeitsgruppe um David Spector dagegen basiert auf der Aktivierung eines CMV-Minimalpromotors nach Rekrutierung der VP16-AAD durch das Tet-R/Tet-O-System. Die Aktivierungsdomäne von VP16 stellt einen enorm starken Transaktivator der Herpes Simplex Viren dar (Sadowski, Ma et al. 1988), die aufgrund von 96 Response-Elementen für Tet-R in einer großen Anzahl an die zu transkribierende Region rekrutiert wird. Hier stellt sich die berechnete Frage, ob diese große Anzahl an starken Transaktivatoren mit einer normalen Transkriptionsregulation in humanen Zellen vereinbar ist. Dazu kommt noch eine größere Anzahl an Integraten des Reportergens pro Integrationsort. Die beschriebenen Zelllinien tragen 10-1000 Integrate hintereinander (Tsukamoto, Hashiguchi et al. 2000; Janicki, Tsukamoto et al. 2004).

Müller *et al.* umgehen in ihrem System, basierend auf dem MMTV-Promotor und Glucokortikoid-Rezeptor, zumindest die hohe Anzahl an Transaktivatoren, zumal jeder

MMTV-Promotor nur zwei Bindungsstellen für den Glucokortikoid-Rezeptor besitzt (Muller, Walker et al. 2001). Dennoch handelt es sich hier um einen Maus-relevanten Promotor, der nicht eins zu eins auf humane Zellen übertragbar ist, auch wenn über diesen Promotor in Bezug auf die Chromatinbeschaffenheit, Aktivierbarkeit und Nukleosomen-Remodeling vieles bekannt ist (Georgel, Fletcher et al. 2003). Aber auch hier zeigen die Autoren nur Zellen mit einer multiplen Anzahl an Transgenkopien hintereinander (ca. 200 Stück). Somit entspricht dieses Promotor-System auch keiner authentischeren Situation als die Transaktivierung über VP16 des Spector-Systems.

Auch Dietzel *et al.* verwenden einen Säugetier-relevanten Promotor des  $\beta$ -Globin-Locus, der bei Differenzierung der MEL-Zellen (*mouse erythro-leukaemic cells*) durch HMBA (Hexamethylen-Bisacetamid) induziert werden kann. Jedoch sind auch in diesen Zellen ca. 1000 Kopien des Transgens inseriert (Dietzel, Zolghadr et al. 2004).

## **4.2 64 Operatoren und daran gebundene „Gene Tags“ reichen nicht aus, das solitäre Indikatorgen zu visualisieren**

Das Ziel dieses Systems war es im Gegensatz zu den bereits existierenden Lebend-Zellsystemen ein einzelnes integriertes Transgen bei der Transkriptionsaktivierung zu beobachten. Für zwei der etablierten HeLa-Indi Zelllinien lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit sagen, dass sie nur ein einzelnes integriertes Transgen tragen. Wie in Kapitel 3.4 jedoch gezeigt wird, war es nicht möglich dieses durch den „Gene Tag“ zu visualisieren. Dass es nicht an der spezifischen Bindung des „Gene Tags“ liegen kann, zeigt die Visualisierung der episomalen Ansammlung des Transgens.

### **4.2.1 Reduzierung des Signal/Rausch-Verhältnisses im Kern bzw. eindeutige Identifikation eines Signals**

Ein naheliegendes Problem bei der Visualisierung des Transgens bildet das Signal/Rausch-Verhältnis des Fluoreszenz-markierten Lac-Repressors. Die freien, nicht gebundenen Lac-Repressor-Moleküle bewegen sich frei im Kern und akkumulieren dort, da das Protein eine NLS besitzt. Obwohl die Expression aus diesem Grund bereits unter einem sehr schwachen Promotor steht, sieht man nach Transfektion des codierenden Plasmids eine deutliche Fluoreszenz im Kern. Ein weiteres auftretendes Problem ergibt sich durch unspezifische Akkumulationen des überexprimierten DNA-Bindeproteins mit sich selbst oder an Strukturen

in der Zelle, durch die Bereiche entstehen können, die eine intensivere Fluoreszenz zeigen als andere Bereiche im Kern und somit eindeutig als Signal ausgeschlossen werden müssen.

Da beobachtet wurde, dass die transiente Expression eines Gens deutlich stärker ist als die Expression des stabil integrierten Pendants, wurde eine der drei Zelllinien - HeLa-Indi.21 - stabil mit dem GFPsg143 fusionierten „Gene Tag“ transfiziert. Obwohl die Fluoreszenz in den stabil exprimierenden Zellen niedriger war, konnte dennoch kein Signal des integrierten Indikatorgens detektiert werden. Ein weiterer Versuch war die Deletion der NLS-Sequenz aus dem codierenden Bereich des Lac-Repressors, um so die Verteilung des fluoreszierenden Moleküls in der ganzen Zelle zu erreichen und somit den Hintergrund im Kern zu reduzieren. Die Diffusion des Moleküls in Zytoplasma und Kern der Zelle bewirkte zwar eine Verringerung der Fluoreszenz, zeigte aber nicht den gewünschten Effekt, das Signal visualisieren zu können. Auch der Versuch nach Permeabilisierung der Membran durch eine Digitonin-Behandlung der fixierten Zelle, den nicht gebundenen „Gene Tag“ mit PBS auszuwaschen, brachte nicht den Erfolg das integrierte Indikatorgen auf DNA-Ebene detektieren zu können.

Zwei Möglichkeiten diese Probleme möglicherweise zu umgehen, sind zum einen den Hintergrund drastisch zu reduzieren, zum anderen das Signal eindeutig als solches bestimmen zu können.

Die ideale Lösung zur Senkung des Hintergrundrauschens könnte ein Molekül sein, das erst nach spezifischer Bindung an die DNA-Region fluoresziert. Eine Möglichkeit auf dem Weg dort hin wäre eine Art BiFC-Assay (*bimolecular fluorescence complementation*), bei dem die ungebundenen Hälften eines fluoreszierenden Moleküls nicht leuchten und erst nach Bindung an DNA die räumliche Nähe entsteht, um ein vollständiges Fluoreszenz-Molekül zu bilden. Die Verwendung des Lac- und Tet-Repressors, fusioniert mit solchen unterschiedlichen Hälften eines fluoreszierenden Proteins, wäre eine Möglichkeit. Dies würde aber die Klonierung von abwechselnden DNA-Bindesequenzen für zwei unterschiedliche DNA-Bindeproteine, wie z.B. Lac- und Tet-Operatoren, mit optimiertem Abstand bedeuten und auch die zufällige Bindung der zwei Hälften im frei diffundierenden Zustand nicht komplett ausschließen. Ein weiteres Problem könnte nach der Komplementation das Abdiffundieren des gesamten Komplexes von der DNA darstellen, da sich so über die Zeit auch fluoreszierende Gesamtkomplexe im Kern sammeln würden, was sich bei einer stabilen Zelllinie mit den fluoreszierenden DNA-Bindeproteinen auswirken würde.

Eine Möglichkeit ein Signal eindeutig als solches bestimmen zu können, wäre die Colokalisation zweier verschiedenfarbig markierter DNA-Bindeproteine. So könnte man z.B.

abwechselnd die Operator-Sequenzen für den Lac- und Tet-Repressor als Bindesequenz wählen und die Repressoren mit zwei unterschiedlichen fluoreszierenden Proteinen fusionieren. Nur ein spezifisches Signal wäre hiermit durch die Überlagerung der zwei Farben zu sehen. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine unspezifische Colokalisation beider DNA-Bindeproteine stattfindet, wäre sehr gering.

#### **4.2.2 10 Kopien des Indikatorsgens sieht man in einem Mikroinjektionsversuch**

Da wir keinen Anhaltspunkt hatten, wie viele Operatoren benötigt werden, um das Indikatorsgen durch den gebundenen „Gene Tag“ mit unserem Mikroskop- und experimentellen Aufbau zu sehen, wurde eine Verdünnungsreihe mit 1000, 100, 10 und 1 Molekülen pro 25 fl pipettiert und in den Kern von „Gene Tag“ YFP-LacI stabil exprimierenden HeLa-Zellen mikroinjiziert, fixiert und am Mikroskop untersucht. Der Lac-Repressor lag in nicht-injizierten Zellen diffus verteilt im Kern vor, zeigte nach Injektion des Indikatorsgen-Plasmids in den Zellen Strukturen, die sich etwas vom Hintergrund abhoben. Bei der Mikroinjektion von rechnerisch 10 Plasmiden pro Injektion lag das Minimum für solche strukturierte Ansammlungen. Hieraus lässt sich vermuten, dass >10 Plasmide, respektive ca. 500 Operator-Sequenzen, das zu visualisierende Minimum darstellen. Die Ansammlungen waren zwar sichtbar (vgl. Anhang 8.1.2), hätten aber definitiv nicht ausgereicht, das Indikatorsgen auf längere Zeit zu beobachten, da sie meist nach der Bildaufnahme bereits gebleicht waren.

#### **4.2.3 In der Literatur finden sich nur Tandem-Arrays mit hoher Anzahl an Operatoren**

Wie bereits beschrieben, gibt es unterschiedliche andere Systeme, sowohl in Säugetier-, als auch Hefe- oder Pflanzenzellen, die sich die Bindung des Lac-Repressors an die Operator-Sequenzen zu Nutze machen. Systeme, die mit Säugetierzellen arbeiten, wurden hier auf die Anzahl an Lac-Repressor-Bindungsstellen hin verglichen.

Janicki *et al.* können in ihrem System ein Tandem-Array von ca. 200 Integraten in U2OS-Zellen mit jeweils 256 Lac-Operatoren ( $\approx 50.000$  Lac-Repressor-Bindungsstellen) einfach im Mikroskop detektieren und über die Zeit beobachten (Janicki, Tsukamoto *et al.* 2004). In einer vorangegangenen Arbeit dieser Gruppe konnte immerhin eine BHK-Zelllinie mit ca. 10

Integraten ( $\approx 2.500$  Lac-Repressor-Bindungsstellen) etabliert werden, die zwar ein stabiles Signal der Integrate zeigte, aber eine eindeutige Öffnung des Chromatins nicht mehr sicher beobachtet werden konnte, was die Autoren auf die geringe Anzahl an Integraten zurückführten (Tsukamoto, Hashiguchi et al. 2000).

Die Gruppe um Andrew Belmont arbeitet ebenso mit Zellen, die einen 90 Mbp Bereich des Genoms visualisieren (Tumbar, Sudlow et al. 1999) bzw. mit Zelllinien, die auch ca. 10-20 Integrate ( $\approx 2.500-5000$  Lac-Repressor-Bindungsstellen) tragen (Tumbar and Belmont 2001). Dietzel *et al.* verwenden in ihrer Arbeit eine Zelllinie, die 1.000 Kopien eines Transgens mit jeweils 64 Lac-Operatoren ( $\approx 6.500$  Lac-Repressor-Bindungsstellen) trägt, um eine eindeutige Öffnung des Chromatins nach Transkriptionsaktivierung beobachten zu können (Dietzel, Zolghadr et al. 2004).

Es wird deutlich, dass die Mindestanzahl an Lac-Repressor-Bindungsstellen in Säugetierzellen bei 2500 liegt, die sicher beobachtet werden können, d.h. es müssen ca. 10 Integrate hintereinander mit jeweils 256 oder 40 Integrate mit 64 Lac-Repressor-Bindungsstellen ins Genom der Wirtszelle integriert sein.

#### **4.2.4 Klonierung von 256 Operatoren war in diesem LTR-System nicht möglich**

Nachdem es deutlich wurde, dass ein einzelnes Integrat mit nur 64 Lac-Repressor-Bindungsstellen nicht sicher visualisiert werden kann, wurde versucht über die Anzahl der Lac-Repressor-Bindungsstellen diese Möglichkeit dennoch zu verbessern. Es war das Ziel, möglichst wenig Transgenkopien pro Zelle zu erhalten.

Die Klonierung der Sequenz für 64 Lac-Repressor-Bindungsstellen gestaltete sich in Vektoren, die eine 5'- und 3'-LTR trugen, schwieriger als in andere Vektoren. So konnten 64 Lac-Repressor-Bindungsstellen auf Anhieb in den pGene Vektor des pSwitch-Systems von Invitrogen oder den pPolyIII-I-Lys kloniert werden, wohingegen für die Klonierung in den pLTR-Vektor mehrere Anläufe mit verschiedenen Restriktionsstrategien benötigt wurden. Die Klonierung der 256 Lac-Repressor-Bindungsstellen gestaltete sich in dieser Arbeit als aussichtslos und führte nicht zum Erfolg. Möglicherweise liegt dies an dem Vorhandensein von zwei repetitiven Sequenzen: der HIV-1 LTR und den Operator-Sequenzen. Für die Amplifikation von retroviralen Sequenzen wie den LTRs bieten die verschiedenen Hersteller kompetenter Bakterien für die Transformation bereits spezielle Bakterienzellen an, die eine geringere Rekombinationsrate zeigen, die möglicherweise aber dennoch nicht mit der hohen

Anzahl an Lac-Repressor-Bindungsstellen umgehen konnten. Die Arbeitsgruppe um Peter Sommer arbeitet ebenso mit HIV in Kombination mit dem Lac-Repressor/Lac-Operator-System und konnte bislang auch nur 64 Lac-Repressor-Bindungsstellen erfolgreich in ihre Vektoren klonieren (persönliche Kommunikation).

### **4.3 Das episomale Indikatorgen lässt sich in lebenden HeLa-Zellen visualisieren und bildet eine geringe Anzahl von Clustern im Kern, die transkribiert werden**

#### **4.3.1 Clusterbildung der Episomen – ein Transfektions-Artefakt?**

Im Gegensatz zu dem integrierten einzelnen Indikatorgen konnte das episomale, transient transfizierte Indikatorgen in HeLa-Zellen detektiert werden. Es zeigt sich im Kern als hell fluoreszierender Punkt, der sicherlich eine Ansammlung von geclusterten Plasmiden repräsentiert. Auffallend dabei war, dass die Anzahl dieser Cluster im Kern der transfizierten Zellen sehr gering war (<10 pro Kern) und eine durchschnittliche Größe von 1,17  $\mu\text{m}$  hatten. Die hier ermittelte durchschnittliche Größe stellt den gemessenen Mittelwert aus 30 Clustern dar und gibt eine ungefähre Größe an, da durch manuelle Setzung des Grauschwellenwerts und der Messlinie eine subjektive Komponente bei der Messung nicht ausgeschlossen werden kann. Hierbei muss auch bedacht werden, dass ein Aggregat mit einem Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  die Ansammlung vieler Plasmide darstellen muss, und eine Ansammlung einer geringeren Anzahl möglicherweise nicht sichtbar war, was eine Erklärung wäre, warum nicht in allen transfizierten Zellen überhaupt ein Cluster zu sehen war (vgl. auch 4.4.1).

Eine nahe liegende Vermutung für eine Clusterbildung ist, dass supercoiled DNA nicht nur in sich verwunden ist, sondern auch mit anderen Plasmiden in Lösung Aggregate bildet und sich daher auch im Kern als Ansammlung präsentiert. Jedoch konnten diese Cluster auch nach Linearisierung der Indikatorgen-DNA im Kern gefunden werden. Somit zeigt auch die offene linearisierte DNA dieses Phänomen. Eine Kreuzvernetzung verschiedener Plasmide über den Lac-Repressor scheidet theoretisch aus, da der hier verwendete Lac-Repressor nur noch Dimere bilden kann, und jeweils ein Dimer eine Operatorsequenz bindet. Pecinka *et al.* konnten jedoch in *Arabidopsis* feststellen, dass repetitiv vorkommende Transgene miteinander akkumulieren, selbst über verschiedene Integrationsorte hinweg, was durch die



Anwesenheit des Lac-Repressor-GFP noch verstärkt werden konnte (Pecinka, Kato et al. 2005). Möglicherweise wird dieser Effekt in transient transfizierten Zellen noch verstärkt, da die Plasmide bei der Transfektion wahrscheinlich in räumlicher Nähe in den Zellkern gelangen.

Möglicherweise hatte die Art der Transfektion der Plasmid-DNA einen Einfluss auf die Aggregat-Bildung, da sowohl nach Lipid-basierter Transfektion als auch Mikroinjektion (vgl. 8.1.1) Cluster zu sehen waren, jedoch nicht nach Nukleofektion (Elektroporation-basierte Methode). Bei den beiden erst genannten Methoden gelangt die DNA möglicherweise als Ansammlung in den Kern. Bei der Lipid-basierten Transfektion wird die DNA von einer Lipidhülle eingeschlossen in die Zelle gebracht und gelangt dann nach der Zellteilung während die Kernmembran abgebaut wird in den Kern. Auch bei einer Mikroinjektion wird die DNA an einer bestimmten Stelle direkt in den Kern injiziert. Bei der Nukleofektion dagegen gelangt die DNA durch Permeabilisierung der Membran zwar auch direkt in den Kern, jedoch wird bei diesem Vorgang die DNA zum größten Teil in mehrere Teile gebrochen, was auch vermuten lässt, dass mögliche Ansammlungen der supercoiled DNA und deren Struktur aufgebrochen und räumlich getrennt werden (persönliche Mitteilung des Produktspezialisten von Amaxa, Köln).

Binnie *et al.* erarbeiten mit ihren Versuchen eine andere Möglichkeit, das Auftreten von extrachromosomalen Clustern zu erklären. Sie konnten nach transienter Transfektion eines Expressionsplasmids unter der Kontrolle der HIV-LTR durch RNA-FISH Transkriptionsdomänen beobachten. Diese lagen als punktförmige Cluster mit einer Anzahl von 5-20 pro Kern und einer Größe von 200 nm bis 1µm im Interchromatinbereich vor. Sie konnten zeigen, dass das Zusammenlagern der Transkriptionsdomänen von der Gensequenz, nicht aber von der Sequenz des Rückgrates der Plasmide abhängt, da sie mit unterschiedlichen Intronsequenzen distinkte Cluster bekamen, die sich nicht mischten (Binnie, Castelo-Branco et al. 2006). Möglicherweise kann man dies jedoch nicht ganz uneingeschränkt sagen, da in dieser Arbeit Cluster von nicht integrierter Plasmid-DNA transkriptionell unabhängig beobachtet werden konnten, sowohl von Plasmiden, die nicht Tat-induziert waren (pI<sub>ndi</sub>) als auch Plasmiden, die keine Genkassette trugen (pPS-8.8), (vgl. 3.5).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass diese Aggregate durch die Struktur bzw. identische Sequenz von Plasmid-DNA verursacht werden, liefert auch die Arbeit von Bell *et al.*, die durch FISH episomale HIV-DNA als Aggregate im Kern infizierter Zellen visualisierten. Auch sie fanden eine geringe Anzahl an HIV-DNA-Clustern im Kern nach Infektion der Zellen (Bell, Montaner et al. 2001).

### 4.3.2 Die Cluster werden transkribiert

Bei den Untersuchungen des episomalen Zustandes des Indikatorgens bezüglich der Expression des Reportergens, des Spleißens der RNA und der Chromatinbeschaffenheit kam die Frage nach dem Zusammenhang der Cluster und den untersuchten Aspekten auf. Es war nicht klar, ob diese Ansammlungen an episomalen Indikatorgenen überhaupt aktiv sind oder nur als inaktive Ablagebehälter dienen und die Transkription von Episomen bewerkstelligt wird, die nicht Bestandteile der sichtbaren Aggregate sind.

Um dies zu überprüfen, wurde eine Colokalisations-Untersuchung durchgeführt. Die RNA Polymerase II katalysiert die RNA-Synthese und wird an transkriptionsaktive Promotoren rekrutiert, um die Transkription zu bewerkstelligen (Lemon and Tjian 2000). Daher wurde die Colokalisation der RNA Polymerase II und dem episomalen Indikatorgen plndi untersucht. Es wurde in 80% der Tat-induzierten Zellen eine deutliche Colokalisation gezeigt. Im Gegensatz dazu colokalisierten nur 10% in uninduzierten Zellen. Mit dem Plasmid pPS-8.8, das keine Promotorsequenzen trägt, wurde keine Colokalisation beobachtet.

Die Regulation der Transkription wird über den Phosphorylierungsstatus der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA Polymerase II bedingt. Die hypophosphorylierte Form der Polymerase wird an die Promotoren rekrutiert, durch Phosphorylierung des Serin 5 kann die Polymerase einen Initiationskomplex bilden, wohingegen nur die hyperphosphorylierte Form (Serin 2 und 5 phosphoryliert) die Elongationsfähigkeit besitzt (Palancade and Bensaude 2003). Jedoch ist die CTD nicht für die Erkennung von Promotorregionen zuständig, sondern wird für die Bildung des Initiationskomplexes und nachfolgende Elongation unbedingt benötigt (Lux, Albiez et al. 2005). Daher lässt sich erklären, warum an nicht-induzierten Indikatorgen-Plasmiden z.T. auch die Polymerase colokalisierte, diese jedoch nie am Plasmid ohne Promotorsequenzen zu finden war. Durch Co-Expression von Tat wurde zusätzlich die RNA Polymerase II an die HIV-1 LTR rekrutiert, was in diesem deutlichen Colokalisations-Signal Tat-induzierter Zellen resultierte.

Auffällig war, dass in induzierten Zellen die RNA Polymerase II außen um das Signal des Indikatorgens akkumulierte. Eine mögliche Erklärung wäre die extrem dichte Packung der geclusterten Indikatorgen-Plasmide, die in manchen Zellen selbst im Phasenkontrast als dichte Strukturen auffielen. Möglicherweise kann die Polymerase zum großen Teil nur von außen an die Aggregate und nicht in diese Struktur hinein diffundieren. Darüber hinaus wurde für die RNA Polymerase II gezeigt, dass sie wie das episomale Indikatorgen im

Interchromatinbereich lokalisiert und an der Oberfläche von Chromatindomänen zu finden ist (Albiez, Cremer et al. 2006).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsmaschinerie an die episomalen Indikatorgenkonstrukte rekrutiert wird und nach Tat-Induktion verstärkt dort akkumulieren. Eine Aussage über die Aktivität der Polymerase kann hier jedoch nicht gemacht werden, da die Colokalisation mit einem Antikörper gegen die RNA Polymerase II untersucht wurde, der keinen speziellen Phosphorylierungsstatus anzeigt. Ein endgültiger Beweis, dass die nachgewiesene RNA in diesen Zellen auch tatsächlich an diesen Loci entstanden ist, würde nur ein Nachweis der RNA an diesen Indikatorgen-Clustern z. B. in Form einer RNA-FISH geben.

In der Arbeit von Binnie *et al.* zeigen die Autoren über RNA-FISH, dass transient transfizierte Plasmide sich zu Clustern formieren und damit auch transkriptionell aktiv sind (Binnie, Castelo-Branco et al. 2006).

#### 4.4 Tat-abhängige Transkription und Spleißen

Die Transkription und das pre-mRNA-Spleißen sind in eukaryotischen Zellen eng verknüpft, durch Hinzufügen von Spleiß-Signalen ins Transkript eines Gens kann dessen Transkription gesteigert werden (Fong and Zhou 2001). Es wird postuliert, dass die CTD der RNA Polymerase II zumindest vorübergehend mit Komponenten der Spleiß-Maschinerie interagiert und so die Verknüpfung stattfinden kann (Bentley 2002; Neugebauer 2002).

Das Indikatorgen besitzt 3' des offenen Leserahmens für das Reporter gen *DsRed* ein murines  $\beta$ -Globin-Intron, dessen Spleißdonor und -Akzeptor eine nahezu ideale Erkennungssequenz besitzen (Score 92 bzw. 95). Zusätzlich befinden sich noch zwei weitere Donore und ein Akzeptor in der Sequenz (Scores >80), wodurch theoretisch sieben Transkriptvarianten entstehen können, das ungespleißte und sechs alternativ gespleißte Transkripte.

##### **Der Spleißerfolg hängt mit der Prozessivität der RNA Polymerase II zusammen**

Bei der qualitativen Untersuchung der Indikatorgen-RNA und deren Transkripte war auffällig, dass auch ohne die Transkriptionsaktivierung durch Tat RNA transkribiert wurde, sowohl von episomaler als auch integrierter DNA. Diese lag aber fast vollständig ungespleißt vor und es kam so zu keiner Proteinexpression, da intron-haltige RNA nicht in das Zytoplasma exportiert wird, um dort translatiert zu werden (Legrain and Rosbash 1989). Erst durch Co-Expression von Tat verschob sich das Verhältnis von ungespleißter zu gespleißter RNA deutlich hin zu

überwiegend gespleißten Transkripten, was in der Expression des Reporterproteins resultierte. Die HeLa-Zelllinie HeLa-Indi.4 machte dabei eine Ausnahme. In diesen Zellen wird auch ohne Tat sowohl Reporter-RNA als auch Reporter-Protein in vergleichbaren Mengen wie nach der Aktivierung in den anderen Zelllinien synthetisiert, wobei auch hier die RNA ohne Tat schon überwiegend gespleißt vorliegt. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Spleißen der Transkripte stark von der Prozessivität der Polymerase abhängt. Ohne die Präsenz von Tat an der LTR befindet sich die RNA Polymerase II in einem inaktiven Zustand, der zwar die Transkription von einigen Molekülen erlaubt, es aber zu keiner weiteren Prozessierung der RNA kommt. Die Tatsache, dass in der Zelllinie HeLa-Indi.4 auch ohne Tat, das Reportergen stark transkribiert wird, liegt wahrscheinlich an der Integration des Indikatorgens in die räumliche Nähe eines aktiven zellulären Promotors, der die Prozessivität der RNA Polymerase II Tat-unabhängig steigert (vgl. 4.6).

### **Die Mutante Tat(K41A) induziert kein Spleißen**

Um den Einfluss des viralen Transaktivators Tat transkriptions-unabhängig auf das Spleißresultat zu testen, wurde in dieser Arbeit die transkriptions-defiziente Variante Tat(K41A) kloniert und in der Zelllinie HeLa-Indi.II9 auf ihre Fähigkeit das Spleißen zu stimulieren getestet.

Tat kann an verschiedenen Lysinen in verschiedenen Proteindomänen acetyliert werden. Durch AS-Austausche der einzelnen Lysine wird die Transaktivierbarkeit von Tat in allen Fällen deutlich vermindert. Die Acetylierung an K28 durch P/CAF steigert die Bindung von Tat an CDK9/pTEFb, die an Position K50 durch p300 veranlasst die Dissoziation von Tat von der TAR, was früh bei der Transkriptionselongation statt findet (Kiernan, Vanhulle et al. 1999). CBP/p300 scheint zusätzlich auch das Lysin K51 zu acetylieren, das auch für die Transkriptionsaktivierung durch Tat unerlässlich ist (Deng, de la Fuente et al. 2000). Darüber hinaus zeigen die Autoren, dass Tat *in vitro* an Position K41 und K71 autoacetyliert wird. Mutationen auch an diesen AS führen zur Inaktivität von Tat (Deng, Wang et al. 2001). Die Aminosäureposition 41 liegt in der *core*-Domäne von Tat, die für die Transkriptionsaktivierung von Bedeutung ist, aber keinen Einfluss auf die Bindung an TAR hat, wie es für die AS 50/51 gezeigt ist, und somit die räumliche Nähe zur LTR gewährleisten sollte.

Das Protein Tat(K41A) war nicht in der Lage die Transkription des Reportergens nennenswert zu induzieren, jedoch konnte auch keine Stimulation des Spleißens der wenigen entstandenen Transkripte festgestellt werden. Geht man davon aus, dass Tat nicht über AS 41 sämtliche Spleißfaktoren rekrutiert, bestärkt dies die Vermutung, dass die Prozessivität der RNA Polymerase II einen deutlichen Anteil an der Prozessierung und Spleißen der mRNA hat und Tat indirekt durch die Rekrutierung der Polymerase-

aktivierenden Kinasen pTEFb und TFIIH, auf die Prozessierung Einfluss nimmt. Ein weiterer Hinweis hierfür wäre eine Untersuchung der Polymerase II-rekrutierenden Fähigkeit der Tat-Mutante Tat(K41A). Sollte Tat(K41A) zwar die RNA Polymerase II an das episomale Indikatorgen rekrutieren, jedoch nicht die Transkription und das Spleißen initiieren, würde das auch dafür sprechen, dass für den Spleißvorgang eine elongationsfähige Polymerase benötigt wird und das Spleißen co-transkriptionell stattfindet.

### **Dualfaktoren: Spleiß- und Transkriptionselongations-Faktoren**

Fong und Zhou zeigen, dass Spleißfaktoren auch direkt an der Transkriptions-Elongation der HIV-Transkripte beteiligt sein können und somit die Verbindung zwischen Transkription und Spleißen noch viel enger miteinander verknüpft ist als gedacht. Der Transkriptions-Elongationsfaktor Tat-SF1 stimuliert die Elongation der Transkription durch Bindung an pTEFbII, zusätzlich bildet Tat-SF1 aber auch Komplexe mit snRNPs und stimuliert somit das Spleißen. Tat-SF1 könnte möglicherweise ein Dualfaktor sein, um Transkription und Spleißen zu verbinden, (Fong and Zhou 2001). Darüber hinaus konnten Brés *et al.* den Spleißfaktor SKIP (c-Ski-interacting protein) identifizieren, der von Tat rekrutiert wird, pTEFbII bindet und sowohl bei der Elongation als auch dem pre-mRNA-Spleißen benötigt wird (Bres, Gomes et al. 2005). Diese Beispiele decken sich mit der Vermutung, die durch die vorliegende Arbeit dargelegt wurde, dass Tat durch die Rekrutierung von pTEFbII auch Spleißfaktoren co-rekrutiert und dadurch ein Zusammenhang zur aktiven Transkription besteht.

### **Tat ist möglicherweise auch ein Dualfaktor**

Berro *et al.* zeigen, dass acetyliertes Wildtyp-Tat-Protein den Inhibitor p32 des alternativen Spleißfaktors SF2/ASF direkt bindet und so die Phosphorylierung und damit verbundene Bindung von SF2/ASF an RNA verhindert. In der latenten Phase des HIV- Vermehrungszyklus wird so überwiegend gespleißte RNA transkribiert und erst durch die Aktivierung durch TSA (Trichostatin A) das Spleißmuster hin zu überwiegend ungespleißter RNA verschoben. Die Autoren zeigen, dass durch Überexpression von SF2/ASF und durch die nicht-acetylierbare Form K50/51A von Tat das Spleißen verstärkt werden kann (Berro, Kehn et al. 2006). Mabon und Misteli zeigen durch simultane FISH und Immunfluoreszenz, dass Spleißfaktoren generell mit unterschiedlicher Effizienz an Spleißstellen rekrutiert werden. Dabei machen sie das Endergebnis des Spleißens für die unterschiedliche Rekrutierung der Spleißfaktoren für alternatives Spleißen verantwortlich und damit vielmehr die wechselnde Kombination verschiedener Spleißfaktoren, als einen alternativen Faktor (Mabon and Misteli 2005). So kann die Zelle viel schneller auf intrazelluläre oder extrazelluläre Reize reagieren, indem über Signalkaskaden Spleißfaktoren modifiziert

werden und sich somit eine andere Zusammensetzung von Spleißfaktoren bildet, was z.B. für die Phosphorylierung von Sam68 durch einen CD44-stimulierten ERK-Signalweg gezeigt wurde (Matter, Herrlich et al. 2002). Es wäre daher denkbar, dass auch in HIV-infizierten Zellen Tat die Rolle eines solch modifizierbaren Faktors spielt, der durch unterschiedliche Acetylierung in unterschiedlichen viralen Zyklusstadien unterschiedliche Faktoren rekrutiert. So könnte Tat alternativ, bedingt durch zelluläre Reize, nicht nur die Virusproduktion durch die gesteigerte Transkription und daraus resultierendes Spleißen fördern, sondern später unabhängig auch durch den Shift zu ungespleißten Transkripten synergistisch mit Rev den Virus-Zusammenbau unterstützen.

### **Cis-wirkende Elemente können in dem Indikatorgen-Zellsystem nicht untersucht werden**

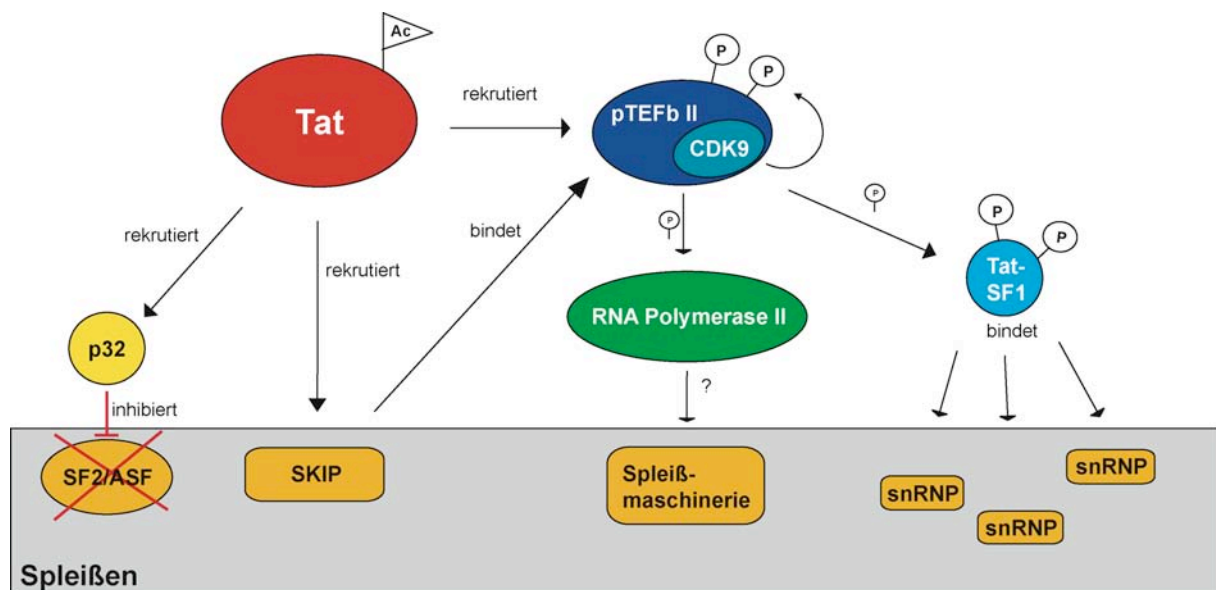
Darüber hinaus wurden *cis*-wirkende Elemente identifiziert, die das Spleißen der viralen RNA regulieren. Dazu gehören die schwachen 3` Spleiß-Stellen, in den Exons bzw. Introns gelegenen Spleiß-Silencer oder Enhancer und 5` Spleiß-Stellen, die selbst als Enhancer für davor liegende Spleiß-Stellen wirken können, sowie das Rev Response Element (RRE), über das unvollständig gespleißte RNA ins Zytoplasma transportiert wird. Diese Elemente werden von U2AF, hnRNPs, SR-Proteinen, snRNPs bzw. Rev gebunden (Übersichtsartikel (Cullen 2003; Stoltzfus and Madsen 2006)).

Der Einfluss solcher Elemente konnte in diesem Indikatorgen-System natürlich nicht mit einbezogen werden, da hier nur die LTR als virales Element enthalten ist und keinerlei virale RNA an sich transkribiert wird. Auch die Untersuchung des Einflusses von Rev auf das Spleißverhalten wurde in dieser Arbeit nur unter dem Aspekt des Einflusses auf die LTR und Tat untersucht, zumal man vermuten könnte, dass Rev schon bei der Transkription dahingehend wirkt, dass die RNA ungespleißt bleibt. Aber durch Co-Expression von Rev ließ sich keine Verschiebung zu ungespleißten Transkripten beobachten. In HIV-infizierten Zellen bindet Rev das RRE der transkribierten viralen RNA und transportiert diese unvollständig gespleißten Transkripte ins Zytoplasma, damit sie dort translatiert werden können. Für Rev sind bisher überwiegend Interaktionspartner beschrieben, die mit dem Transport ins Zytoplasma verbunden sind oder einen verstärkenden Einfluss auf den Export von Rev nehmen, wie z.B. Importin- $\beta$ , CRM1, verschiedene Nucleoporine, eIF5A oder Sam68 (Askjaer, Jensen et al. 1998; Truant and Cullen 1999; Venkatesh, Gettemeier et al. 2003). Darüber hinaus bindet Rev jedoch auch p32 (Zheng, Yu et al. 2003) und könnte dadurch synergistisch mit Tat das Spleißen durch SF2/ASF unterbinden. Da in der hier transkribierten Indikatorgen-RNA kein RRE enthalten ist, ist es nahe liegend, dass Rev keine Exportfunktion in Bezug auf diese RNA übernimmt. Rev scheint aber auch keinen Einfluss auf das Spleißen

selbst über eine Interaktion mit Tat oder anderen mit der LTR assoziierten Faktoren zu nehmen.

### Spleißen ist ein co-transkriptionelles Ereignis

Insgesamt wird deutlich, dass der Prozess zwischen Transkriptionsaktivierung und Spleißen eng verbunden ist und ein komplexes Zusammenspiel darstellt. Abbildung 42 fasst schematisch die möglichen oben beschriebenen Interaktionen zwischen Tat, pTEFb, der RNA Polymerase II mit der Spleißmaschinerie zusammen, die an der LTR ablaufen.



**Abbildung 42**

**Tat-abhängiger Zusammenhang zwischen Transkription und Spleißen.** Tat rekrutiert den Spleißfaktor SKIP, der pTEFbII bindet. Der Transkriptionsfaktor Tat-SF1 bindet pTEFbII und snRNPs. Möglicherweise interagiert auch die Polymerase vorübergehend mit der Spleißmaschinerie. Acetyliertes Tat bindet bei der Aktivierung p32 und inhibiert so das Spleißen durch SF2/ASF und garantiert dadurch Vollängetranskripte für die Bildung des Virions.

## 4.5 Funktion und Relevanz des episomalen Indikatorgens als HIV-1 basiertes Konstrukt

Das hier entwickelte GePS wurde neben dem Aspekt der Zellkernarchitektur auch dahingehend konzipiert, Vergleiche eines integrierten und nicht integrierten Transgens in Bezug auf Expressionsverhalten und Lokalisation im Kern ziehen zu können. Neben der induzierbaren Genexpression, die über die HIV-1 LTR durch das virale Protein Tat vermittelt

wird, zeigt das episomale Indikatorgen einige Eigenschaften, die mit viraler DNA von HIV-1 vergleichbar sind. Diese Erkenntnisse sind daher auch von praktischer Bedeutung, da gerade bei der Untersuchung viral-induzierter Zellvorgänge häufig Systeme entwickelt werden, die den Umgang mit infektiösem Material vermeiden. So gibt es Konstrukte, denen zur Replikation erforderliche genomische Bereiche fehlen, aber die zu untersuchenden Sequenzen noch tragen (z.B. (Malim, Hauber et al. 1988; Jacquenet, Ropers et al. 2001; Wolff, Hadian et al. 2006). Die im Folgenden beschriebenen Eigenschaften setzen die Untersuchungen am episomalen Indikatorgen des GePS in Relevanz zu HIV-1 DNA und dessen Expressionsregulation durch die LTR.

#### **4.5.1 Strukturelle Gemeinsamkeiten des HIV-basierten episomalen Indikatorgens und nicht integrierter HIV-1 DNA**

##### **Sowohl das episomale Indikatorgen als auch nicht integrierte HIV-1 DNA liegen vor der Integration als zirkuläre Moleküle in der Zelle vor**

Das Indikatorgen des GePS liegt, nach Klonierung und Vervielfältigung der Plasmid DNA in Bakterien, als zirkuläres DNA-Molekül vor. Durch die herkömmliche Lipid-basierte Transfektionsmethode bleibt die Struktur der transfizierten DNA und somit auch das Vorkommen in den eukaryotischen Zellen als zirkuläre DNA-Moleküle erhalten. Von der Anzahl an LTRs ähnelt das Indikatorgen-Konstrukt einem 2-LTR-Circle. In Leserichtung der LTRs befindet sich anstelle der viral codierenden Gene das Reportergen für *DsRed* und außerhalb dieser Transkriptionseinheit, zwischen den zwei LTRs, zusätzlich das bakterielle Rückgrat, das zur Klonierung und Amplifikation in Bakterien notwendig ist. Durch die räumliche Trennung der beiden LTRs jedoch gleicht dieser Aufbau des Indikatorgens eher einem integrierten Volllänge-Virus als einem zirkulären HIV-Molekül.

Auch die Existenz von viraler HIV-1 DNA als zirkuläre Moleküle konnten verschiedene Arbeitsgruppen nachweisen. Diese Moleküle können nach der reversen Transkription aber vor der Integration ins Wirtsgenom entstehen und in der Zelle als 1- oder 2-LTR-Circle vorliegen (Farnet and Haseltine 1991). So konnten Teo *et al.* 1- und 2-LTR-Circle in vielkernigen Riesenzellen in Gehirnschnitten von AIDS-Patienten (Teo, Veryard et al. 1997), Wu und Marsh diese zirkulären Moleküle in HIV-infizierten CD4-positiven T-Zellen (Wu and Marsh 2003) und Gillim-Ross die Existenz von 2-LTR-Circles in Makrophagen (Gillim-Ross, Cara et al. 2005) durch PCR und anschließende Sequenzierung nachweisen. Durch geschickt gewählte Primer konnten eindeutig lineare Moleküle ausgeschlossen werden.



Butler *et al.* entwickelten sogar einen quantitativen PCR-Ansatz, um die Menge an nicht integrierter und integrierter HIV-DNA zu bestimmen (Butler, Hansen et al. 2001).

### **HIV-1 DNA und das episomale Indikatorgen lokalisieren im Interchromatin-Bereich**

Sowohl das episomale Indikatorgen des GePS als auch nicht integrierte HIV-1 DNA lokalisieren im Zellkern einer eukaryotischen Zelle im Interchromatin-Bereich. Die Lokalisation des episomalen Indikators konnte in einer derzeit in der Arbeitsgruppe von T. Cremer durchgeführten Dissertationsarbeit von Claudia Weierich gezeigt werden. Nach Transfektion des Indikatorgen-Plasmids und dessen Visualisierung durch den „Gene Tag“ in lebenden HeLa-Zellen, konnte sie die Lokalisation nach induzierter Chromatin-Kondensation eindeutig im Interchromatin-Bereich nachweisen. Sie erhielt weiterhin Hinweise für eine Tat-spezifische Lokalisationsveränderung des Indikators hin zu SC35-Domänen (Weierich, in Vorbereitung).

Bell *et al.* zeigen in ihrer Studie in HIV-1 infizierten U373-Zellen, dass die nicht integrierte Virus-DNA durch FISH nachgewiesen werden kann und in Kombination mit Stress-induzierter Chromatin-Kondensation zu 90% im Interchromatin-Bereich liegt und nur in 10% der Fälle mit der genomischen DNA der Wirtszelle eine Überlappung zeigt. Darüber hinaus zeigen die Autoren, dass diese nicht integrierte DNA fast vollständig (zu 95%) mit SC35-Domänen assoziieren (Bell, Montaner et al. 2001).

### **Nicht integrierte HIV-1 DNA und das episomale Indikatorgen bilden Cluster im Zellkern**

Nach der Transfektion des Indikatorgen-Konstrukts und Visualisierung durch den „Gene Tag“ war auffällig, dass die Großzahl der transfizierten Kerne wenige oder meist sogar nur ein Signal der Indikatorgen-DNA zeigten. Diese Signale waren von unterschiedlicher Größe und konnten durch Messungen auf eine ungefähre Größe von 1,17  $\mu\text{m}$  festgelegt werden, mit einer variablen Größe zwischen 0,6 und 2,2  $\mu\text{m}$  (vgl. 4.3).

Bell *et al.* zeigen in ihrer Studie, dass auch nicht integrierte HIV-1 DNA nach Infektion der Zellen sich zu Aggregaten von 10-50 Stück pro Zellen zusammenlagern und unterschiedliche Größe aufweisen. Die dabei durch FISH visualisierte DNA zeigte oft einen Durchmesser von mehreren Mikrometern und konnte mit einer durchschnittlichen Größe von 7,8 Pixeln (jedoch nach oben hin nicht limitiert) quantifiziert werden (Bell, Montaner et al. 2001).

#### **4.5.2 Expression des HIV-basierten episomalen Indikatorgens und nicht integrierter HIV-1 DNA in PBMCs und HeLas**

Die bekannte und leicht zu handhabende Zelllinie HeLa stellt den Zellhintergrund dar, der für die Etablierung des GePS verwendet wurde. Die Expression des Reportergens befindet sich unter der Kontrolle der HIV-1 LTR, weswegen die Funktionalität dieser induzierbaren Expression auch in HIV-relevanten Zellen, den Lymphozyten, überprüft wurde. Durch Kontrolle des künstlichen Systems in einer wichtigen natürlichen Zielzelle von HIV-1 wurde eine gewisse Relevanz gesichert.

Die Transfektion der frisch isolierten Lymphozyten erfolgte durch Elektroporation der Zellen, was je nach Plasmid in einer Transfektionseffizienz von 30-80% resultierte. Diese Effizienzen sind hoch und mit einer lipidbasierten Transfektion von adhären wachsenden Zelllinien, wie den in dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zellen, vergleichbar und lassen daher in beiden Zelllinien eine Auswertung vieler Zellen zu. Durch Mikroskopie und FACS-Analysen wurde ein direkter Vergleich der Expression gezogen, der in beiden Zelltypen sowohl die Lokalisation von Tat überwiegend im Nukleolus als auch des Reporterproteins *DsRed* im Zytoplasma zeigt. In Lymphozyten, im Speziellen in CD4-positiven Lymphozyten, und HeLas konnte ohne die Expression von Tat in einer FACS-Analyse keine Expression des Reporterproteins *DsRed* beobachtet werden. Diese ließ sich aber in beiden Zelltypen durch die Co-Transfektion von Tat deutlich induzieren und zeigte eine Expression in ca. 33% der Lymphozyten bzw. 28% der CD4-positiven Lymphozyten und einen 30fachen Anstieg in HeLa-Zellen verglichen zu den mock-behandelten Zellen. Auch wenn diese Zahlen nicht direkt vergleichbar sind, da die Induktion in den zwei Zelltypen auf unterschiedliche Weise ausgewertet wurden, zeigt dies, dass die Regulation der HIV-LTR gesteuerten Expression des Reportergens vergleichbar in Lymphozyten und HeLas ablaufen könnte.

Die Größenordnung der Expressionsverhältnisse deckten sich mit denen in der Literatur beschriebenen. Cara *et al.* klonierten, um die HIV-1 Protein Expression von extra-chromosomaler HIV-1 DNA durch synthetische Plasmide zu imitieren, Plasmide mit p24 bzw. Luciferase als Reporter, die die 1- und 2-LTR-Circle und ein 1-LTR-Luc-LTR-Circle nachstellten, das vom Aufbau und Anordnung der LTRs dem Indikatorgen und einem integriertem Volllänge-Virus gleicht. In ihrer Arbeit vergleichen sie die Expression der verschiedenen Reporter-Plasmide anhand des p24 bzw. Luciferase Levels in HeLa-Zellen. Die Autoren konnten durch Co-Expression von Tat einen 100fachen Anstieg an Luciferase für das Plasmid 1-LTR-Luc-LTR erreichen und für die Plasmide 1- und 2-LTR-Circle einen etwa 50fachen Anstieg (Cara, Cereseto *et al.* 1996). Kiernan *et al.* erreichen mit einem LTR-

Luciferase-Reporter eine transkriptionelle Steigerung um das 35fache durch Expression von Tat in SupT1-Zellen, einer Lymphoblastoiden-Zelllinie (Kiernan, Vanhulle et al. 1999).

### **Transkription und Spleißen der episomalen Indikatorgen Cluster und nicht integrierter HIV-1 DNA**

In dieser Arbeit wurde gezeigt und in vorangegangenen Abschnitten diskutiert, dass auch das episomale Indikatorgen des GePS in der Gegenwart von Tat transkribiert, gespleißt und Reporter-Protein synthetisiert wird, sowohl in HeLa-Zellen als auch in primären Lymphozyten. Darüber hinaus konnte die Transkription der Reporter-RNA auch auf RNA- bzw. cDNA-Ebene gezeigt werden. HeLa-Zellen, die transient mit dem Indikatorgen transfiziert wurden, zeigten in einer Real-Time-PCR auf revers transkribierte RNA ohne Co-Expression von Tat eine sehr geringe, aber nachweisbare und quantifizierbare Menge an cDNA Template im Ansatz. Diese Ausgangsmenge steigerte sich um mehr als das 1000fache nach Co-Expression des viralen Transaktivators Tat (Ergibt sich aus den Primer-Effizienzkurven und den  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werten).

In einer kinetischen Studie einer HIV-Infektion von metabolisch aktiven T-Zellen konnte gezeigt werden, dass alle drei Klassen von Transkripten von nicht integrierter viraler DNA vorübergehend transkribiert, jedoch nur die mRNA für die frühen regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef auch translatiert werden (Wu and Marsh 2001). Sowohl Wiskerchen und Muesing als auch Engelman *et al.* zeigen unabhängig voneinander, dass ein Integrase-defizientes Virus die Fähigkeit besitzt, ein stabil integriertes Reporter-Transgen unter der Kontrolle der HIV-1 LTR zu aktivieren, was ebenso auf die Expression der frühen regulatorischen Proteine, wie Tat, schließen lässt (Engelman, Englund et al. 1995; Wiskerchen and Muesing 1995). Wu entwickelte daraus ein Modell der Transkriptionsinitiation durch nicht integrierte virale DNA, in dem schon früh nach Infektion Tat- und CDK9-unabhängig erste Transkripte entstehen, die für das virale Protein Tat codieren. Direkt nach Integration ins Wirtsgenom steht Tat schon zu Verfügung und kann so zum Nucleosomen-Remodeling durch Rekrutierung von HATs und zur Transkriptionsinitiation durch Rekrutierung von pTEFII beitragen (Wu 2004).

## **4.6 Das episomale Indikatorgen bildet wahrscheinlich kein Chromatin**

Die integrierte HIV-1 LTR bildet unabhängig vom Integrationsort im Wirtsgenom eine Chromatinstruktur aus, bei der sich zwei Nucleosomen an distinkten Bereichen der LTR

bilden. Bei der Transkriptionsaktivierung wird für die integrierte LTR ein Nucleosomen-Remodeling beschrieben, für das es noch keine Hinweise für die nicht integrierte HIV-1 LTR gibt. Reeves *et al.* beschreiben 1985, dass Plasmid-DNA schnell nach der Transfektion in eukaryotische Zellen Minichromosomen bilden, die eine zelluläre Chromatinstruktur aufweisen (Reeves, Gorman et al. 1985). Verschiedene Ansätze zeigen, dass nucleosomenfreie LTR-DNA sich *in vitro* anders in der Transaktivierbarkeit verhalten als nucleosomengebundene LTR-DNA. Durch Ausnutzung dieser Eigenschaften wurde getestet, ob die episomale LTR und respektive extrachromosomale, nicht replizierende DNA *in vivo* Chromatin bildet oder nicht. Die Hinweise in der vorliegenden Arbeit tendieren gegen eine Chromatinbildung extrachromosomaler nicht replizierender DNA, da weder eine Bindung noch eine Co-Lokalisation mit dem Histon H3 gezeigt werden konnte.

#### **4.6.1 ChIP und Bindung von Histon H3 und seine Modifikation an der HIV-1 LTR**

Die Chromatin-Immuno-Präzipitation stellt eine häufig angewandte biochemische Methode dar, um DNA-Protein-Interaktionen und damit auch die expressionsabhängige Nucleosomen-Modifikationen der HIV-1 LTR zu zeigen. So konnte z.B. Lusic *et al.* in chronisch infizierten Zellen nach Tat-Aktivierung eine spezifische Acetylierung der Histone H3 an den Lysinen K9 und K14 und der Histone H4 an den Lysinen K5, K8 und K16 des Nuc-1 der integrierten HIV-LTR zeigen (Lusic, Marcello et al. 2003).

#### **H3K4me3 kommt im integrierten Indikatorgen im codierenden Bereich vor, jedoch nicht in der Promotorregion**

Zur generellen Kontrolle der Funktionalität der Methode wurde die ChIP-Prozedur an der HeLa-Zelllinie HeLa-Indi.II9 getestet, in der das Indikatorgen mit der LTR stabil integriert vorliegt. Es konnte deutlich die Bindung des Histons H3 und speziell H3K4me3 am Indikatorgen gezeigt werden, wobei die modifizierte Form von H3 nur im gencodierenden Bereich präzipitiert wurde. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Zhou *et al.*, die eine spezifische Histon-Methylierung von H3K4me3 und H3K36me2 in der Gag-codierenden Sequenz zeigen konnten. Auch diese Autoren konnten diese Modifikationen nicht am Nuc-1 beobachten (Zhou, Deng et al. 2004). Die Modifikation des Histon H3 an Position K4 durch Methylierung stellt zwar meist einen Marker für aktive Transkription im Histon-Code dar (Santos-Rosa, Schneider et al. 2002; Lachner, O'Sullivan et al. 2003; Miao and Natarajan 2005), wenn aber in der Literatur von einem Nucleosomen-Remodeling bei der Transkriptionsaktivierung der HIV-LTR gesprochen wird, ist nur die Modifikation durch

Acetylierung der N-terminalen Histon-Enden gemeint (Übersichtsartikel (Pumfery, Deng et al. 2003; Marcello, Lusic et al. 2004)). Die verschiedenen Methylierungsmodifikationen in diesem Bereich sind noch nicht ergiebig untersucht. Die Hyperacetylierung des Nuc-1 und die Methylierung der Histone im gencodierenden Bereich stellen möglicherweise zwei getrennte Vorgänge bei der Transkriptionsaktivierung dar. Das Nucleosomen-Remodeling bzw. die Hyperacetylierung des Nuc-1 finden unabhängig von der Transkription statt, da durch Inhibierung der RNA Polymerase II durch  $\alpha$ -Amanitin zwar die Transkription verhindert, jedoch nicht das Nucleosomen-Remodeling unterbunden wird (Van Lint, Emiliani et al. 1996). Die Histonmethylierung im codierenden Bereich konnte dagegen mit der Aktivität von pTEFbII in Verbindung gebracht werden, da die Methylierung nach Behandlung mit Flavopiridol, einem pTEFbII-Inhibitor, geringer war (Zhou, Deng et al. 2004). Auffallend in der vorliegenden Arbeit ist jedoch, dass die trimethylierte Form des H3K4 auch ohne die Transkriptionsaktivierung durch Tat präzipitiert werden konnte, und somit Tat-unabhängig scheint. Auch Zhou *et al.* sehen die trimethylierte Form von H3K4 bereits ohne Aktivierung der Transkription, die sich durch Induktion mit TNF- $\alpha$  leicht verstärken lässt. Brinkman *et al.* zeigen in ihrer Arbeit, dass H3K4me3 zwar in Promotorbereichen gehäuft auftritt, aber nicht zwingender Weise stattfindende Transkription anzeigt (Brinkman, Roelofsen et al. 2006). Auch Schübeler *et al.* zeigen, dass die di- und trimethylierte Form von H3K4 in den selben Genen vorkommt und daher keine eindeutige Unterscheidung zwischen potenziell aktivierbaren und transkriptionell aktiven Genen gemacht werden kann (Schubeler, MacAlpine et al. 2004). Möglicherweise kommt hier der generelle Chromatinstatus des Integrationsortes zum Tragen, der auch bedeutenden Einfluss auf die Grundaktivität eines integrierten Gens nimmt (vgl. 4.6; (Jordan, Defechereux et al. 2001)). Zinner *et al.* zeigen in ihrer Arbeit, dass verschiedene Histon-Lysin-Methylierungen definierte Zonen im Kern einnehmen und H3K4me3 keine nennenswerte Überlappung mit anderen Modifikationen zeigt (Zinner, Albiez et al. 2006). Daraus könnte man schließen, dass die Histone in einem transkriptionell aktiven Chromatinbereich unabhängig von der Transkription eines einzelnen Gens modifiziert sind. Ebenso deutet die Existenz von „Insulators“ zwischen verschiedenen stark kondensierten Chromatinbereichen auf eine mögliche Grundmodifikation der Histone in Chromosomenbereichen hin (Gerasimova and Corces 2001; Labrador and Corces 2002; Felsenfeld and Groudine 2003).

### **P50 ist auch im nicht induzierten Zustand an die HIV-LTR gebunden, p65 erst nach Aktivierung**

Die ChIP-Untersuchungen der integrierten HIV-LTR zeigten, dass p50 bereits ohne Tat-Aktivierung an die LTR gebunden war, p65 erst nach Tat-Aktivierung hinzukam. Diese Daten decken sich mit der Arbeit von Williams *et al.*, nach deren Ergebnissen p50 als Homodimer

an der NF $\kappa$ B-Bindungssequenz in der HIV-LTR vorliegt und durch Rekrutierung von HDAC reprimierend wirkt. Erst durch die Aktivierung bilden sich die Heterodimere aus p50 und p65 und binden an die LTR, wo sie als prototypischer Transkriptionsfaktor agieren (Williams, Chen et al. 2006).

### **Die HIRT-Extraktion in Kombination mit ChIP**

Die generelle Anwendbarkeit einer ChIP auf extrachromosomale DNA zeigten z.B. Balakrishnan und Milavetz, die SV40-Chromatin aus infizierten Zellen von deren genomischer DNA durch einen Glycerol-Gradienten trennten und mit Histon-spezifischen Antikörpern präzipitieren konnten (Balakrishnan and Milavetz 2005). Die erfolgreiche Trennung von episomaler und genomischer DNA durch die HIRT-Extraktion konnte auch in dieser Arbeit anhand einer anschließenden PCR mit sequenzspezifischen Primern eindeutig gezeigt werden. In der Fraktion episomaler DNA war eine große Menge isolierter Indikatorgen-DNA nachzuweisen, jedoch nur eine Spur genomischer DNA, die in dieser geringen Menge keine Beeinträchtigung bzw. Verfälschung der Ergebnisse zeigen sollte. Die erfolgreiche Präzipitation von episomaler Indikatorgen-DNA gebunden an p50 zeigt auch, dass die ChIP generell auf HIRT-extrahierte DNA funktioniert.

Der einzig methodisch fragliche Faktor der HIRT-Extraktion mit anschließender ChIP stellt jedoch die Verwendung von SDS zur Zellyse dar. SDS in hoher Konzentration von 1% löst zwar nicht-kovalent gebundene Protein-Protein-Interaktionen, kann aber keine kovalenten Bindungen brechen. Vor der Zellyse werden für eine ChIP-Prozedur die Proteine mit der DNA durch eine Formaldehyd-Fixierung kovalent vernetzt. Daher sollte die kovalente Vernetzung zwischen Proteinen und DNA durch SDS nicht gelöst werden. Nach der Zellyse und HIRT-Extraktion wird der Chromatin-enhaltende Überstand jedoch mit dem Antikörper inkubiert. Dabei könnten die im Überstand enthaltenen Reste von SDS Einfluss auf die Antikörperbindung an die DNA-vernetzten Histone nehmen. Allerdings werden nach der Zellyse die Proteine und die genomische DNA, inklusive SDS, während der HIRT-Extraktion mit einem Gradientenpuffer abzentrifugiert und der Überstand bis zur Antikörperzugabe so weit verdünnt, dass bis zu diesem Schritt die SDS-Konzentration rechnerisch  $<0,1\%$  beträgt und somit keine Hinderung der Protein-Protein-Bindung darstellen dürfte. Williams *et al.* zeigen in ihren sequentiellen ChIP-Experimenten, eine Antikörper-Bindung und nachfolgende erfolgreiche Präzipitation mit rechnerisch  $0,15\%$  SDS im Ansatz (Williams, Chen et al. 2006).

### **ChIP auf HIRT-extrahierte episomale Indikatorgen-DNA**

Nachdem die saubere Trennung zwischen genomischer und episomaler DNA gezeigt werden konnte und die generelle Methode ChIP mit den verwendeten Antikörpern als

etabliert galt, wurde die ChIP-Prozedur ebenso auf die Fraktion episomaler DNA angewandt, um die generelle Bindung des Histon H3 zu untersuchen. Hierbei konnte jedoch keine DNA mit einem Antikörper gegen das Histon H3 präzipitiert werden, was gegen eine Bildung von Chromatin spricht. Durch weitere ChIP-Analysen mit Antikörpern gegen andere Histone, wie z.B. H2A, H2B oder H4, könnte diese Aussage weiter bestätigt werden.

#### 4.6.2 H3 zeigt keine Colokalisation mit dem episomalen Indikatorgen

Neben vielen anderen Methoden die Interaktion zwischen zwei Proteinen zu zeigen, stellt die Colokalisation eine weitere Möglichkeit dar, durch die räumliche Nähe zweier visualisierter möglicher Interaktions-Partner (Übersichtsartikel (Giepmans, Adams et al. 2006)), einen Anhaltspunkt für eine Interaktion zu bekommen. Da die ChIP-Ergebnisse keine Interaktion des Histon H3 mit der Indikatorgen-DNA zeigen, wurde dies auf Mikroskopie-basierter Methode ein zweites Mal untersucht, um das Ergebnis zu bestätigen oder zu widerlegen. Das episomale Indikatorgen war durch den gebundenen „Gene Tag“ als mRFP-Signal sichtbar. Das Histon H3 wurde über Expression des GFP-markierten Histons H3 visualisiert. In keiner der Zellen konnte eine Colokalisation gezeigt werden.

Janicki *et al.* verwenden in ihrem Report einen ähnlichen Ansatz, um ihr integriertes Indikatorgen auf die Modifizierung der Histone vor bzw. nach Transkriptionsaktivierung hin zu untersuchen. Die 200 Kopien des Integrats wurden durch den Lac-Repressor-YFP visualisiert und ein Antikörper spezifisch gegen H3K9me3 zur Immunfärbung verwendet. Sie zeigen in ihrer Arbeit ein spezifisches großes Signal des visualisierten Histons vor Transkriptionsaktivierung. Vergleicht man die Durchmesser der Transgen-Signale aus der Janicki- und der vorliegenden Arbeit (0,89 versus 1,17  $\mu\text{m}$ ), lässt sich vermuten, dass die Cluster an episomalem Indikatorgen in dieser Arbeit sicherlich weit mehr als 200 Kopien darstellen, wodurch zu erwarten war, dass bei Bindung von Histonen an die episomale DNA auch ein Signal zu erkennen sein sollte. (Auch hier lassen sich die gemessenen Größen nur unter Vorbehalt vergleichen, da bei Messungen aufgrund mikroskopischer Bilder die subjektive Festlegung des Grausschwellenwertes mit berücksichtigt werden muss. Dennoch fallen die Signale in eine vergleichbare Größenordnung.) Jedoch könnte auch hier die kompakte Struktur der episomalen Ansammlung ein Hindernis für die Protein-Bindung darstellen. Bei den Colokalisations-Experimenten des episomalen Indikatorgens mit der RNA Polymerase II konnte eine Colokalisation gezeigt werden, da die Polymerase II sich um das Signal des Indikatorgens sammelte, dies wahrscheinlich aber auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass Transkription an der Oberfläche von Chromatin bzw. DNA

stattfindet und das Hineindiffundieren in die episomalen Cluster nicht nötig war oder eben auch nicht möglich war. In ca. der Hälfte der Kerne war selbst eine Färbung des Episomen-Clusters mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff wie Hoechst 33342 oder DAPI nicht möglich (vgl. 4.3.2). Die fehlende Colokalisation des Histon H3 mit dem episomalen Indikatorgen gibt jedoch einen weiteren Hinweis, dass extrachromosomale nicht replizierende DNA kein Chromatin bildet.

### **Die Replikation und der zeitliche Faktor für *de novo* Nukleosomen-Bindung**

Ein weiterer Aspekt, der bei der Nukleosomenbildung nicht außer Acht gelassen werden darf, ist der zeitliche bzw. der zellzyklus-abhängige Aspekt. Die Histon-Proteine werden überwiegend nur während der S-Phase des Zellzyklus synthetisiert (Osley 1991). Die Transkription der entsprechenden Gene wird über den Zellzyklus reguliert. Eine *de novo* Chromatinbildung findet daher nur während/nach der Replikation statt. Unabhängig davon gibt es jedoch auch eine zellzyklus-unabhängige Erneuerung der Histone, bzw. der Austausch von methylierten H3-Proteinen bei der Transkriptionsaktivierung (Osley 1991; Ahmad and Henikoff 2002; Ahmad and Henikoff 2002). Die ChIP- bzw. Colokalisations-Untersuchungen wurden 42 bzw. 48 Std. nach der Transfektion gemacht und die Zellen sollten daher mindestens eine Zellteilung durchlaufen haben. Außerdem unterscheidet sich die zellzyklus-unabhängige H3-Variante H3.3 nur in vier Aminosäuren von H3 und wird daher durch den polyklonalen Antikörper gegen H3, der für die ChIP-Versuche verwendet wurde, erkannt. Dies konnte im Western Blot gezeigt werden und legt daher eine Bindung beider Histon H3-Varianten auch in der ChIP nahe (Daten nicht gezeigt). Die fehlende Bildung von Chromatin am episomalen Indikatorgen lässt einen Zusammenhang zur Replikation des Chromatins vermuten, da z.B. die DNA der humanen Herpesviren Nukleosomen bindet und somit Chromatin bildet. Die humanen Herpesviren tragen mehrere Kopien einer Sequenz, die eindeutig als Ursprung der Replikation identifiziert wurde, die durch die virale DNA-Polymerase erkannt wird und das episomal vorliegende Virusgenom autonom repliziert. Solche Ursprünge der Replikation enthält das Indikatorgen nicht. Im Falle von EBV (Epstein-Barr-Virus) übernimmt das virale Protein EBNA-1 sowohl die Interaktion mit dem ORC (origin recognition complex) als auch das Anheften an chromosomale DNA und sichert so die Replikation und Verteilung auf die Tochterzellen. Ebenso sind keine Sequenzen (z.B. S/MAR) enthalten, die es der DNA erlauben sich an die genomische DNA zu heften und so mit in die Replikation der genomischen DNA aufgenommen zu werden (Jenke, Stehle et al. 2004). Rein theoretisch kann das episomal vorliegende Indikatorgen nicht repliziert werden. Da die Replizierbarkeit ein auffälliger Unterschied zwischen dem Indikatorgen und chromatinbildenden viralen Episomen darstellt, könnte das Inserieren eines Ursprungs der Replikation von z.B. SV40 oder einer S/MAR-Sequenz in das Indikatorgen Aufschluß



darüber bringen, ob diese Plasmide dann Nukleosomen binden und eine Colokalisation mit Histonen oder Präzipitation mit Histon-Antikörpern zu beobachten wäre.

## **4.7 Die Basisaktivität der LTR**

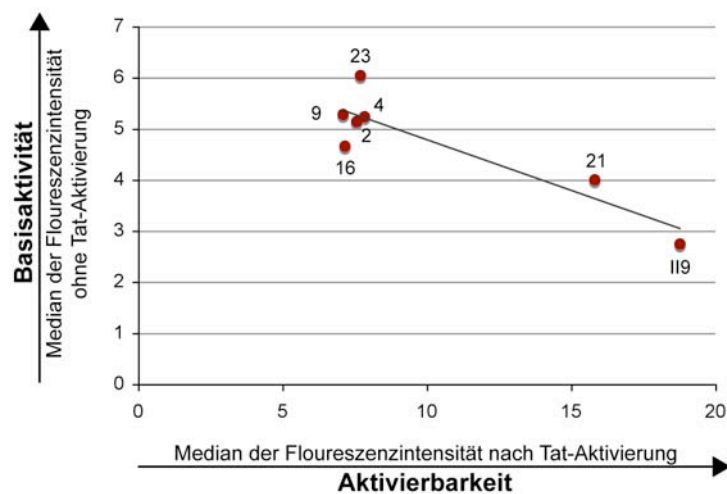
Es konnten verschiedene Einflüsse gezeigt werden, die sich auf die Basisaktivität der HIV-1 LTR auswirken. Neben zellulären Transkriptioneninhibitoren stellen sie aber überwiegend Faktoren dar, die durch das umliegende Chromatin des Integrationsorts bestimmt werden. So integriert das HIV-Provirus häufig in Alu-reiche Sequenzen, zentromerisches Heterochromatin, genarme Bereiche oder transkriptionell stark exprimierte Gene, die durch Interferenz (Greger, Demarchi et al. 1998) die Transkription beeinflussen können (Jordan, Defechereux et al. 2001; Jordan, Bisgrove et al. 2003; Pumfery, Deng et al. 2003; Lewinski, Bisgrove et al. 2005). Aber all diese Eigenschaften des Chromatins deuten auf die Repression der integrierten proviralen DNA hin, um möglicherweise einen latenten Zustand aufrecht zu erhalten.

### **4.7.1 Einfluss des Integrationslocus auf die Basisaktivität der HIV-1 LTR**

Der Einfluss auf die Basisaktivität der LTR, der in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde, stellt der Integrationslocus dar. Es wurden sieben Zelllinien etabliert, die durch zufällige Integration des Indikatorgens ins Genom dieser Zellen entstanden sind. Es ist davon auszugehen, dass sie unterschiedliche Integrationsorte aufweisen, auch wenn diese nicht für alle Zelllinien bestimmt wurden. Ein Großteil (70%) der Zelllinien zeigt eine moderate Basisaktivität und geringe Aktivierbarkeit durch die Expression des viralen Transaktivators Tat. Nur zwei Zelllinien zeigen nahezu keine Basisaktivität, dahingegen aber eine deutliche Aktivierbarkeit der Transkription durch Tat. Trägt man die Mediane der Fluoreszenzintensität vor und nach Tat-Aktivierung gegeneinander auf, kann man eine inverse Korrelation feststellen: je niedriger die Basisaktivität, desto höher die Aktivierbarkeit durch Tat (Abb. 43). Da diese Zelllinien alle die selbe parentale HeLa-Zelllinie als Ursprung haben, kann ein unterschiedlicher zellulärer Hintergrund für die unterschiedliche Basisaktivität der HIV-1 LTR ausgeschlossen werden. Viel wahrscheinlicher bestimmt der Integrationslocus, respektive der transkriptionelle Status der benachbarten Gene, und die Chromatinumgebung die Tat-unabhängige Basisaktivität.

Diese gezeigte Beobachtung deckt sich mit den Arbeiten unterschiedlicher Gruppen. So konnten z.B. West und Karn durch Klonieren eines zellulären Enhancers vor die HIV-LTR eine erhöhte Basisaktivität der LTR erlangen (West and Karn 1999). Möglicherweise rekrutiert der zelluläre Enhancer Faktoren in den Bereich der HIV-LTR und der zu transkribierenden HIV-DNA, die die Elongationsfähigkeit der RNA Polymerase II verbessern können, was in einer gesteigerten Transkriptelongation resultiert.

Rampalli *et al.* konnten durch Klonierung einer Matrix Attachment Region (MAR) eine vermehrte Basistranskription und einen synergistischen Effekt nach Tat-Aktivierung zeigen (Rampalli, Kulkarni et al. 2003).



**Abbildung 43**

**Korrelation der Tat-Aktivierbarkeit und der Basisaktivität der HIV-1 LTR.** Die Mediane der Fluoreszenzintensitäten vor und nach Tat-Aktivierung der sieben etablierten HeLa-Indi-Zelllinien sind gezeigt. Die X-Achse zeigt steigend die Fluoreszenzintensität nach Tat-Aktivierung als Zeichen der Aktivierbarkeit. Die Y-Achse zeigt steigend die Fluoreszenzintensität ohne Tat-Aktivierung als Zeichen der Basisaktivität. Die Zelllinien sind durch ihre Klon-Nummern markiert, eine Trendlinie ist gezeigt und gibt die lineare Korrelation zwischen Basisaktivität und Aktivierbarkeit an.

Auch Jordan *et al.* schreiben dem Einfluss der Chromatiumgebung den höheren Stellenwert zu, da auch sie in Zellklonen derselben Zelllinie (Jurkat) unterschiedliche Grundaktivität eines Minimal-HI-Virus mit integrierter GFP-Expression nachweisen konnten und diese somit nicht von der zelltypspezifischen Zusammensetzung der Transkriptionsfaktoren herrühren konnte. Sie zeigten jedoch, dass ca. 80% der Zellklone eine sehr niedrige Basisaktivität und nur 20% eine moderate bis hohe Aktivität zeigten. Wobei der Median der GFP-Fluoreszenzintensität der Basalaktivität in allen Zellklonen deutlich höher liegt (Mittelwert = 17,2) als die DsRed-Fluoreszenzintensität der Basalaktivität in den hier etablierten HeLa-

Indi-Zelllinien (Mittelwert = 4,5). Konform mit den hier erhaltenen Daten, stellten die Autoren auch fest, dass die Tat-Aktivierbarkeit mit der Basisaktivität invers korreliert. Je niedriger die Basisaktivität ist, desto höher ist die Tat-Induktionsrate (Jordan, Defechereux et al. 2001).

#### **4.7.2 Die Zelllinien HeLa-Indi.21 und .II9 und das episomale Indikatorgen zeigen nur auf RNA-Ebene eine Basisaktivität**

Wie unter 4.7.1 beschrieben, zeigen die hier etablierten Zelllinien und Zellen aus anderen Arbeiten eine Tat-unabhängige Basisaktivität, die durch ein Protein ausgelesen wurde. Anhand des ausgelesenen Indikatorgen-Proteins *DsRed* zeigen die Zelllinien HeLa-Indi.21, HeLa-Indi.II9 und das episomale Indikatorgen keine Basisaktivität. Auf RNA-Ebene konnten jedoch in allen drei Fällen ungespleißte Volllänge-Transkripte nachgewiesen werden, die jedoch zu keiner nachweisbaren Proteinexpression führten.

Kao *et al.* beschreiben in einer ihrer Arbeiten, dass ohne Tat nur sehr ineffizient Volllänge-Transkripte abgeschrieben werden, da die RNA Polymerase II unspezifisch nach der TAR-Region abfällt (Kao, Calman et al. 1987). In dieser Arbeit konnten in einer Real-Time-PCR Transkripte quantifiziert und für die beiden Zelllinien eine 100fach geringere Menge als Transkripte für das Protein RNA Polymerase II und für das episomale Indikatorgen sogar eine 1000fach geringere Anzahl bestimmt werden. Somit kann man auch hier von einer ineffizienten Transkription sprechen, da nach Expression von Tat, die Transkriptmenge auf das Niveau der Transkripte für die RNA Polymerase II gesteigert werden kann.

Karn *et al.* schreiben die geringe Basisaktivität der HIV-LTR ohne Tat-Expression der Tatsache zu, dass erst durch Tat Faktoren rekrutiert werden, die die RNA Polymerase II so modifizieren, dass sie die Elongationsfähigkeit zur Transkription von Volllänge-Transkripte erhält (Karn 1999). Wie gezeigt, können in diesem System bereits ohne Tat Volllänge-Transkripte nachgewiesen werden, die aber wahrscheinlich nicht modifiziert werden und damit nicht zur Expression ins Zytoplasma gelangen. Dies zeigt, dass nicht nur die gesteigerte Elongationsfähigkeit der RNA Polymerase II, sondern auch deren Auswirkungen auf die weitere Prozessierung, wie z.B. das Spleißen, wichtig sind (vgl. 4.4).

#### **4.7.3 Einfluss des Chromatins der linearen Umgebung auf die Basisaktivität der HIV-1 LTR in HeLa-Indi.II9-Zellen**

Der transkriptionelle Status bzw. die Chromatinumgebung des Integrationsorts eines Transgens spielen eine große Rolle bei dessen Basisaktivität. Der Integrationsort des Indikator-

gens konnte in der Zelllinie HeLa-Indi.II9 auf Chromosom 1q24 bestimmt werden. Chromosom 1 ist mit 243 Mbp das größte Chromosom in menschlichen Zellen und trägt die codierende Sequenz für 3141 Gene (Gregory, Barlow et al. 2006). Die Integration erfolgte in das erste Intron bzw. untranslatierten Bereich des RAB GTPase activating protein 1-like (RABGAP-1L) Gens. Für dieses Gen ist die Expression bisher nur in hematopoetischen Zellen, in Herz und Leber beschrieben (Accession Number NM\_014857). In dem hier verwendeten HeLa-Zellsystem konnte jedoch auf RNA-Ebene eine schwache, aber nachweisbare Expression beobachtet werden. Bei einer quantitativen PCR zeigten die Transkripte von RABGAP-1L im Mittel einen CT-Wert von 29,0 im Gegensatz zu RPII mit 19,9. Das in HeLa-Zellen nicht exprimierte Gen hGFAP zeigte einen CT-Wert von >34. Wobei auch die Transkriptzahl von RABGAP-1L zum distalen Ende hin abnahm und einen CT-Wert von 34 erreichte. Daraus kann man möglicherweise schließen, dass zwar Transkripte geschrieben werden, aber wenige/keine Volllänge-Transkripte entstehen und möglicherweise daher auch kein Protein in den Zellen nachweisbar wäre. Das Chromosom 1 zählt zu den genreicheren Chromosomen des menschlichen Genoms, mit 3141 Genen in 225 Mb (euchromatische Fraktion) befinden sich durchschnittlich 14 Gene in 1 Mb (Gregory, Barlow et al. 2006). Die Chromatinumgebung dieses speziellen Integrationsorts zeigt eine durchschnittliche Gendichte. In der unmittelbar Nähe finden sich in einem 10 Mb Fenster um den Integrationsort 96, in einem 2 Mb Fenster 28 Gensequenzen, von denen das RABGAP-1L in diesen Zellen kaum exprimiert wird. Durch diesen speziellen Integrationsort kann man die geringe, aber dennoch vorhandene Basisaktivität des Indikatorgens erklären, zumal das RABGAP-1L Gen auch nur schwach transkribiert wird, und der generelle Transkriptionsstatus des Chromatins nicht auf starke Transkription, z.B. durch Hyperacetylierung der Nukleosomen, eingestellt sein sollte.

#### **4.7.4 Einfluss der transkriptionellen Aktivierung der HIV-1 LTR durch Tat auf das linear benachbarte Gen in HeLa-Indi.II9-Zellen**

Da das Chromatin und der transkriptionelle Status eines benachbarten Gens Einfluss auf die Transkription eines integrierten Transgens nimmt, wurde im Gegenzug der Einfluss der transkriptionellen Aktivierung des Transgens auf das linear benachbarte zelluläre Gen untersucht. Bei der Untersuchung der Transkription des RABGAP-1L Gens in der Zelllinie HeLa-Indi.II9 konnte nach Co-Expression von Tat auf RNA-Ebene jedoch keine Aktivierung festgestellt werden (Daten sind im Anhang 8.1.2 zu finden). Für diesen speziellen Locus kann für dieses Gen zumindest gesagt werden, dass die Chromatinöffnung eine Folge der transkriptionellen Aktivierung des Indikatorgens darstellt, aber keine auslösende Funktion auf

die Transkription des linear benachbarten Gens RABGAP-1L zeigt. Dies kann nicht als generell gültige Aussage getroffen werden, da in diesem Fall das benachbarte Gen fast keine Aktivität besitzt und möglicherweise durch epigenetische Mechanismen, wie DNA-Methylierung oder posttranslationale Histonmodifikationen in einem inaktiven Zustand gehalten wird, der nicht durch pure Dekondensation des Chromatins, sondern das Vorkommen von Demethylasen erfordern würde, um einen transkriptionell aktiven Zustand zu erlangen. Möglicherweise könnte sich die transkriptionelle Aktivität eines Gens, das sich sozusagen in einem „bereit“-Zustand befindet und nicht epigenetisch reprimiert ist durch Chromatin-Dekondensation verändern.

#### **4.7.5 Die Integrationsorte der Zelllinien HeLa-Indi.4 und HeLa-Indi.21 konnten nicht bestimmt werden**

Bei der Integration viraler DNA nach einer Infektion, wird die lineare DNA gezielt in das Wirtsgenom integriert und weist daher nach der Integration definierte 5'- und 3'-Enden auf. Im Falle von HIV flankieren die beiden LTRs die virale Sequenz. Bei der zufälligen Integration von extrachromosomaler DNA, wie transfizierte Plasmid-DNA, bricht diese irgendwo und integriert per Zufall in die genomische DNA.

Zur Bestimmung der zufällig entstanden Integrationsorte der Plasmid-DNA muss zuerst durch analytische PCRs der Bruchpunkt des Indikatorgens, der bei der Integration in die genomische DNA entstehen muss, bestimmt werden.

Für die Zelllinie HeLa-Indi.4 ließ sich dieser nicht eindeutig festlegen, da diese Zelllinie zwei Integrationsorte im Southern Blot zeigte und somit die überlappenden PCR-Fragmente von zwei Templates entstehen können und ein fehlendes Amplifikat, das auf einen Bruchpunkt hinweisen würde, durch das möglicherweise nicht an dieser Stelle gebrochene zweite Template überdeckt werden würde.

In der Zelllinie HeLa-Indi.21 ließ sich zwar dieser entstandene Bruchpunkt identifizieren, aber dennoch nicht der Integrationsort bestimmen. Zwei Möglichkeiten dafür bestehen in der Sequenz des Integrationsortes. Sollte das Indikatorgen in eine repetitiv-reiche Sequenz integriert sein, könnten zum einen sonst homogen verteilte Restriktionsschnittstellen fehlen, zum anderen könnte die Polymerase Schwierigkeiten haben diese zu amplifizieren. Da sämtliche Methoden zur Bestimmung der Integrationsorte auf Schneiden der genomischen DNA und PCR basieren, war es daher vielleicht mit den unterschiedlich getesteten Methoden nicht möglich, ein Amplifikat der flankierenden genomischen Sequenz zu erhalten. In der Transkriptions-Analyse des Klons HeLa-Indi.21 konnte gezeigt werden, dass dieser ohne Tat

keine Basisaktivität besitzt, sich aber deutlich mit Tat induzieren lässt. Diese Eigenschaft zeigen auch Gene, die in Heterochromatin bzw. centromerisches Heterochromatin integriert sind. Für die Integration von HIV-1 konnte ebenso eine Neigung zur Integration in solche Chromatinbereiche gezeigt werden und darüber hinaus, dass diese Klone keine Basisaktivität besaßen, sich aber stark induzieren ließen (Jordan, Defechereux et al. 2001; Jordan, Bisgrove et al. 2003; Lewinski, Bisgrove et al. 2005). Dies spricht möglicherweise für die Integration des Indikatorgens in HeLa-Indi.21 in centromerisches Heterochromatin.

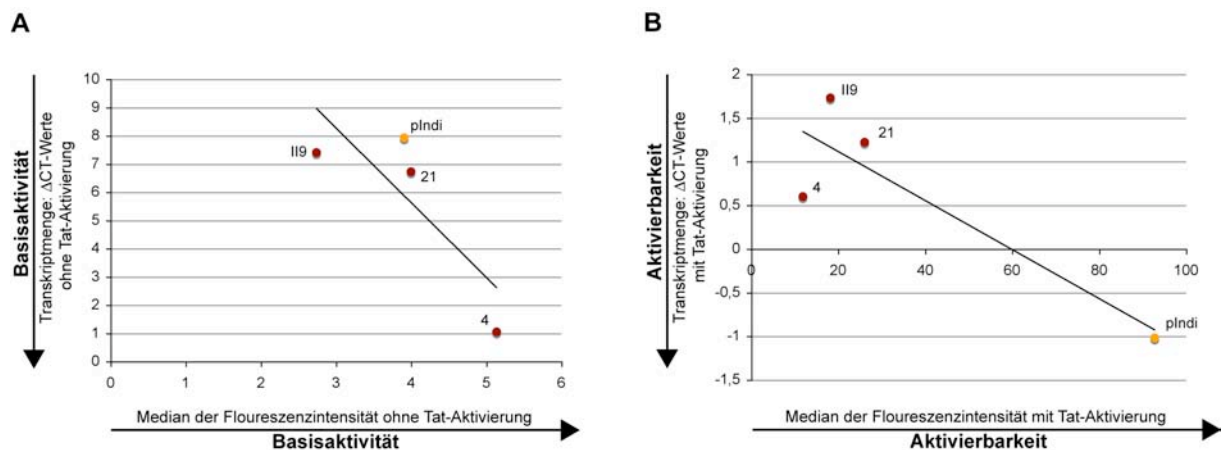
## 4.8 Das episomale und integrierte Indikatorgen im Vergleich

Sieht man von der Tatsache ab, dass die episomalen Cluster des GePS durch die Vielzahl der Kopien im Gegensatz zum solitären integrierten Indikatorgen visualisiert werden können, unterscheiden sich das episomale und stabil integrierte Indikatorgen nur in einem Punkt. Die Differenz in ihrem Expressionsverhalten liegt in der Transkriptionsaktivierbarkeit, die durch den strukturellen Unterschied der beiden Indikatorgen-Stati erklärt werden kann. In Abbildung 44 sind die Mediane der Fluoreszenzintensitäten des Reporterproteins *DsRed* gegen die  $\Delta$ CT-Werte der LightCycler-Transkriptquantifizierung ohne und mit Transkriptionsaktivierung durch Tat aufgetragen (Daten siehe Ergebnisteil). Die Basisaktivität des episomalen Indikatorgens ist genauso gering, wie die der zwei Zelllinien HeLa-Indi.21 und HeLa-Indi.II9, sowohl auf Protein- wie auch auf RNA-Ebene. Das episomale Indikatorgen zeigt sogar eine marginal geringere Basisaktivität auf RNA-Ebene als die Zelllinien (Abb. 44A). Aber beide zu vergleichende Komponenten zeigen auf Proteinebene keine Basisexpression, auch wenn in beiden Fällen nachweisbare Mengen an Reporter-RNA vorhanden sind. Auch bei der Prozessierung der RNA konnten keine Unterschiede erkannt werden. Sowohl die episomal als auch die integrierte Indikatorgen-RNA werden durch endogene Spleißfaktoren prozessiert, sobald Tat in den Zellen zugegen war. Ohne Tat entstanden zum größten Teil ungespleißte Transkripte.

Ein Unterschied zeigt sich jedoch deutlich in der Aktivierbarkeit des Indikatorgens. Die Zellen des episomale Indikatorgens zeigen einen deutlich höheren Median an Fluoreszenzintensität, das sich auch in der quantifizierten Transkriptmenge widerspiegelt (Abb. 44B).

Da die Anzahl an positiven Zellen an sich nach der Transfektion geringer als die der Zelllinien war, ist diese stärkere Aktivierbarkeit auf eine höhere Transkriptionsrate in den einzelnen Zellen zurück zu führen. Diese erhöhte Transkription kann nun zum einen durch eine höhere Anzahl an Indikatorgen-Kopien in den transient transfizierten Zellen erklärt

werden, zum anderen aber auch durch die fehlende Chromatinstruktur des episomalen Indikatorgens. Dass das episomale Indikatorgen keine Histone bindet und somit kein Chromatin bildet, könnte eine Erklärung für die gesteigerte Transkription sein, da mehrfach gezeigt wurde, dass nukleosomen-freie DNA *in vitro* stärker transkribiert wird als nukleosomen-gebundene (Pazin, Sheridan et al. 1996; Steger, Eberharter et al. 1998). Ebenso wurde schon für die HIV-1 LTR gezeigt, dass sie als nackte DNA eine sehr starke Promotoraktivität verfügt, die erst durch Integration ins Wirtsgenom und die Ausbildung von Chromatin gemindert wird (Jordan, Defechereux et al. 2001; He, Ylisastigui et al. 2002).



**Abbildung 44**

Das episomale Indikatorgen lässt sich deutlich stärker induzieren. Korrelation der Fluoreszenzintensitäten (Protein) und der Transkriptmenge (RNA) vor und nach Tat-Aktivierung. Die Mediane der Fluoreszenzintensitäten und die  $\Delta$ CT-Werte vor und nach Tat-Aktivierung von HeLa-Indi.4, .21 und .II9 und dem episomalen Indikatorgen pIIndi sind gezeigt. Die X-Achse zeigt die Fluoreszenzintensitäten: nach rechts die steigende Proteinmenge. Die Y-Achse zeigt die  $\Delta$ CT-Werte: nach unten steigende Transkriptmenge. Die Zelllinien sind durch ihre Klon-Nummern markiert, das episomale Indikatorgen durch pIIndi. **A)** Vor Tat-Aktivierung als Zeichen der Basisaktivität. **B)** Nach Tat-Aktivierung als Zeichen der Aktivierbarkeit.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich das episomale Indikatorgen, obwohl es - oder gerade weil es - im Interchromatin-Bereich lokalisiert und kein Chromatin bildet, genauso wie das integrierte Indikatorgen prozessiert wird, aber deutlich stärker nach Expression von Tat transkribiert wird.

## 4.9 Ausblick

Obwohl es nicht möglich war, ein einzelnes Transgen während seiner Transkriptionsaktivierung positionell durch das Lac-Operator/Lac-Repressor-GFP-System in lebenden Zellen beobachten zu können, konnte ein prinzipiell funktionierendes Indikatorsystem etabliert werden. Es konnte die spezifische Induktion der Transkription, die durch das Reporterprotein sicher detektiert werden konnte, und die Expression von Fluoreszenzmarkierten Proteinen zur Markierung einer Referenzstruktur im Kern gezeigt werden. Durch die erlangten Erkenntnisse während dieser Arbeit, kann durch einige gezielte Änderungen möglicherweise eine geringe Anzahl an integrierten Indikatorgen visualisiert werden. Die Klonierung von 256 Operatorsequenzen in das Indikatorgenplasmid würde zumindest die Möglichkeit bieten, eventuell eine Anzahl von weniger als fünf Integraten zu visualisieren. Durch einen Austausch der 3'-LTR gegen ein anderes PolyA-Signal können möglicherweise die Klonierungshindernisse, die durch diese zusätzlichen repetitiven, retroviralen Sequenzen zustande kommen, überwunden werden. Auch die Wahl der Zelllinie sollte nochmals überdacht werden und eine Zelllinie gewählt werden, die einen homogeneren Lac-Repressor-GFP-Hintergrund zeigt, aber auch HIV-permissiv ist.

Das episomale Indikatorgen jedoch konnte in lebenden Zellen visualisiert und in Bezug auf zirkuläre Struktur, Lokalisation im Interchromatinbereich, Transkription und Proteinexpression mit Daten aus der Literatur über nicht integrierte HIV-DNA verglichen werden. Die gefundenen Übereinstimmungen zeigen das episomale Indikatorgen als relevant genug auf, um topologische Untersuchungen des episomalen Indikatorgens als Hinweise für nicht integrierte HIV-DNA zu übernehmen. Positionelle Veränderungen bei der Tat-Aktivierung werden bereits von Claudia Weierich in Relation zu verschiedenen Kernkomponenten hin untersucht (Weierich, in Vorbereitung).

Bei den Untersuchungen der Transkriptionsaktivierung der HIV-LTR auf RNA-Ebene konnten Hinweise auf die wichtige Rolle der aktivierten Form der RNA Polymerase II gefunden werden. So konnte in Zellen, die mit dem Indikatorgen transient oder stabil transfiziert waren, zum einen eine geringe Tat-unabhängige Basisaktivität der HIV-LTR detektiert werden. Diese resultierte zwar in Volllänge-Transkripten, aber keiner nachweisbaren Proteinexpression. Zum anderen konnte co-transkriptionelles Spleißen nachgewiesen werden. Beide Vorgänge hängen vermutlich an sich und daher stark mit der Prozessivität der RNA Polymerase II zusammen, die im Falle der HIV-LTR durch das virale Protein Tat erlangt wird. Diese Erkenntnisse sollten in einem System, das zusätzlich zu der HIV-1 LTR auch virale Spleißstellen und das RRE enthält, verifiziert und weiter untersucht werden. Die Analyse an



HIV-infizierten Zellen würde dafür die optimalen Bedingungen schaffen. Darüber hinaus könnte der Vergleich der Genexpression mit nicht integrierter HIV-DNA und deren Chromatinzusammensetzung mit Hilfe eines Integrase-defizienten Virus, wie z.B. HIV (IN E152A), erfolgen. Dadurch könnte man weitere Erkenntnisse über die episomale HIV-DNA, deren Funktion im Lebenszyklus des Virus und deren Einfluss auf die Wirtszelle erlangen.

## 5 Zusammenfassung

Erkenntnisse zur funktionalen Zellkernarchitektur wurden bisher überwiegend an fixierten Zellen durch *in situ* Methoden erlangt. Durch Etablierung eines Lebendzell-Systems sollte überprüft werden, ob es möglich ist, ein einzelnes Transgen auf DNA-Ebene zu visualisieren und es bei seiner transkriptionellen Aktivierung zu beobachten.

Das hier entwickelte „Gene Positioning System“ (GePS) nutzt das Lac-Operator/Lac-Repressor-GFP-System („Gene Tag“) als visualisierende Komponente, um das Indikatorgen auf DNA-Ebene sichtbar zu machen. Das Indikatorgen selbst basiert auf der induzierbaren Transkriptionseinheit von HIV-1, die spezifisch durch das virale Protein Tat aktiviert werden kann und die Transkription eines Reportergens (*DsRed*) kontrolliert.

Im transient transfizierten Status konnte das Indikatorgen als Episom durch Bindung des „Gene Tags“ als punktförmiges Signal im Kern detektiert werden. In den etablierten und charakterisierten Zelllinien HeLa-Indi war dies durch Bindung des „Gene Tags“ an 64 Lac-Repressor-Bindungsstellen eines einzelnen Transgens nicht möglich.

Die Etablierung der stabilen Zelllinien und die transiente Expression ermöglichten einen direkten Vergleich der Transkription von der integrierten und episomalen HIV-1 LTR. In beiden Fällen konnte eine spezifische Transkriptionsaktivierung durch Tat auf Protein- und RNA-Ebene beobachtet werden. Auch eine Tat-unabhängige Basisaktivität in Form von Volllänge-Transkripten konnte immer nachgewiesen werden, die in verschiedenen Zelllinien und dem episomalen Indikatorgen aber zu keiner nachweisbaren Proteinexpression führte. Die induzierte Expression des Indikatorgens des „GePS“ konnte darüber hinaus in wichtigen HIV-1 Zielzellen (CD4 positive Lymphozyten) gezeigt werden.

Des Weiteren konnten Erkenntnisse über die Tat-induzierte, von der HIV-1 LTR ausgehende Transkription und der Zusammenhang zum Spleißen gewonnen werden. Durch quantitative PCR wurde deutlich, dass sowohl im episomalen als auch integrierten Status erst durch die gesteigerte Transkription das Spleißen der Indikatorgen-RNA induziert wird, das Spleißen also co-transkriptionell stattfindet. Tat selbst spielt bei der Rekrutierung von Spleißfaktoren nur eine indirekte Rolle, da durch die transkriptionsdefiziente Mutante Tat(K41A) kein Spleißen initiiert wird.

Durch verschiedene methodische Ansätze wurde versucht, die Frage der Chromatinzusammensetzung von nicht replizierenden Episomen in menschlichen Zellen zu beantworten. Weder durch eine Kollisions-Untersuchung noch eine Chromatin IP konnte jedoch eine spezifische Assoziation des episomalen Indikatorgens mit dem Histon H3

nachgewiesen werden. Eine Bindung von Proteinen an die Episomen konnte am Beispiel von p50, einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, gezeigt werden.

Für die produktive Replikation der Retroviren ist die Integration der proviralen DNA ins Genom der Wirtszelle nötig, jedoch konnte für HIV gezeigt werden, dass nicht integrierte zirkuläre HIV-DNA in sich nicht teilenden Zellen persistiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Vermutung, dass nicht integrierte retrovirale DNA transkribiert werden kann und dadurch die exprimierten Proteine Bedeutung für den Lebenszyklus von HIV und durch ihre Persistenz Einfluss auf die Wirtszellen haben können.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

- Adkins, N. L., M. Watts, et al. (2004). "To the 30-nm chromatin fiber and beyond." *Biochim Biophys Acta* **1677**(1-3): 12-23.
- Ahmad, K. and S. Henikoff (2002). "Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99 Suppl 4**: 16477-84.
- Ahmad, K. and S. Henikoff (2002). "The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly." *Mol Cell* **9**(6): 1191-200.
- Albiez, H., M. Cremer, et al. (2006). "Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks." *Chromosome Res in press*.
- Albini, A., R. Benelli, et al. (1996). "HIV-tat protein is a heparin-binding angiogenic growth factor." *Oncogene* **12**(2): 289-97.
- Askjaer, P., T. H. Jensen, et al. (1998). "The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP." *J Biol Chem* **273**(50): 33414-22.
- Aten, J. A. and R. Kanaar (2006). "Chromosomal organization: mingling with the neighbors." *PLoS Biol* **4**(5): e155.
- Baird, G. S., D. A. Zacharias, et al. (2000). "Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22): 11984-9.
- Balakrishnan, L. and B. Milavetz (2005). "Programmed remodeling of hyperacetylated histone H4 and H3 organization on the SV40 genome during lytic infection." *Virology* **334**(1): 111-23.
- Bartova, E. and S. Kozubek (2006). "Nuclear architecture in the light of gene expression and cell differentiation studies." *Biol Cell* **98**(6): 323-36.
- Beisel, C., A. Imhof, et al. (2002). "Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1." *Nature* **419**(6909): 857-62.
- Bell, P., L. J. Montaner, et al. (2001). "Accumulation and intranuclear distribution of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA." *J Virol* **75**(16): 7683-91.
- Belmont, A. S. (2001). "Visualizing chromosome dynamics with GFP." *Trends Cell Biol* **11**(6): 250-7.
- Belmont, A. S. and K. Bruce (1994). "Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure." *J Cell Biol* **127**(2): 287-302.
- Belmont, A. S., S. Dietzel, et al. (1999). "Large-scale chromatin structure and function." *Curr Opin Cell Biol* **11**(3): 307-11.
- Benelli, R., A. Barbero, et al. (2000). "Human immunodeficiency virus transactivator protein (Tat) stimulates chemotaxis, calcium mobilization, and activation of human polymorphonuclear leukocytes: implications for Tat-mediated pathogenesis." *J Infect Dis* **182**(6): 1643-51.
- Bentley, D. (2002). "The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory." *Curr Opin Cell Biol* **14**(3): 336-42.
- Berro, R., K. Kehn, et al. (2006). "Acetylated Tat regulates human immunodeficiency virus type 1 splicing through its interaction with the splicing regulator p32." *J Virol* **80**(7): 3189-204.
- Berthold, E. and F. Maldarelli (1996). "cis-acting elements in human immunodeficiency virus type 1 RNAs direct viral transcripts to distinct intranuclear locations." *J Virol* **70**(7): 4667-82.
- Binnie, A., P. Castelo-Branco, et al. (2006). "Homologous gene sequences mediate transcription-domain formation." *J Cell Sci* **119**(Pt 18): 3876-87.
- Bird, A. (2001). "Molecular biology. Methylation talk between histones and DNA." *Science* **294**(5549): 2113-5.
- Black, D. L. (2003). "Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing." *Annu Rev Biochem* **72**: 291-336.
- Bolzer, A., G. Kreth, et al. (2005). "Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes." *PLoS Biol* **3**(5): e157.
- Boue, S., I. Letunic, et al. (2003). "Alternative splicing and evolution." *Bioessays* **25**(11): 1031-4.
- Brake, D. A., C. Debouck, et al. (1990). "Identification of an Arg-Gly-Asp (RGD) cell adhesion site in human immunodeficiency virus type 1 transactivation protein, tat." *J Cell Biol* **111**(3): 1275-81.
- Branco, M. R. and A. Pombo (2006). "Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations." *PLoS Biol* **4**(5): e138.
- Bres, V., N. Gomes, et al. (2005). "A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat." *Genes Dev* **19**(10): 1211-26.

- Bridger, J. M., H. Herrmann, et al. (1998). "Identification of an interchromosomal compartment by polymerization of nuclear-targeted vimentin." *J Cell Sci* **111** ( Pt 9): 1241-53.
- Brigati, C., M. Giacca, et al. (2003). "HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression." *FEMS Microbiol Lett* **220**(1): 57-65.
- Brinkman, A. B., T. Roelofsen, et al. (2006). "Histone modification patterns associated with the human X chromosome." *EMBO Rep* **7**(6): 628-34.
- Brown, K. E., J. Baxter, et al. (1999). "Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division." *Mol Cell* **3**(2): 207-17.
- Brussel, A. and P. Sonigo (2004). "Evidence for gene expression by unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA species." *J Virol* **78**(20): 11263-71.
- Butler, S. L., M. S. Hansen, et al. (2001). "A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo." *Nat Med* **7**(5): 631-4.
- Butler, S. L., E. P. Johnson, et al. (2002). "Human immunodeficiency virus cDNA metabolism: notable stability of two-long terminal repeat circles." *J Virol* **76**(8): 3739-47.
- Cabal, G. G., A. Genovesio, et al. (2006). "SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope." *Nature* **441**(7094): 770-3.
- Campbell, R. E., O. Tour, et al. (2002). "A monomeric red fluorescent protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 7877-82.
- Cara, A., A. Cereseto, et al. (1996). "HIV-1 protein expression from synthetic circles of DNA mimicking the extrachromosomal forms of viral DNA." *J Biol Chem* **271**(10): 5393-7.
- Cara, A. and M. S. Reitz, Jr. (1997). "New insight on the role of extrachromosomal retroviral DNA." *Leukemia* **11**(9): 1395-9.
- Chambeyron, S., N. R. Da Silva, et al. (2005). "Nuclear re-organisation of the Hoxb complex during mouse embryonic development." *Development* **132**(9): 2215-23.
- Chang, H. C., F. Samaniego, et al. (1997). "HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region." *Aids* **11**(12): 1421-31.
- Chen, C. Y. and A. B. Shyu (1995). "AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation." *Trends Biochem Sci* **20**(11): 465-70.
- Chen, J. and K. S. Matthews (1992). "Deletion of lactose repressor carboxyl-terminal domain affects tetramer formation." *J Biol Chem* **267**(20): 13843-50.
- Chudakov, D. M., S. Lukyanov, et al. (2005). "Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging." *Trends Biotechnol* **23**(12): 605-13.
- Chun, T. W., L. Carruth, et al. (1997). "Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection." *Nature* **387**(6629): 183-8.
- Cmarko, D., P. J. Verschure, et al. (1999). "Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection." *Mol Biol Cell* **10**(1): 211-23.
- Col, E., C. Caron, et al. (2001). "The histone acetyltransferase, hGCN5, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat." *J Biol Chem* **276**(30): 28179-84.
- Cremer, M., K. Kupper, et al. (2003). "Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei." *J Cell Biol* **162**(5): 809-20.
- Cremer, T. (1985). *Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie*, Springer Verlag.
- Cremer, T. and C. Cremer (2001). "Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells." *Nat Rev Genet* **2**(4): 292-301.
- Cremer, T., C. Cremer, et al. (1982). "Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments." *Hum Genet* **60**(1): 46-56.
- Cremer, T., M. Cremer, et al. (2006). "Chromosome territories - a functional nuclear landscape." *Curr Opin Cell Biol* **18**(3): 307-16.
- Cremer, T., G. Kreth, et al. (2000). "Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**(2): 179-212.
- Cremer, T., K. Kupper, et al. (2004). "Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function." *Biol Cell* **96**(8): 555-67.
- Cremer, T., A. Kurz, et al. (1993). "Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**: 777-92.
- Cremer, T., P. Lichter, et al. (1988). "Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes." *Hum Genet* **80**(3): 235-46.
- Csink, A. K. and S. Henikoff (1996). "Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in Drosophila." *Nature* **381**(6582): 529-31.

- Cullen, B. R. (2003). "Nuclear mRNA export: insights from virology." *Trends Biochem Sci* **28**(8): 419-24.
- Czermin, B., R. Melfi, et al. (2002). "Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites." *Cell* **111**(2): 185-96.
- Daigle, N., J. Beaudouin, et al. (2001). "Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells." *J Cell Biol* **154**(1): 71-84.
- Dandekar, D. H., K. N. Ganesh, et al. (2004). "HIV-1 Tat directly binds to NFkappaB enhancer sequence: role in viral and cellular gene expression." *Nucleic Acids Res* **32**(4): 1270-8.
- de Paulis, A., R. De Palma, et al. (2000). "Tat protein is an HIV-1-encoded beta-chemokine homolog that promotes migration and up-regulates CCR3 expression on human Fc epsilon RI+ cells." *J Immunol* **165**(12): 7171-9.
- Deng, L., C. de la Fuente, et al. (2000). "Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones." *Virology* **277**(2): 278-95.
- Deng, L., D. Wang, et al. (2001). "Enhancement of the p300 HAT activity by HIV-1 Tat on chromatin DNA." *Virology* **289**(2): 312-26.
- Dernburg, A. F., K. W. Broman, et al. (1996). "Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions." *Cell* **85**(5): 745-59.
- Dietzel, S., A. Jauch, et al. (1998). "Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei." *Chromosome Res* **6**(1): 25-33.
- Dietzel, S., K. Zolghadr, et al. (2004). "Differential large-scale chromatin compaction and intranuclear positioning of transcribed versus non-transcribed transgene arrays containing beta-globin regulatory sequences." *J Cell Sci* **117**(Pt 19): 4603-14.
- Dundr, M. and T. Misteli (2001). "Functional architecture in the cell nucleus." *Biochem J* **356**(Pt 2): 297-310.
- Earnshaw, W. C., H. Ratrie, 3rd, et al. (1989). "Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on a stable dicentric chromosome in cytological spreads." *Chromosoma* **98**(1): 1-12.
- Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, et al. (1982). "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells." *Nucleic Acids Res* **10**(8): 2709-21.
- El Kharroubi, A., G. Piras, et al. (1998). "Transcriptional activation of the integrated chromatin-associated human immunodeficiency virus type 1 promoter." *Mol Cell Biol* **18**(5): 2535-44.
- Ellenberg, J. and J. Lippincott-Schwartz (1999). "Dynamics and mobility of nuclear envelope proteins in interphase and mitotic cells revealed by green fluorescent protein chimeras." *Methods* **19**(3): 362-72.
- Engelman, A., G. Englund, et al. (1995). "Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication." *J Virol* **69**(5): 2729-36.
- Fakan, S. (2004). "The functional architecture of the nucleus as analysed by ultrastructural cytochemistry." *Histochem Cell Biol* **122**(2): 83-93.
- Fakan, S. and W. Bernhard (1971). "Localisation of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography." *Exp Cell Res* **67**(1): 129-41.
- Farnet, C. M. and W. A. Haseltine (1991). "Circularization of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro." *J Virol* **65**(12): 6942-52.
- Faustino, N. A. and T. A. Cooper (2003). "Pre-mRNA splicing and human disease." *Genes Dev* **17**(4): 419-37.
- Felber, B. K., C. M. Drysdale, et al. (1990). "Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein." *J Virol* **64**(8): 3734-41.
- Felber, B. K., M. Hadzopoulou-Cladaras, et al. (1989). "rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(5): 1495-9.
- Felsenfeld, G. and M. Groudine (2003). "Controlling the double helix." *Nature* **421**(6921): 448-53.
- Fieck, A., D. L. Wyborski, et al. (1992). "Modifications of the E.coli Lac repressor for expression in eukaryotic cells: effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation." *Nucleic Acids Res* **20**(7): 1785-91.
- Fischle, W., V. Kiermer, et al. (2001). "The emerging role of class II histone deacetylases." *Biochem Cell Biol* **79**(3): 337-48.
- Fong, Y. W. and Q. Zhou (2001). "Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation." *Nature* **414**(6866): 929-33.
- Fortin, J. F., C. Barat, et al. (2004). "Hyper-responsiveness to stimulation of human immunodeficiency virus-infected CD4+ T cells requires Nef and Tat virus gene products and results from higher NFAT, NF-kappaB, and AP-1 induction." *J Biol Chem* **279**(38): 39520-31.
- Foster, H. A. and J. M. Bridger (2005). "The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture." *Chromosoma* **114**(4): 212-29.

- Frankel, A. D. and C. O. Pabo (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." *Cell* **55**(6): 1189-93.
- Frankel, A. D. and J. A. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." *Annu Rev Biochem* **67**: 1-25.
- Freed, E. O. (2001). "HIV-1 replication." *Somat Cell Mol Genet* **26**(1-6): 13-33.
- Fu, X. D. (1995). "The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors." *Rna* **1**(7): 663-80.
- Fuchs, J., A. Lorenz, et al. (2002). "Chromosome associations in budding yeast caused by integrated tandemly repeated transgenes." *J Cell Sci* **115**(Pt 6): 1213-20.
- Garcia, J. A., D. Harrich, et al. (1988). "Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat." *Embo J* **7**(10): 3143-7.
- Garcia-Martinez, L. F., D. Ivanov, et al. (1997). "Association of Tat with purified HIV-1 and HIV-2 transcription preinitiation complexes." *J Biol Chem* **272**(11): 6951-8.
- Gasser, S. M. (2002). "Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei." *Science* **296**(5572): 1412-6.
- Gaynor, R. (1992). "Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression." *Aids* **6**(4): 347-63.
- Geiman, T. M., U. T. Sankpal, et al. (2004). "DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system." *Biochem Biophys Res Commun* **318**(2): 544-55.
- Georgel, P. T., T. M. Fletcher, et al. (2003). "Formation of higher-order secondary and tertiary chromatin structures by genomic mouse mammary tumor virus promoters." *Genes Dev* **17**(13): 1617-29.
- Gerasimova, T. I. and V. G. Corces (2001). "Chromatin insulators and boundaries: effects on transcription and nuclear organization." *Annu Rev Genet* **35**: 193-208.
- Gerber, M. and A. Shilatifard (2003). "Transcriptional elongation by RNA polymerase II and histone methylation." *J Biol Chem* **278**(29): 26303-6.
- Giacca, M., M. I. Gutierrez, et al. (1992). "A human binding site for transcription factor USF/MLTF mimics the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1." *Virology* **186**(1): 133-47.
- Giepmans, B. N., S. R. Adams, et al. (2006). "The fluorescent toolbox for assessing protein location and function." *Science* **312**(5771): 217-24.
- Gilbert, N., S. Boyle, et al. (2004). "Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers." *Cell* **118**(5): 555-66.
- Gilbert, N., S. Gilchrist, et al. (2005). "Chromatin organization in the mammalian nucleus." *Int Rev Cytol* **242**: 283-336.
- Gilbert, N. and B. Ramsahoye (2005). "The relationship between chromatin structure and transcriptional activity in mammalian genomes." *Brief Funct Genomic Proteomic* **4**(2): 129-42.
- Gillim-Ross, L., A. Cara, et al. (2005). "HIV-1 extrachromosomal 2-LTR circular DNA is long-lived in human macrophages." *Viral Immunol* **18**(1): 190-6.
- Graveley, B. R. (2000). "Sorting out the complexity of SR protein functions." *Rna* **6**(9): 1197-211.
- Graveley, B. R. (2001). "Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world." *Trends Genet* **17**(2): 100-7.
- Greger, I. H., F. Demarchi, et al. (1998). "Transcriptional interference perturbs the binding of Sp1 to the HIV-1 promoter." *Nucleic Acids Res* **26**(5): 1294-301.
- Gregory, S. G., K. F. Barlow, et al. (2006). "The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1." *Nature* **441**(7091): 315-21.
- Hauber, J., A. Perkins, et al. (1987). "Trans-activation of human immunodeficiency virus gene expression is mediated by nuclear events." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(18): 6364-8.
- He, G., L. Ylisastigui, et al. (2002). "The regulation of HIV-1 gene expression: the emerging role of chromatin." *DNA Cell Biol* **21**(10): 697-705.
- Helland, D. E., J. L. Welles, et al. (1991). "Transcellular transactivation by the human immunodeficiency virus type 1 tat protein." *J Virol* **65**(8): 4547-9.
- Hirsch, I., B. Spire, et al. (1990). "Differences in replication and cytopathogenicity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) are not determined by long terminal repeats (LTR)." *Virology* **177**(2): 759-63.
- IHGSC, I. H. G. S. C. (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." *Nature* **431**(7011): 931-45.
- Jacquet, S., D. Decimo, et al. (2005). "Dual effect of the SR proteins ASF/SF2, SC35 and 9G8 on HIV-1 RNA splicing and virion production." *Retrovirology* **2**(1): 33.
- Jacquet, S., D. Ropers, et al. (2001). "Conserved stem-loop structures in the HIV-1 RNA region containing the A3 3' splice site and its cis-regulatory element: possible involvement in RNA splicing." *Nucleic Acids Res* **29**(2): 464-78.

- Janeway, C. and P. Travers (1997). *Immunologie*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Janicki, S. M., T. Tsukamoto, et al. (2004). "From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells." *Cell* **116**(5): 683-98.
- Jeang, K. T., Y. Chang, et al. (1991). "Regulation of HIV expression: mechanisms of action of Tat and Rev." *Aids* **5 Suppl 2**: S3-14.
- Jeang, K. T., H. Xiao, et al. (1999). "Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat." *J Biol Chem* **274**(41): 28837-40.
- Jenke, A. C., I. M. Stehle, et al. (2004). "Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(31): 11322-7.
- Jones, K. A. and B. M. Peterlin (1994). "Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter." *Annu Rev Biochem* **63**: 717-43.
- Jordan, A., D. Bisgrove, et al. (2003). "HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro." *Embo J* **22**(8): 1868-77.
- 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.
- Kanda, T., K. F. Sullivan, et al. (1998). "Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells." *Curr Biol* **8**(7): 377-85.
- Kao, S. Y., A. F. Calman, et al. (1987). "Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product." *Nature* **330**(6147): 489-93.
- Karn, J. (1999). "Tackling Tat." *J Mol Biol* **293**(2): 235-54.
- Kashanchi, F., G. Piras, et al. (1994). "Direct interaction of human TFIID with the HIV-1 transactivator tat." *Nature* **367**(6460): 295-9.
- Kato, N. and E. Lam (2001). "Detection of chromosomes tagged with green fluorescent protein in live *Arabidopsis thaliana* plants." *Genome Biol* **2**(11): RESEARCH0045.
- Kiernan, R. E., C. Vanhulle, et al. (1999). "HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation." *Embo J* **18**(21): 6106-18.
- Kim, Y. K., C. F. Bourgeois, et al. (2002). "Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated transcriptional elongation." *Mol Cell Biol* **22**(13): 4622-37.
- Kimura, H. and P. R. Cook (2001). "Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B." *J Cell Biol* **153**(7): 1341-53.
- Klose, R. J. and A. P. Bird (2006). "Genomic DNA methylation: the mark and its mediators." *Trends Biochem Sci* **31**(2): 89-97.
- Kobor, M. S. and J. Greenblatt (2002). "Regulation of transcription elongation by phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* **1577**(2): 261-275.
- Koken, S. E., A. E. Greijer, et al. (1994). "Intracellular analysis of in vitro modified HIV Tat protein." *J Biol Chem* **269**(11): 8366-75.
- Kosak, S. T. and M. Groudine (2002). "The undiscovered country: chromosome territories and the organization of transcription." *Dev Cell* **2**(6): 690-2.
- Kupper, K., A. Kölbl, et al. "Radial Chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression (submitted)."
- Kuppuswamy, M., T. Subramanian, et al. (1989). "Multiple functional domains of Tat, the transactivator of HIV-1, defined by mutational analysis." *Nucleic Acids Res* **17**(9): 3551-61.
- Labrador, M. and V. G. Corces (2002). "Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization." *Cell* **111**(2): 151-4.
- Lachner, M., R. J. O'Sullivan, et al. (2003). "An epigenetic road map for histone lysine methylation." *J Cell Sci* **116**(Pt 11): 2117-24.
- Lamond, A. I. and W. C. Earnshaw (1998). "Structure and function in the nucleus." *Science* **280**(5363): 547-53.
- Laspias, M. F., A. P. Rice, et al. (1989). "HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation." *Cell* **59**(2): 283-92.
- Laughlin, M. A., G. Y. Chang, et al. (1995). "Sodium butyrate stimulation of HIV-1 gene expression: a novel mechanism of induction independent of NF-kappa B." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **9**(4): 332-9.
- Legrain, P. and M. Rosbash (1989). "Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm." *Cell* **57**(4): 573-83.
- Lemon, B. and R. Tjian (2000). "Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control." *Genes Dev* **14**(20): 2551-69.
- Lewinski, M. K., D. Bisgrove, et al. (2005). "Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription." *J Virol* **79**(11): 6610-9.



- Lichter, P., T. Cremer, et al. (1988). "Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(24): 9664-8.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-8.
- Lu, Y. C., N. Touzjian, et al. (1990). "Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **64**(10): 5226-9.
- 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. 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): 8279-89.
- Luger, K., A. W. Mader, et al. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* **389**(6648): 251-60.
- Lukacs, G. L., P. Haggie, et al. (2000). "Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus." *J Biol Chem* **275**(3): 1625-9.
- Lusic, M., A. Marcelllo, et al. (2003). "Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter." *Embo J* **22**(24): 6550-61.
- Lux, C., H. Albiez, et al. (2005). "Transition from initiation to promoter proximal pausing requires the CTD of RNA polymerase II." *Nucleic Acids Res* **33**(16): 5139-44.
- Mabon, S. A. and T. Misteli (2005). "Differential recruitment of pre-mRNA splicing factors to alternatively spliced transcripts in vivo." *PLoS Biol* **3**(11): e374.
- Mahy, N. L., P. E. Perry, et al. (2002). "Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH." *J Cell Biol* **159**(5): 753-63.
- 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., J. Hauber, et al. (1989). "The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA." *Nature* **338**(6212): 254-7.
- Mann, D. A. and A. D. Frankel (1991). "Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein." *Embo J* **10**(7): 1733-9.
- Manuelidis, L. (1985). "Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization." *Hum Genet* **71**(4): 288-93.
- Marcello, A., M. Lusic, et al. (2004). "Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription." *Gene* **326**: 1-11.
- Martin, C. and Y. Zhang (2005). "The diverse functions of histone lysine methylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 838-49.
- Martin, R. M., H. Leonhardt, et al. (2005). "DNA labeling in living cells." *Cytometry A* **67**(1): 45-52.
- Marzio, G., M. Tyagi, et al. (1998). "HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13519-24.
- Masumoto, H., H. Masukata, et al. (1989). "A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite." *J Cell Biol* **109**(5): 1963-73.
- Matter, N., P. Herrlich, et al. (2002). "Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68." *Nature* **420**(6916): 691-5.
- Mattick, J. S. (2003). "Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms." *Bioessays* **25**(10): 930-9.
- Mattick, J. S. (2005). "The functional genomics of noncoding RNA." *Science* **309**(5740): 1527-8.
- Matz, M. V., A. F. Fradkov, et al. (1999). "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species." *Nat Biotechnol* **17**(10): 969-73.
- Matz, M. V., Y. A. Labas, et al. (2006). "Evolution of function and color in GFP-like proteins." *Methods Biochem Anal* **47**: 139-61.
- Matzke, A. J., B. Huettel, et al. (2005). "Use of two-color fluorescence-tagged transgenes to study interphase chromosomes in living plants." *Plant Physiol* **139**(4): 1586-96.
- McNally, J. G., W. G. Muller, et al. (2000). "The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells." *Science* **287**(5456): 1262-5.
- Miao, F. and R. Natarajan (2005). "Mapping global histone methylation patterns in the coding regions of human genes." *Mol Cell Biol* **25**(11): 4650-61.
- Michaelis, C., R. Ciosk, et al. (1997). "Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids." *Cell* **91**(1): 35-45.
- Mischiati, C., F. Pironi, et al. (1999). "Extracellular HIV-1 Tat protein differentially activates the JNK and ERK/MAPK pathways in CD4 T cells." *Aids* **13**(13): 1637-45.
- Misteli, T. (2000). "Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function." *J Cell Sci* **113** ( Pt 11): 1841-9.

- Mitola, S., R. Soldi, et al. (2000). "Identification of specific molecular structures of human immunodeficiency virus type 1 Tat relevant for its biological effects on vascular endothelial cells." *J Virol* **74**(1): 344-53.
- Mitola, S., S. Sozzani, et al. (1997). "Tat-human immunodeficiency virus-1 induces human monocyte chemotaxis by activation of vascular endothelial growth factor receptor-1." *Blood* **90**(4): 1365-72.
- Modrow, S., D. Falke, et al. (2003). *Molekulare Virologie*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Muesing, M. A., D. H. Smith, et al. (1987). "Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein." *Cell* **48**(4): 691-701.
- Muller, W. G., D. Walker, et al. (2001). "Large-scale chromatin decondensation and recondensation regulated by transcription from a natural promoter." *J Cell Biol* **154**(1): 33-48.
- Munkel, C., R. Eils, et al. (1999). "Compartmentalization of interphase chromosomes observed in simulation and experiment." *J Mol Biol* **285**(3): 1053-65.
- Nagai, T., K. Iyata, et al. (2002). "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications." *Nat Biotechnol* **20**(1): 87-90.
- Naghavi, M. H., M. C. Estable, et al. (2001). "Upstream stimulating factor affects human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat-directed transcription in a cell-specific manner, independently of the HIV-1 subtype and the core-negative regulatory element." *J Gen Virol* **82**(Pt 3): 547-59.
- Nan, X., F. J. Campoy, et al. (1997). "MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin." *Cell* **88**(4): 471-81.
- Neugebauer, K. M. (2002). "On the importance of being co-transcriptional." *J Cell Sci* **115**(Pt 20): 3865-71.
- Orlando, V. (2003). "Polycomb, epigenomes, and control of cell identity." *Cell* **112**(5): 599-606.
- Osley, M. A. (1991). "The regulation of histone synthesis in the cell cycle." *Annu Rev Biochem* **60**: 827-61.
- Palancade, B. and O. Bensaude (2003). "Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation." *Eur J Biochem* **270**(19): 3859-70.
- Pazin, M. J., P. L. Sheridan, et al. (1996). "NF-kappa B-mediated chromatin reconfiguration and transcriptional activation of the HIV-1 enhancer in vitro." *Genes Dev* **10**(1): 37-49.
- Pecinka, A., N. Kato, et al. (2005). "Tandem repetitive transgenes and fluorescent chromatin tags alter local interphase chromosome arrangement in Arabidopsis thaliana." *J Cell Sci* **118**(Pt 16): 3751-8.
- Pederson, T. (2004). "The spatial organization of the genome in mammalian cells." *Curr Opin Genet Dev* **14**(2): 203-9.
- Pereira, L. A., K. Bentley, et al. (2000). "A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter." *Nucleic Acids Res* **28**(3): 663-8.
- Peters, A. H. and D. Schubeler (2005). "Methylation of histones: playing memory with DNA." *Curr Opin Cell Biol* **17**(2): 230-8.
- Pierson, T. C., T. L. Kieffer, et al. (2002). "Intrinsic stability of episomal circles formed during human immunodeficiency virus type 1 replication." *J Virol* **76**(8): 4138-44.
- Pirrotta, V., S. Poux, et al. (2003). "Assembly of Polycomb complexes and silencing mechanisms." *Genetica* **117**(2-3): 191-7.
- Politz, J. C., E. S. Browne, et al. (1998). "Intranuclear diffusion and hybridization state of oligonucleotides measured by fluorescence correlation spectroscopy in living cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6043-8.
- Politz, J. C. and T. Pederson (2000). "Review: movement of mRNA from transcription site to nuclear pores." *J Struct Biol* **129**(2-3): 252-7.
- Politz, J. C., R. A. Tuft, et al. (1999). "Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells." *Curr Biol* **9**(6): 285-91.
- Pomerantz, R. J., D. Trono, et al. (1990). "Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency." *Cell* **61**(7): 1271-6.
- Pumfery, A., L. Deng, et al. (2003). "Chromatin remodeling and modification during HIV-1 Tat-activated transcription." *Curr HIV Res* **1**(3): 343-62.
- Purcell, D. F. and M. A. Martin (1993). "Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity." *J Virol* **67**(11): 6365-78.
- Quivy, V. and C. Van Lint (2002). "Diversity of acetylation targets and roles in transcriptional regulation: the human immunodeficiency virus type 1 promoter as a model system." *Biochem Pharmacol* **64**(5-6): 925-34.
- Radonic, A., S. Thulke, et al. (2004). "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR." *Biochem Biophys Res Commun* **313**(4): 856-62.

- 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.
- Rana, T. M. and K. T. Jeang (1999). "Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA." *Arch Biochem Biophys* **365**(2): 175-85.
- Rausch, J. W. and S. F. Le Grice (2004). "Binding, bending and bonding: polypurine tract-primed initiation of plus-strand DNA synthesis in human immunodeficiency virus." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(9): 1752-66.
- Reeves, R., C. M. Gorman, et al. (1985). "Minichromosome assembly of non-integrated plasmid DNA transfected into mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **13**(10): 3599-615.
- Robinett, C. C., A. Straight, et al. (1996). "In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition." *J Cell Biol* **135**(6 Pt 2): 1685-700.
- Rosen, C. A., J. G. Sodroski, et al. (1985). "The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat." *Cell* **41**(3): 813-23.
- Rusnati, M., G. Tulipano, et al. (1999). "Multiple interactions of HIV-1 Tat protein with size-defined heparin oligosaccharides." *J Biol Chem* **274**(40): 28198-205.
- Russo, V., Ed. (1996). *Epigenetic mechanism of gene regulation*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sachs, R. K., G. van den Engh, et al. (1995). "A random-walk/giant-loop model for interphase chromosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7): 2710-4.
- Sadowski, I., J. Ma, et al. (1988). "GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator." *Nature* **335**(6190): 563-4.
- Sanford, J. R. and J. F. Caceres (2004). "Pre-mRNA splicing: life at the centre of the central dogma." *J Cell Sci* **117**(Pt 26): 6261-3.
- Santos-Rosa, H., R. Schneider, et al. (2002). "Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3." *Nature* **419**(6905): 407-11.
- Schardin, M., T. Cremer, et al. (1985). "Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories." *Hum Genet* **71**(4): 281-7.
- Schermelleh, L., I. Solovei, et al. (2001). "Two-color fluorescence labeling of early and mid-to-late replicating chromatin in living cells." *Chromosome Res* **9**(1): 77-80.
- Schubeler, D., D. M. MacAlpine, et al. (2004). "The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote." *Genes Dev* **18**(11): 1263-71.
- Shaner, N. C., P. A. Steinbach, et al. (2005). "A guide to choosing fluorescent proteins." *Nat Methods* **2**(12): 905-9.
- Sims, R. J., 3rd, K. Nishioka, et al. (2003). "Histone lysine methylation: a signature for chromatin function." *Trends Genet* **19**(11): 629-39.
- Sleeman, J. E. and A. I. Lamond (1999). "Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway." *Curr Biol* **9**(19): 1065-74.
- Sodroski, J., R. Patarca, et al. (1985). "Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III." *Science* **229**(4708): 74-7.
- Sodroski, J., C. Rosen, et al. (1985). "Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat." *Science* **227**(4683): 171-3.
- Spector, D. L. (2001). "Nuclear domains." *J Cell Sci* **114**(Pt 16): 2891-3.
- Spector, D. L. (2003). "The dynamics of chromosome organization and gene regulation." *Annu Rev Biochem* **72**: 573-608.
- Spector, D. L., R. T. O'Keefe, et al. (1993). "Dynamics of transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**: 799-805.
- Steger, D. J., A. Eberharter, et al. (1998). "Purified histone acetyltransferase complexes stimulate HIV-1 transcription from preassembled nucleosomal arrays." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 12924-9.
- Stoltzfus, C. M. and J. M. Madsen (2006). "Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing." *Curr HIV Res* **4**(1): 43-55.
- Tanabe, H., F. A. Habermann, et al. (2002). "Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications." *Mutat Res* **504**(1-2): 37-45.
- Teo, I., C. Veryard, et al. (1997). "Circular forms of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA and high levels of viral protein expression: association with dementia and multinucleated giant cells in the brains of patients with AIDS." *J Virol* **71**(4): 2928-33.

- Trentani, A., P. S. Testillano, et al. (2003). "Visualization of transcription sites at the electron microscope." *Eur J Histochem* **47**(3): 195-200.
- 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.
- Tsukamoto, T., N. Hashiguchi, et al. (2000). "Visualization of gene activity in living cells." *Nat Cell Biol* **2**(12): 871-8.
- Tumbar, T. and A. S. Belmont (2001). "Interphase movements of a DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator." *Nat Cell Biol* **3**(2): 134-9.
- Tumbar, T., G. Sudlow, et al. (1999). "Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain." *J Cell Biol* **145**(7): 1341-54.
- van Driel, R., P. F. Fransz, et al. (2003). "The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels." *J Cell Sci* **116**(Pt 20): 4067-75.
- Van Lint, C., S. Emiliani, et al. (1996). "Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation." *Embo J* **15**(5): 1112-20.
- Vazquez, J., A. S. Belmont, et al. (2001). "Multiple regimes of constrained chromosome motion are regulated in the interphase Drosophila nucleus." *Curr Biol* **11**(16): 1227-39.
- 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.
- Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." *Science* **291**(5507): 1304-51.
- Verdin, E., P. Paras, Jr., et al. (1993). "Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation." *Embo J* **12**(8): 3249-59.
- Verschure, P. J., I. van Der Kraan, et al. (1999). "Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories." *J Cell Biol* **147**(1): 13-24.
- Veschambre, P., A. Roisin, et al. (1997). "Biochemical and functional interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator with the general transcription factor TFIIIB." *J Gen Virol* **78** ( Pt 9): 2235-45.
- Veschambre, P., P. Simard, et al. (1995). "Evidence for functional interaction between the HIV-1 Tat transactivator and the TATA box binding protein in vivo." *J Mol Biol* **250**(2): 169-80.
- Volpi, E. V., E. Chevret, et al. (2000). "Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei." *J Cell Sci* **113** ( Pt 9): 1565-76.
- Watt, F. and P. L. Molloy (1988). "Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter." *Genes Dev* **2**(9): 1136-43.
- Wei, Y., L. Yu, et al. (1999). "Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation." *Cell* **97**(1): 99-109.
- Weierich, C. Untersuchung von expressionsabhängigen Veränderungen eines Tat-induzierbaren HIV-LTR Reporterkonstrukts (Arbeitstitel). *Department Biologie II, AG T. Cremer. München, LMU.*
- West, M. J. and J. Karn (1999). "Stimulation of Tat-associated kinase-independent transcriptional elongation from the human immunodeficiency virus type-1 long terminal repeat by a cellular enhancer." *Embo J* **18**(5): 1378-86.
- Westendorp, M. O., M. Li-Weber, et al. (1994). "Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells." *J Virol* **68**(7): 4177-85.
- Widlak, P., R. B. Gaynor, et al. (1997). "In vitro chromatin assembly of the HIV-1 promoter. ATP-dependent polar repositioning of nucleosomes by Sp1 and NFkappaB." *J Biol Chem* **272**(28): 17654-61.
- Williams, R. R. (2003). "Transcription and the territory: the ins and outs of gene positioning." *Trends Genet* **19**(6): 298-302.
- Williams, R. R., S. Broad, et al. (2002). "Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei." *Exp Cell Res* **272**(2): 163-75.
- Williams, S. A., L. F. Chen, et al. (2006). "NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation." *Embo J* **25**(1): 139-49.
- Wiskerchen, M. and M. A. Muesing (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells." *J Virol* **69**(1): 376-86.
- Wolff, H., K. Hadian, et al. (2006). "Analysis of the influence of subcellular localization of the HIV Rev protein on Rev-dependent gene expression by multi-fluorescence live-cell imaging." *Exp Cell Res* **312**(4): 443-56.

- Wu, Y. (2004). "HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA." *Retrovirology* **1**(1): 13.
- Wu, Y. and J. W. Marsh (2001). "Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA." *Science* **293**(5534): 1503-6.
- Wu, Y. and J. W. Marsh (2003). "Early transcription from nonintegrated DNA in human immunodeficiency virus infection." *J Virol* **77**(19): 10376-82.
- Wu-Baer, F., D. Sigman, et al. (1995). "Specific binding of RNA polymerase II to the human immunodeficiency virus trans-activating region RNA is regulated by cellular cofactors and Tat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7153-7.
- Wurtzer, S., A. Goubard, et al. (2006). "Functional central polypurine tract provides downstream protection of the human immunodeficiency virus type 1 genome from editing by APOBEC3G and APOBEC3B." *J Virol* **80**(7): 3679-83.
- Xiao, H., C. Neuveut, et al. (2000). "Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11466-71.
- Yang, X. J. (2004). "Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling." *Bioessays* **26**(10): 1076-87.
- Zauli, G., B. R. Davis, et al. (1992). "tat protein stimulates production of transforming growth factor-beta 1 by marrow macrophages: a potential mechanism for human immunodeficiency virus-1-induced hematopoietic suppression." *Blood* **80**(12): 3036-43.
- Zheng, Y. H., H. F. Yu, et al. (2003). "Human p32 protein relieves a post-transcriptional block to HIV replication in murine cells." *Nat Cell Biol* **5**(7): 611-8.
- Zhou, M., L. Deng, et al. (2004). "Coordination of transcription factor phosphorylation and histone methylation by the P-TEFb kinase during human immunodeficiency virus type 1 transcription." *J Virol* **78**(24): 13522-33.
- Zinner, R., H. Albiez, et al. (2006). "Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones." *Histochem Cell Biol* **125**(1-2): 3-19.
- Zirbel, R. M., U. R. Mathieu, et al. (1993). "Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries." *Chromosome Res* **1**(2): 93-106.

## 6.2 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>Bacterial artificial Chromosom</i>
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CT	Chromosomenterritorium
CTD	C-Terminale Domäne
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
GePS	Gene Positioning System

## Verzeichnisse

GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Inhibitoren der Histondeacetylasen
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IC	Interchromatin-Kompartiment
K	Lysin (Aminosäure-Code)
kb	Kilobase
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
Mb	Megabasen
me	methyliert
me1, me2, me3	mono-, di-, trimethyliert
mRNA	Boten-RNA
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NLS	<i>Nuclear localization Signal</i>
Nuc	Nukleosom
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RPII	RNA Polymerase II
RT	Reverse Transkription
TAR	<i>Tat Activation Response Element</i>
u	Einheit ( <i>unit</i> ), Mengenangabe für Enzyme
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein

## 7 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinen „Doktoreltern“ Ruth Brack-Werner und Thomas Cremer, die jeder auf seine Art wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ruth Brack-Werner für die gute und geduldige Betreuung dieser Arbeit und das unermüdliche Kombinieren von Virologie und Zellkernarchitektur. Thomas Cremer für die langen, bildlichen und begeisterten Diskussionen über die Faszination Zellkern.

Ein großer Dank gebührt Claudia Weierich, mit der ich nicht nur das Projekt „GePS“ teilte, sondern auch die damit verbundene Begeisterung und Frustration und die immer für ein motivierendes und ideenreiches Arbeitsfrühstück zu haben war. Außerdem danke ich ihr für die Geduld und maßgebliche Unterstützung, mir bei der FISH und der Amira-Bildbearbeitung zu helfen.

Horst Wolff gilt ein besonderer Dank, der durch seine Ideen und Vorschläge diese Arbeit bereicherte, mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und von dem ich fachlich so viel lernen konnte wie selten zuvor.

Angeliki Tsokou danke ich für die gemeinsame Etablierung der ChIP und die Ausdauer diese sinnvoll auszuwerten.

Allen Mitgliedern/Gästen des IMV danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen, die gute Zusammenarbeit, die Hilfe und das nette Arbeitsklima, das sie gemeinsam in den letzten Jahren schufen. Ebenso geht dieser Dank an die Doktoranden der Cremer-Arbeitsgruppe, die mich bei meinen Besuchen immer herzlich aufgenommen haben.

Marion Cremer danke ich für das kritische und genaue Durchlesen dieser Arbeit und die daraus entstandenen hilfreichen Tipps.

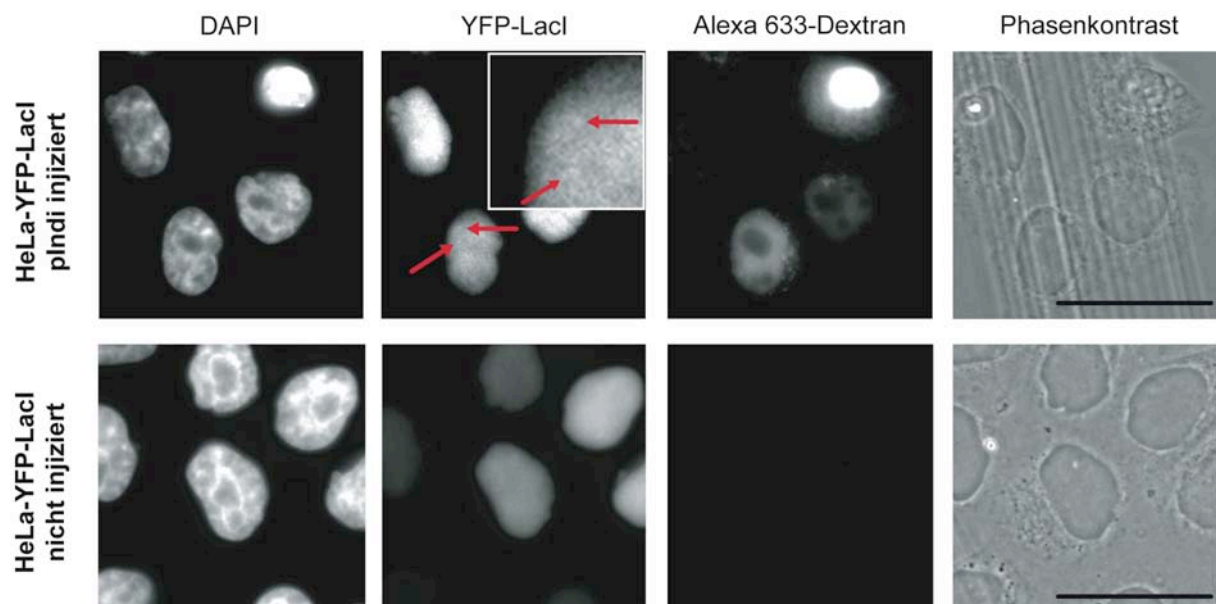
Meiner Familie und Meggi danke ich für die Liebe und Unterstützung in den letzten Jahren, die den nötigen Rückhalt für das Durchhaltevermögen und Gelingen dieser Arbeit gaben.

## 8 Anhang

### 8.1 Zusätzliche Abbildungen

#### 8.1.1 Mikroinjektionsversuch

Es wurde die Anzahl an Plasmid-Molekülen rein rechnerisch über das Molekulargewicht nach der Formel  $n \text{ bp} \times 660 \text{ Da/bp}$  und daraus die Anzahl an Plasmid-Kopien ( $(6 \times 10^{23} \times \text{Konz. Plasmid}) / (\text{g/mol})$ ) bestimmt. Eine Verdünnungsreihe mit 1000, 100, 10 und 1 Molekülen pro 25 fl wurde in „Gene Tag“ YFP-LacI stabil exprimierende HeLa-Zellen mikroinjiziert, fixiert und am Mikroskop untersucht. Dabei wurde eine injizierte Zelle definiert und fünf Ebenen mit 3x3 Binning und Auto-Expositionszeiten dokumentiert. Als Signal wurde ein Spot gewertet, der beim Durchfokussieren in mehreren Ebenen colokalisierte. Um mikroinjizierte Zellen im Mikroskop wieder zu finden, wurden Deckgläschen mit eingraviertem Raster verwendet und Alexa 633 markiertes Dextran (1mM) co-injiziert. Der Lac-Repressor lag in nicht-injizierten Zellen diffus verteilt im Kern vor, zeigte nach Injektion des Indikatorgen-Plasmids in den Zellen einen strukturierteren Hintergrund, der ab 10 Plasmidkopien als Signal gewertet werden konnte.



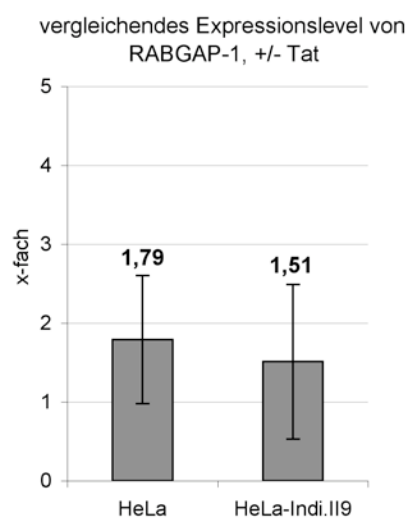
**Abbildung I**

**Mikroinjektion von rechnerisch 10 Kopien von plndi in HeLa-YFP-LacI-Zellen.** 10 Kopien von plndi wurden in YFP-LacI stabil exprimierende HeLa-Zellen mikro-injiziert. Co-injiziert wurde Alexa 633 markiertes Dextran. Obere Reihe zeigt injizierte Zellen, untere Reihe nicht-injizierte Zellen. Von links nach rechts: DAPI-Gegenfärbung, Kanal für YFP-LacI, Alexa 633 und Phasenkontrast. Zwei beispielhafte Plasmid-Ansammlungen nach Mikroinjektion von 10 Plasmiden sind durch rote Pfeile markiert.



## 8.1.2 Transkriptionelle Aktivierung des benachbarten Gens RABGAP-1L

Um den Einfluss der transkriptionellen Aktivierung des Transgens auf das linear benachbarte zelluläre Gen zu untersuchen, wurde die Transkriptmenge des zellulären Gens vor und nach Tat-Aktivierung des Transgens durch eine Real-Time-PCR bestimmt. Tat selbst kann die Transkription von zellulären Genen bekanntermaßen beeinflussen (vgl. 1.2.2). Um eine mögliche transkriptionelle Aktivierung oder Repression des Gens direkt durch Tat auszuschließen, wurden parallel die parentalen HeLa-Zellen als Kontrolle mitgeführt. Eine Aktivierung/Repression durch Tat konnte in keiner der beiden Zelllinien beobachtet werden.



### Abbildung II

**Vergleichende Expressionslevel des RABGAP-1L Gens vor und nach Tat-Aktivierung in HeLa- und HeLa-Indi.I19-Zellen.** Vergleichende Expressionslevel wurden durch  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  errechnet. Werte bis 2 werden als nicht signifikant gewertet.

## 8.2 Primer

### 8.2.1 Primer für die Klonierungen

Name	5' → 3' Sequenz
5'-ClaI-Intron	CCATCGATTAAGTACTGAGTAGGTCAGTGCTTCTGACACAACAGTCTCG
Intron-ClaI-3'	CCTCGATCGATGGCTATATTAAGTACTCTAGCCTTAAGAGC
5'-SfbI-XhoI-	CGACCTGCAGGGGCCCTCGAGGAGATGGCTAGCAAGGGCGAGGAGCTG
GFPsg143-NheI	TTCACC

<b>GFPsg143</b> -BsrGI-3'	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTGAGT
5'-SfbI- <b>YFP(F46L)</b>	CGACCTGCAGGGGCCATGGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCACC
<b>YFP(F46L)</b> -BsrGI-3'	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGT
5'-NheI- <b>mRFP</b>	ATCATGGCTAGCGTGGCCTCCTCCGAGGAC
<b>mRFP</b> -BsrGI-3'	TTCCTTGTACAGGGCGCCGGTGGAGTGGCGGCCCTC
5'-BssHII-BsaBI-	GCGCGCGAGATGAGGATCATGGCTAGCACGGTGGGCAAGAGCAGCAAG
<b>SmB</b> -NheI	ATGCTGCAG
SpeI- <b>SmB</b> -ClaI-	TTCGAAGGTACCATCGATTTAACTAGTGGCACCAAGAAGGCCTCGCATCC
KpnI-BstBI-3'	CAGGGGGAGGAGGCCG
5'-BssHII-BsaBI-	GCGCGCGAGATGAGGATCATGGCTAGCGGCCCAAGAGGCGACAGCTG
<b>CENP-B</b> -NheI	ACGTTCCGG
SpeI- <b>CENP-B</b> -ClaI-	TTCGAAGGTACCATCGATTTAACTAGTGGCACCAAGTGGCTCCCGCCACTGC
KpnI-BstBi-3'	CCTCCGAGGGCAC
5'-BssHII-BsaBI-	GCGCGCGAGATGAGGATCATGGCTAGCAGCTACGGCCGCCCCCTCCC
<b>SC35</b> -NheI	GATGTGGAG
SpeI- <b>SC35</b> -ClaI-	TTCGAAGGTACCATCGATTTAACTAGTGGCACCAAGAGGACACCGCTCCTT
KpnI-BstBI-3'	CCTCTTCAGGAGA
5'-SacII- <b>H2B</b> -SpeI	CCGCGGGCCACCATGACTAGTCCAGAGCCAGCGAAGTCTGCT
<b>H2B</b> -NheI-3'	GTCACCAAGTACACCAGCTCTAAAGGGTCTGGCGCTAGC
5'-BsaBI- <b>GFsg143</b> -	GATGAGTATCATGGCTAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCCGGGGTGGT
NheI	GCCCATC
BstBI-SpeI-	TTCGAACTAACTAGTGGCACCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTGAGTGA
<b>GFPsg143</b> -3'	TGCCGGCGGC
5'-NheI- <b>DsRed<sub>olimut</sub></b>	CATGACGCTAGCGGGGGGAGCAGCGGCGGCGGCGTG
<b>DsRed<sub>olimut</sub></b> -NheI-3'	CTAGCTAGCACCGGCACCCAGGAACAGGTGGTGGCG
5'-PshAI- <b>NFAT(II)</b> -	CTGACAGTCGTCAGCACCGGTTTCGAGGACCCGGAGGGAGAAGTATTAGT
<b>LTR</b>	GTGG
5'-PshAI- <b>NFkB-LTR</b>	CTGACAGTCGTCAGCACCGGTTCCAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTC
	CAGGG
5'-PshAI- <b>Sp1-LTR</b>	CTGACAGTCGTCAGCACCGGTTTCAGGGAGGTGTGGCCTGGGCGGGACT
	GGGGAG
<b>LTR</b> -NheI-3'	GCGCTAGCCATCCCGCGCGCTTCAGCAAGCCG

## 8.2.2 Primer für die gerichtete Mutagenese

Name	5' → 3' Sequenz
<i>DsRed<sub>quick</sub>-1</i>	TTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTTCGAG
<i>DsRed<sub>quick</sub>-2</i>	GGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGAC CAAGGGCGGC

<i>DsRed</i> <sub>quick</sub> -3	GACTCCTCCCTGCAGGACGGCTCCTTCATCTACAAGGTGAAGTTC
<i>DsRed</i> <sub>quick</sub> -4	GTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCCACCACCTGTTCTCG
Tat(K41A)	TGTTTCATAACAGCCGCCTTAGGCATCTCC
5'-mRFP-1st-1	GATGAGGATCATGGCTAGCGTGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTT CATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGC
mRFP-1st-1-3'	CGGGGAAGGACAGCTTCAGGTAGTCGGGGATGTCGGCGGGGTGCTTCACG TAGGCCTTGGAGCC
mRFP-1st-2-3'	TTCGAAGTTGGTACCGCGCAGCTTCACCTTGTAGATGAACTCGCCGTCCTGC AGGG
5'-mRFP-2nd-1	GAGATCAAGATGCGCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCCGA GGTGAAGACCACCTACATGGCC
mRFP-2nd-1-3'	CAGCTTGATGTCGGTGGCGTAGGCGCCGGGCAGCTGCACGGGCTTCTTGG CCATGTAGGTGGTCTTCACCTCGGC
5'-mRFP-2nd-2	ACTATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCATGTACCCCGAGGACGGCGC CCTGAAGGGCGAGATCAAGATGCGCCTGAAGCTG
mRFP-2nd-2-3'	GTA CTGCTCCACGATGGTGTAGTCCTCGTTGTGGGAGGTGATGTCCAGCTTG ATGTCGGTGGCGTAGGCGCCGGG
5'-mRFP-2nd-3	GATGAGGATCCGCGGTACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAA GAAGACTATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGC
mRFP-2nd-3-3'	TTCGAACTA ACTAGTGGCACCGGCGCCGGTGGAGTGGCGGCCCTCGGCGCG CTCGTACTGCTCCACGATGGTGTAGTC

### 8.2.3 Primer für die Real-Time-PCR

Name	5' → 3' Sequenz
RPIIs	GTGCGGCTGCTTCCATAA
RPIIs	GCACCACGTCCAATGACAT
5'-inRed	ATGCGCTTCAAGGTGCGTATG
inRed-3'	CAGCTTCTTGTAGTCGGGGAT
5'-Intronquant	CTGAAACTGTTTGGATCCATC
Intronquant-3'	AATAGGTGCCTATCAGAAACG
5'-RABGAP	AAGGTTAGTGGATCATCTGATTC
RABGAP-3'	GGAATATCTCCAAACGAATGGTC
5'-hGFAP	GCTTCCTGGAACAGCAAAACAAGGC
hGFAP-3'	GTCTATAGGCAGCCAGGTTGTTC

### 8.2.4 Primer für die LM-PCR

Name	5' → 3' Sequenz
Linker -	Pho-CCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCAGATCTCCCG
Linker +	GACCCGGGAGATCTGAATTCAGTGGCACAGCAGTTAGGT
LSP1	GACCCGGGAGATCTGAATTC
LSP2	AGTGGCACAGCAGTTAGG
Bio-LM-PCR1	Biotin-TCTTCTCTCCTTATTTGGCCTCTTCTACTTGC
LM-PCR2	CCAAAGGTCAGTGGATATCTGATCCCTGGC
LM-PCR3	AGATCAAGGATCTCTTGTCTTTTTTGGGACCA

### 8.2.5 Primer für die analytischen PCRs

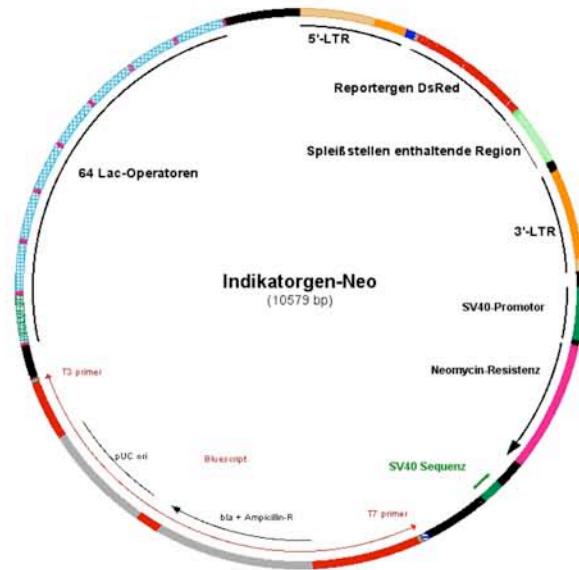
Name	5' → 3' Sequenz
5'-LTR	TGGAAGGGCTAATTTGGTCCCAAAAAGAC
Red-3'	CACGCGCTCCCACTTGAAGCCCTCGGGGAA
5'-Red	TTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTG
LTR-3'	TGCTAGAGATTTTCCCACTGACTAAAAGGG
5'-Ops	ACTAGGTGCGCACAGAGCGGTAAGACTGCG
inOps-3'	GGAATTCGGCGCCTCTAGAGTCGAGGAATTCC
Intron-3'	CCTCGATCGATGGCTATATTAAGTACTCTAGCCTTAAGAGC
5'-Nuc-1	AGTAGTGTGTGCCCGTCTGT
Nuc-1-3'	TCCTTGATGACGTTCTTGGAG
5'-inRed	ATGCGCTTCAAGGTGCGTATG
inRed-3'	ATCCCGACTACAAGAAGCTG
5'-NFκB	CAAAGACTGCTGACATCGAGC
NFκB-3'	GCACACACTACTTTGAGCACTC

## 8.3 Plasmidkarten und Sequenzen

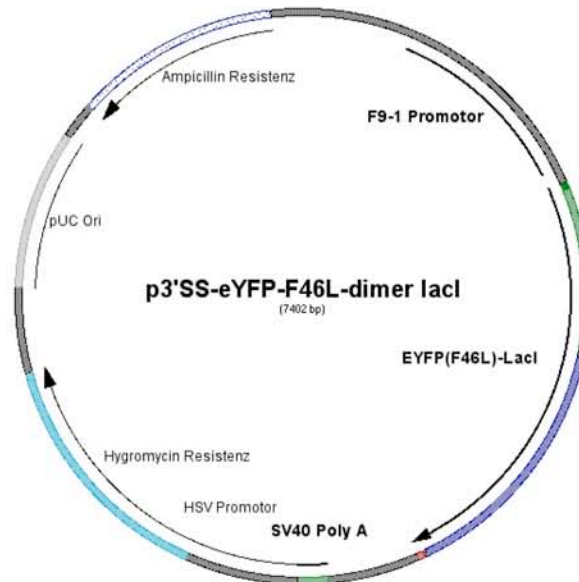
Im Folgenden sind die drei Plasmidkarten der GePS-Bestandteile Indikatoren, „Gene Tag“ und Referenzstruktur gezeigt. Es sind die Bereiche/Regionen als Übersicht dargestellt, um eine lineare Abfolge der Bestandteile zu verdeutlichen.

Im Anschluß daran befindet sich die Nukleotid-Sequenz von mRFP. Hellblau geschriebene Nukleotide unterscheiden sich zu *DsRed*, nicht aber zu *DsRed<sub>quick</sub>*, in roter Schrift sind die Unterschiede zu beiden genannten Sequenzen hervorgehoben.

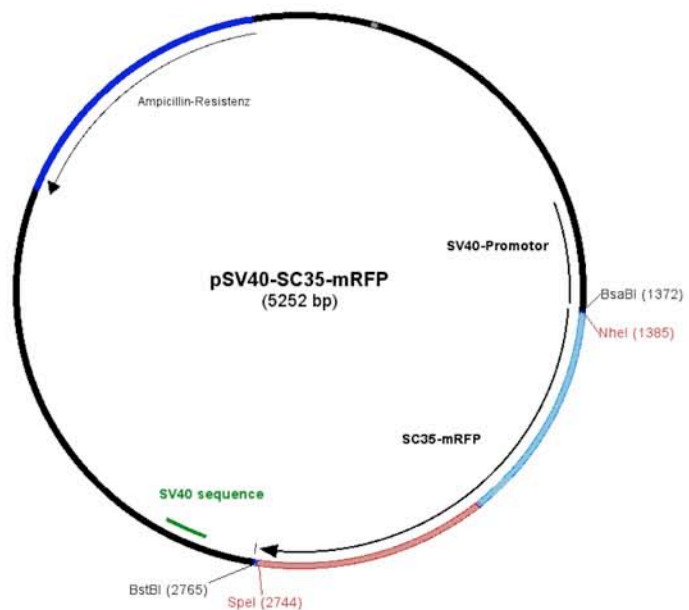
Das Indikatorgen plndi:



Der "Gene Tag",  
als Beispiel YFP-LacI:



Referenzstruktur,  
als Beispiel SC35-mRFP:



Nukleotid- und Protein-Sequenz von mRFP1:

```

ATG GTG GCC TCC TCC GAG GAC GTC ATC AAG GAG TTC ATG CGC TTC AAG GTG CGC ATG GAG GGC TCC GTG AAC
TAC CAC CCG AGG AGG CTC CTG CAG TAG TTC CTC AAG TAC GCG AAG TTC CAC GCG TAC CTC CCG AGG CAC TTG
▶ M V A S S E D V I K E F M R F K V R M E G S V N

GGC CAC GAG TTC GAG ATC GAG GGC GAG GGC GAG GGC CGC CCC TAC GAG GGC ACC CAG ACC GGC TCC AAG CTG AAG
CCG GTG CTC AAG CTC TAG CTC CCG CTC CCG CTC CCG GCG GGG ATG CTC CCG TGG GTC TGG CCG TTC GAC TTC
▶ G H E F E I E G E G E G R P Y E G T Q T A K L K

GTG ACC AAG GGC GGC CCC CTG CCC TTC GCC TGG GAC ATC CTG TCC CCC CAG TTC CAG TAC GGC TCC AAG GCC
CAC TGG TTC CCG CCG GGG GAC GGG AAG CCG ACC CTG TAG GAC AGG GGG GTC AAG GTC ATG CCG AGG TTC CCG
▶ V T K G G P L P F A W D I L S P Q F Q Y G S K A

TAC GTG AAG CAC CCC GCC GAC ATC CCC GAC TAC CTG AAG CTG TCC TTC CCC GAG GGC TTC AAG TGG GAG CGC
ATG CAC TTC GTG GGG CCG CTG TAG GGG CTG ATG GAC TTC GAC AGG AAG GGG CTC CCG AAG TTC ACC CTC GCG
▶ Y V K H P A D I P D Y L K L S F P E G F K W E R

GTG ATG AAC TTC GAG CAC GAG GGC GGC GTG GTG ACC GTG ACC CAG GAC TCC TCC CTG CAG GAC GGC GAG TTC ATC
CAC TAC TTG AAG CTC CTG CCG CCG CAC CAC TGG CAC TGG GTC CTG AGG AGG GAC GTC CTG CCG CTC AAG TAG
▶ V M N F E D G G V V T V T Q D S S L Q D G E F I

TAC AAG GTG AAG CTG CCG GGC ACC AAC TTC CCC TCC GAC GGC CCC GTA ATG CAG AAG AAG ACT ATG GGC TGG
ATG TTC CAC TTC GAC CCG CCG TGG TTG AAG GGG AGG CTG CCG GGG CAT TAC GTC TTC TTC TGA TAC CCG ACC
▶ Y K V K L R G T N F P S D G P V M Q K K T M G W

GAG GCC TCC ACC GAG CGC ATG TAC CCC GAG GAC GGC GCC CTG AAG GGC GAG ATC AAG ATG CCG CTG AAG CTG
CTC CCG AGG TGG CTC GCG TAC ATG GGG CTC CTG CCG GAC TTC CCG CTC TAG TTC TAC GCG GAC TTC GAC
▶ E A S T E R M Y P E D G A L K G E I K M R L K L

AAG GAC GGC GGC CAC TAC GAC GCC GAG GTG AAG ACC ACC TAC ATG GCC AAG AAG CCC GTG CAG CTG CCC GGC
TTC CTG CCG CCG GTG ATG CTG CCG CTC CAC TTC TGG TGG ATG TAC CCG TTC TTC GGG CAC GTC GAC GGG CCG
▶ K D G G H Y D A E V K T T Y M A K K P V Q L P G

GCC TAC GCC ACC GAC ATC AAG CTG GAC ATC ACC TCC CAC AAC GAG GAC TAC ACC ATC GTG GAG CAG TAC GAG
CGG ATG CCG TGG CTG TAG TTC GAC CTG TAG TGG AGG GTG TGG CTC CTG ATG TGG TAG CAC CTC GTC ATG CTC
▶ A Y A T D I K L D I T S H N E D Y T I V E Q Y E

CGC ACC GAG GGC CGC CAC TCC ACC GGC GCC TAG
GCG CCG CTC CCG GCG GTG AGG TGG CCG CCG ATC
▶ R A E G R H S T G A
    
```

## Lebenslauf

Name: Manja Ziegler  
Geburtsdatum: 12.01.1977  
Geburtsort: Stuttgart- Bad Cannstatt  
Nationalität: deutsch

### Ausbildung:

Seit 04/2002 Doktorandin am Department Biologie II der LMU München in Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Virologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit.

04/2004 Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit (BBS) an der Universität Regensburg.

05/2001-03/2002 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Virologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit.

10/1996-03/2002 Studium der Biologie an der Eberhard-Karls Universität Tübingen und der Ludwig Maximilians Universität München.

Abschluss des Studiums als Diplombiologin in den Fächern Humangenetik (Hauptfach), Genetik, Immunologie und Informatik an der Ludwig Maximilians Universität München.

08/1983-06/1996 Schulausbildung mit Allgemeiner Hochschulreife am Salier-Gymnasium Waiblingen.

## Publikationen

Wolff, H., A. Hartl, H.M. Heilken, K. Hadian, **M. Ziegler**, R. Brack-Werner (2006). „A live cell assay for simultaneous monitoring of expression and interaction of proteins.“ BioTechniques (in press).

Wolff, H., K. Hadian, **M. Ziegler**, C. Weierich, S. Kramer-Hammerle, A. Kleinschmidt, V. Erfle, R. Brack-Werner (2006). "Analysis of the influence of subcellular localization of the HIV Rev protein on Rev-dependent gene expression by multi-fluorescence live-cell imaging." Exp Cell Res **312**(4): 443-56.

Lux, C., H. Albiez, R. D. Chapman, M. Heidinger, M. Meininghaus, R. Brack-Werner, A. Lang, **M. Ziegler**, T. Cremer, D. Eick (2005). "Transition from initiation to promoter proximal pausing requires the CTD of RNA polymerase II." Nucleic Acids Res **33**(16): 5139-44.

## Posterpräsentationen

Annual Meeting 2006, Gesellschaft für Virologie in München: **Ziegler, M.**, C. Weierich, H. Wolff, T. Cremer, R. Brack-Werner (2006). „Analysis of integrated and episomal forms of an HIV-Tat inducible Construct.“

EMBO / FEBS Conference on Nuclear Structure and Dynamics in La Grande Motte, Frankreich: **Ziegler, M.**, A. Tsokou, H. Wolff, T. Cremer, R. Brack-Werner (2005). „Analysis of integrated and episomal states of a HIV-Tat inducible construct.“

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie in Berlin: **Ziegler, M.**, C. Weierich, H. Wolff, R. Brack-Werner, T. Cremer (2004). „Molecular Toolbox for an *in vivo* Gene Positioning System.“

Transregio 5 Symposium: Chromatin, Assembly and Inheritance of Functional States in München: **Ziegler, M.**, C. Weierich, H. Wolff, R. Brack-Werner, T. Cremer (2003). „Molecular Toolbox for an *in vivo* Gene Positioning System.“

5. DGZ-Nachwuchswissenschaftler-Tagung „Zellkernarchitektur“ in Jena: **Ziegler, M.**, C. Weierich, H. Wolff, R. Brack-Werner, T. Cremer (2003). „Molecular Toolbox for an *in vivo* Gene Positioning System.“

## Patentanmeldung

„ExBiFC: Ein Verfahren zur simultanen Analyse der Expression, Lokalisation und Interaktion von Proteinen in lebenden Zellen“, EP 04030473.5 vom 22.12.2004.



## **Erklärung**

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde.

München, den 28.11.2006

Manja Ziegler